

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Prírodovedecká fakulta

Katedra biotechnológií



**Interakcie MAPK kaskád a katanínu v Lucerne sietej**

## BAKALÁRSKA PRÁCA

Autor:	<b>Šimon Vaško</b>
Študijný program:	B0512A130007 Biotechnológie a génové inžinierstvo
Študijný odbor:	Biotechnológie a génové inžinierstvo
Forma štúdia:	Prezenčná
Vedúci práce:	<b>Mgr. Ivan Luptovčiak, Ph.D.</b>
Rok:	2023

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracoval samostatne pod vedením Mgr. Ivana Luptovčiaka, Ph.D. s vyznačením všetkých použitých prameňov a spoluautorstvom. Súhlasím so zverejnením bakalárskej práce podľa zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách v znení neskorších predpisov. Bol som oboznámená s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Sb. autorský zákon, v znení neskorších predpisov.

V Olomouci dňa 9.5. 2023

.....

Šimon Vaško

#### Pod'akovanie:

Na prvom mieste by som rád poďakoval môjmu vedúcemu bakalárskej práce pánovi Mgr. Ivanovi Luptovčiakovi, Ph.D. za odborné vedenie, čas a rady pri vypracovaní tejto bakalárskej práce. Ďalej by som rád požaloval kolektívu Katedry biotechnológie za ich prívetiví a vľúdny prístup ako aj ich ochotu pomôcť. Rád by som poďakoval svojej rodine a blízkym za ich podporu.

Táto práca vznikla za podpory projektu „Rastliny ako prostriedok udržateľného rozvoja“, reg. Č.: CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/000827 financovaného z EFRR

## Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora	Šimon Vaško
Názov práce	Interakcie MAPK kaskád a katanínu v Lucerne siatej
Typ práce	Bakalárska
Pracovisko	Katedra biotechnológií
Vedúci práce	Mgr. Ivan Luptovčíak, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2023

### Abstrakt

Katanín je heterodimerný proteín, ktorý má schopnosť oddeľovať mikrotubuly, vďaka čomu je zapojený do modulácie tvaru a funkcie cytoskeletu v bunkách. Jeho regulačná podjednotka p80 cieľi na mikrotubuly zatiaľ čo katalytická podjednotka p60 ich oddeľuje. Mitogénom aktivované proteín kinázy sú dôležité signálne proteín v rastlinách a sprostredkujú odpovede na biotický aj abiotický stres. Zároveň sú zapojené do vývojových procesov a taktiež sú asociujú s cytoskeletom. Táto bakalárska práca sa venovala overovaniu protokolov pre tranzientnú transformáciu epidermálnych buniek *Allium cepa* sprostredkovanú *Agrobacterium thumefaciens* za cieľom mikroskopického pozorovania. Ďalej bol za cieľ izolácia genomickú DNA a RNA s následným prepisom do cDNA z *Medicago sativa*. Metódou YFP-split boli transformované epidermálne bunky *Nicotiana benthamiana* pričom bola sledovaná interakcia MPK4 a katanínu a ich následná kolokalizácia s cytoskeletom.

Kľúčové slová *Arabidopsis thaliana*, *Medicago sativa*, katanin, cytoskelet, MAPK kinázy, MPK4

Počet strán 46

Počet príloh 0

Jazyk Slovenský

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Šimon Vaško
Title	Interaction of MAPK cascades and katanin in alfalfa
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Biotechnology
Supervisor	Mgr. Ivan Luptovčia, Ph.D.
The year of presentation	2023

### Abstract

Katanin is a heterodimeric protein that has the ability to sever microtubules, making it involved in the modulation of the shape and function of the cytoskeleton in cells. Its regulatory subunit p80 targets microtubules, while the catalytic subunit p60 severs them. Mitogen-activated protein kinases are important signaling proteins in plants that mediate responses to biotic and abiotic stresses. They are also involved in developmental processes and are associated with the cytoskeleton. This bachelor's thesis was dedicated to verifying protocols for the transient transformation of *Allium cepa* epidermal cells mediated by *Agrobacterium thumefaciens* for microscopic observation. Additionally, the goal was to isolate genomic DNA and RNA from *Medicago sativa* and transcribe it into cDNA. Using the YFP-split method, *Nicotiana benthamiana* epidermal cells were transformed, and the interaction between MPK4 and katanin and their subsequent colocalization with the cytoskeleton were observed.

Keywords	<i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Medicago sativa</i> , katanin, cytoskeleton, MAPK kinases, MPK4,
Number of pages	46
Number of appendices	0
Language	Slovak

# Obsah

1	Úvod .....	1
2	Teoretický úvod .....	3
2.1	Všeobecná charakteristika mitogénom aktivovaných proteín kinázy .....	3
2.1.1	Subcelulárna lokalizácia MAPK .....	4
2.1.2	Mitogénom aktivované proteín kinázy vo vývoji rastlín .....	5
2.2	Mitogénom aktivované proteín kinázy v lucerne siatej ( <i>Medicago sativa</i> ) .....	6
2.2.1	Stresom aktivovaná MAPK (SIMK) a stresom aktivovaná MAPKK (SIMKK) .....	6
2.3	Mitogénom aktivované proteín kinázy v <i>A. thaliana</i> .....	7
2.3.1	MPK4 .....	7
2.3.2	MPK6 .....	7
2.3.3	MPK3 .....	8
2.4	Cytoskelet .....	9
2.4.1	Mikrotubuly .....	10
2.4.2	Aktínové filamenty .....	13
2.5	Všeobecná charakteristika katanínu .....	13
2.5.1	Charakteristika katanínu pri <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	14
2.5.2	Funkcie Katanínu .....	14
3	Experimentálna časť .....	17
3.1	Materiály .....	17
3.1.1	Použité chemikálie .....	17
3.1.2	Použité prístroje .....	18
3.1.3	Roztoky a média .....	19
3.1.4	Biologický materiál .....	20
3.1.5	Plazmidy a konštrukty .....	20
3.2	Metódy .....	21

3.2.1	Tranzientná transformácia.....	21
3.2.2	Izolácia génovej DNA metódou CTAB.....	23
3.2.3	Izolácia RNA (Trizol).....	23
3.2.4	PCR overenie izolovanej gDNA.....	24
3.2.5	Prepis RNA na cDNA.....	24
3.2.6	Overenie cDNA pomocou PCR reakcie.....	24
3.2.7	Separácia DNA v 1% agarózovom gély.....	25
3.2.8	In silico analýzy.....	25
4	Výsledky.....	27
4.1	Izolácia genomickej DNA.....	27
4.2	Prepis RNA do cDNA.....	28
4.3	Tranzientná transformácia <i>N. benthamiana</i> .....	29
4.4	Tranzientná transformácia <i>A. cepa</i> .....	32
5	Diskusia.....	34
6	Záver.....	37
7	Zoznam skratiek.....	39
8	Referencie.....	40

## Ciele práce

Cieľom bakalárskej práce je zvládnutie práce s odbornou (anglickou) literatúrou a jej následné spracovanie do rešerše na danú problematiku. Ďalej sa bakalárska práca bude zaoberať experimentmi zameranými na potvrdenie interakcie katanínu a MAPK kaskád v lucerne siatej (*Medicago sativa* L.)

V rámci teoretickej časti bude vypracovaná rešerša zameraná na problematiku:

1. Prehľad publikácií o mitogénom aktivovaných proteín kinázach v *M. sativa* a ich ortológoch *M. truncatula*, *A. thaliana*. Prehľad signálnych dráh MAPK so zameraním na SIMK, SAMK a MMK2 pri vývine a odpovedi na stres a tiež v súvislosti s reguláciou cytoskeletu
2. Prehľad publikácií o proteíne katanín p60 (katalytická funkcia, AtKTN1) a tiež p80 (regulačné funkcie, 4 podjednotky) v *Arabidopsis thaliana* a tiež o jeho ortológoch najmä v *M. sativa* a *M. truncatula*. Tiež prehľad o ďalších MAPs a ich rolách v regulácii cytoskeletu

Praktická časť bakalárskej práce bude zameraná na:

1. Tranzientná transformácia listov *Nicotiana benthamiana*, následné analýzy a interakcie MPK4 a Katanínu p60 pomocou metódy Bimolekulárna fluorescenčná komplementácia ( Bimolecular Fluorescence Complementation, BiFC).
2. Overovanie protokolov pre tranzientnú transformáciu *Allium cepa* sprostredkovanú *Agrobacterium tumefaciens*.
3. Izolácia gDNA a RNA z *M. sativa* a následný prepis RNA do cDNA, izolácia génov *KTNp60* a *MMK2*



# 1 Úvod

Mitogénom aktivované proteín kinázy (MAPK) sú dôležité signálne molekuly obzvlášť v rastlinách. Rastliny sú sesílné organizmy, vďaka čomu sa u nich evolučne vyvinuli veľmi efektívne prostriedky pre účinné odolávanie nepriaznivým podmienkam či už ide o abiotické či biotické faktory. Avšak účinnú schopnosť obrany podmieňuje rýchle sprostredkovanie informácie o určitom stresovom faktore. MAPK majú nezastupiteľnú úlohu v tejto signalizácii. Okrem iného MAPK zohrávajú taktiež kľúčové úlohy vo vývoji rastlín. MAPK sú zoskupené v hierarchickom usporiadaní, tieto zoskupené moduly sú ukotvené v takzvaných „scaffold“ proteínoch. Prvotný stimul býva zachytený membránovými receptormi. Následná signalizácia je prenesená prostredníctvom fosforylácie kedy je ako prvá fosforylovaná MAP kináza kináza kináza, ktorá ďalej fosforyluje MAP kinázu kinázu a tá nakoniec fosforyluje MAP kinázu. MAPK cieľa na koncové proteíny, ktoré môžu byť aktivované fosforyláciu buď priamo, alebo nepriamo prostredníctvom fosforylácie transkripčných faktorov, ktoré ovplyvňujú produkciu alebo reguláciu daných proteínov. MAPK taktiež interagujú s proteínmi, ktoré ovplyvňujú cytoskelet buniek. Jedným z príkladom týchto proteínov je Katanín.

Katanín je heterodimér tvorený dvomi podjednotkami a to katalytickou s označením p60 a regulačnou podjednotkou p80. Tento proteín patrí do skupiny proteínov s označením ATPázy. Katanín priamo ovplyvňuje cytoskelet, prostredníctvom oddeľovania mikrotubulov, energiu získava hydrolýzou ATP. Vzhľadom na túto jeho funkciu zohráva dôležitú úlohu pri vývine rastlín a je priamo zapojený do cytokynézy. Podieľa sa na tvorbe mitotického vretienka. Ďalej je zapojený do organizácie mikrotubulov a ukladaniu celulózy v bunkách. Mutácie v tomto proteíne vedú ku výrazným defektom vo fenotype. Rastliny majú zakrpanený vzrast, ktorý je sprevádzaný nepravidelným usporiadaním mikrotubulov čo vedie ku nepravidelnému deleniu buniek.

V rámci tejto bakalárskej práce bude skúmaná interakcia medzi AtMPK4 a AtKTN1 prostredníctvom YFP-splitu a následne mikroskopické pozorovanie v listoch *N. benthamiana*. Ďalej bude cieľom overenie protokolov pre tranzientnú transformáciu

epidermálnych buniek *A. cepa* za cieľov zlepšenia kvality mikroskopického pozorovania.

## 2 Teoretický úvod

### 2.1 Všeobecná charakteristika mitogénom aktivovaných proteín kinázy

Mitogénom aktivované proteín kinázy (MAPK alebo MPK) patria do jednej z najväčších skupín transferáz, ktoré katalyzujú fosforyláciu vhodných proteínových substrátov na serínových alebo treonínových zvyškoch (Jagodzik *et al.*, 2018). Jedná sa o sofistikované multienzymové komplexy, ktoré sú evolučne vysoko konzervované. Nachádzajú sa vo všetkých eukaryotách a hrajú dôležitú úlohu v procesoch adaptácie (Colcombet a Hirt, 2008; Rodriguez *et al.*, 2010; Smékalová *et al.*, 2014). Podieľajú sa aj na hormonálnych a stresových odpovediach (Sinha *et al.*, 2011; Liu, 2012; Smékalová *et al.*, 2014), ďalej na raste, regulácii bunkového delenia, diferenciácie a programovej bunkovej smrti (Franklin-Tong a Gourlay, 2008; Müller *et al.*, 2010; Sasabe a Machida, 2012; Smékalová *et al.*, 2014). Taktiež sa podieľajú na patogénnych a symbiotických interakciách (Rasmussen *et al.*, 2012; Tena *et al.*, 2011; Smékalová *et al.*, 2014). MAPK sa skladajú z vrstiev signalizačných kaskád pričom pozostávajú z hierarchicky usporiadaných sekvenčne aktivovaných proteínkináz, a to z mitogénom aktivovanej proteín kinázy kinázy kinázy (MAPKKK, MAP3K alebo MEK), mitogénom aktivovanej proteín kinázy kinázy (MAPKK, MAP2K alebo MKK) a MAPK (Komis *et al.*, 2018).

Prvým krokom pri prenose signálu je aktivácia MAPKKK alebo MAPKKKK cez stimuláciu plazmatických membránových receptorov. MAPKKK následne aktivuje podradenú „downstream“ MAPKK, ktorú fosforyluje na jej dvoch treonínových alebo serínových zvyškoch. MAPKK sa ďalej správa ako kináza s dvojitou špecificitou. Následne dochádza ku fosforylácii MAPK na tyrozínovom a treonínovom zvyšku v motíve T-X-Y, pričom X je ľubovoľná aminokyselina, motív T-X-Y sa nachádza medzi subdoménami VII a VIII jej katalytickej podjednotky (Rodriguez *et al.*, 2010; Hettenhausen *et al.*, 2014; Bigeard a Hirt 2018). MAPK fosforylujú rôzne substráty v cytoplazme alebo v jadre vrátane iných kináz, cytoplazmatických proteínov, efektorových proteínov, enzýmov alebo transkripčných faktorov (Khokhlatchev *et al.*, 1998; Rodriguez *et al.*, 2010; Bigeard a Hirt, 2018).

Rastliny sú pevne zakorenené v zemi, čo im zabraňuje uniknúť pred nepriaznivými podmienkami na rozdiel od živočíchov . Vzhľadom na to sú pre nich

klúčové rýchle odpovede na stresové podmienky. Rastlinné gény kvôli tomu kódujú značné množstvo proteín kináz. Predpokladá sa že Arábkovka Thalova (*Arabidopsis thaliana*) a ryža siata (*Oryza sativa*) kódujú približne 1000 a 1400 génov, pričom *Homo sapiens* a *Saccharomyces cerevisiae* kódujú približne 500 a 120 proteín kináz (The Arabidopsis-Genome-Initiative, 2000; Lander *et al.*, 2001; Venter *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2003; Dardick *et al.*, 2007; Bigeard a Hirt 2018). Medzi ktoré patria aj MAPK. V *A. thaliana* je prítomných 60 MAPKKK, 20 MAPK a 10 MAPKK (MAPK-Group, 2002).

MAPK v rastlinách boli klasifikované do štyroch fylogenetických skupín, s označením A – D (MAPK – Group 2002). Tie sú charakterizované konzervovaným konsenzuálnym motívom TxY v ich aktivačnej slučke, T-loop (Anderson *et al.*, 1990; Payne *et al.*, 1991; MAPK-Group, 2002). Na základe porovnávania sekvencií tohto motívu boli klasifikované MAPK do dvoch podtypov. Prvý podtyp TEY tvorí skupiny A, B a C, druhý podtyp TDY tvorí vzdialenejšiu skupinu D (Bigeard a Hirt 2018). Skupiny A, B a C obsahujú vo svojej C-terminálnej oblasti aj doménu CD tá je dokovacím (väzobným) miestom pre MAPKK, MAPK fosfatázy a substráty (Tanoue *et al.*, 2000). Na druhej strane väčšina MAPKK, MAPK fosfatáz a substrátov obsahuje domnelé dokovacie miesto MAPK, D-site, ktoré viaže MAPK CD doménu (Bardwell a Thorner, 1996; MAPK-Group, 2002; Bardwell, 2006; Bigeard a Hirt 2018).

### 2.1.1 Subcelulárna lokalizácia MAPK

MAPK kinázy môžu mať rôznu subcelulárnu lokalizáciu. Príkladom sú: AtMPK3, ktorá sa nachádza v cytosole, v jadre a je tiež spojovaná s membránami (Ahlfors *et al.*, 2004; Brock *et al.*, 2010; Umbrasaite *et al.*, 2010; Maldonado-Bonilla *et al.*, 2013; Persak a Pitzschke, 2013; Pitzschke *et al.*, 2014; Bigeard and Hirt 2018), ďalej AtMPK4 bola identifikovaná v plazmatickej membráne, jadre, cytosole, bunkovej prepážke „cell plate“ a v mikrotubuloch (Schweighofer *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2008; Brock *et al.*, 2010; Kosetsu *et al.*, 2010; Umbrasaite *et al.*, 2007; Beck *et al.*, 2011; Bigeard a Hirt 2018). Ďalším príkladom je AtMPK6, ktorá sa nachádza v cytosole, jadre a na mitotických mikrotubuloch a zároveň na sekrečných vezikulách Golgiho aparátu (Ahlfors *et al.*, 2004; Schweighofer *et al.*, 2007; Yoo *et al.*, 2008; Brock *et al.*, 2010; Muller *et al.*, 2010; Umbrasaite *et al.*, 2010; Maldonado-Bonilla *et al.*, 2013; Persak a Pitzschke, 2013; Sethi a kol., 2014; Brock *et al.*, 2010; Bigeard a Hirt 2018).

Taktiež sa v jadrách môžu vyskytovať aj MAPK vyššej úrovne. Ako napríklad AtMKK4 sa vyskytuje v jadre aj v cytosole (Yoo *et al.*, 2008; Persak a Pitzschke, 2013; Bigeard a Hirt 2018) a AtMEKK1 sa nachádza v jadre, v cytosole, na plazmatickej membráne a v štruktúrach podobných vezikulám (Miao *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2010; Bigeard a Hirt 2018).

### 2.1.2 Mitogénom aktivované proteín kinázy vo vývoji rastlín

Vývoj, tvar a veľkosť vegetatívnych výhonkov rastlín sú do značnej miery ovplyvňované aktivitou MAPK kaskád, ako v optimálnych podmienkach rastu, tak aj v prítomnosti environmentálnych záťaží a hormonálnej signalizácii (Komis *et al.*, 2018). Vhodným príkladom sú fenotypy knock out mutantov *mpk6*, ktoré vykazujú variabilné fenotypy koreňov (López-Bucio *et al.*, 2014; Müller *et al.*, 2010) a zároveň sú sprevádzané aberantnou rovinou delenia (Müller *et al.*, 2010).

Stavba koreňa je podmienená anizotropickým rastom buniek, ten je riadený priečnou orientáciou kortikálnych mikrotubulov a príslušnou orientáciou mikrofibríl, ktoré sú uložené v prekrývajúcich sa bunkových stenách (Komis *et al.*, 2018). Dvojitý mutanti *anp2* a *anp3* vykazujú defekty v morfológii koreňa čo je spôsobené absenciou oboch kínaz ANP2 aj ANP3 (*Arabidopsis* homolog of nucleus and phragmoplast associated protein kinase 2 and 3, homológna proteín kináza spojená z jadrom a fragmoplastom 2 a 3, ANP2, ANP3), zároveň vykazuje podobnú morfológiu koreňa aj mutant *mpk4* (Beck *et al.*, 2010). Mutant *mpk4* má aj nadmerne zväzované mikrotubuly, táto abnormálna organizácia mikrotubulov spôsobuje „opuchy“ buniek koreňa, hypokotylu a listov. (Beck *et al.*, 2010).

Aktivita MAPK kaskád ovplyvňuje morfológiu listov prostredníctvom neúplnej dráhy, ktorá zahŕňa MKK2 a MPK10, pričom sa ich expresia zhoduje s miestami s maximálnou koncentráciou auxínu vo vyvíjajúcom sa liste (Stanko *et al.*, 2014). Do procesu senescencie listov je u *A. thaliana* zapojená kaskáda MKK9/MPK6, táto kaskáde negatívne reguluje inhibítor (BCL2-associated X protein1, proteín X 1 spojený s BCL2, BAX-1) (Yue *et al.*, 2014). Ďalšia predpokladaná dráha senescencie listov prostredníctvom kyseliny abcisovej (ABA) zahŕňa tieto proteín kinázy MAPKKK18, MKK3, MPK1, MPK2 a MPK7 (Matsuoka *et al.*, 2016).

## 2.2 Mitogénom aktívované proteín kinázy v lucerne siatej (*Medicago sativa*)

Zistilo sa, že stresom indukovaná MAP kináza s názvom SIMK (stress induced MAPK) v *M. sativa* môže byť aktívovaná bakteriálnym a hubovým elicitorom. V štúdií boli bunky *M. sativa* ošetrované elicitorom z bunkovej steny kvasiniek, následne sa zistili rýchlo a prechodne aktívované 44-kDa a 46-kDa MAPK. Následne imunokinázové testy ukázali hlavnú aktiváciu 46-kDa SIMK a 44-kDa MMK3, simultánne boli ajv menšom rozsahu aktívované 44-kDa MMK2 a SAMK (Cardinale *et al.*, 2000).

Vystavenie nízkym teplotám aktivuje p44MMK4, ktorá dokáže výrazne zvýšiť toleranciu voči chladu a zároveň aj toleranciu voči suchu, jej pôsobenie je nezávisle od ABA (Jonak *et al.*, 2004). Do reakcie na stres vyvolaný zmenou teploty je zapojená kináza SAMK a to prostredníctvom jej interakcie s proteínom (heat shock-activated MAPK, teplom aktívovaná MAPK, HAMK) (Sangwan *et al.*, 2002).

Vystavenie vysokým hladinám Cu alebo Cd, aktivovalo štyri rôzne kinázy a to SIMK, MMK2, MMK3 a SAMK. Štúdie kinetiky kinázovej aktivácie ukázali rýchlu aktiváciu SIMK, MMK2, MMK3 a SAMK po vystavení  $\text{Cu}^{2+}$  iónov zatiaľ čo ióny  $\text{Cd}^{2+}$  vyvolávajú oneskorenú reakciu (Jonak *et al.*, 2004).

### 2.2.1 Stresom aktívovaná MAPK (SIMK) a stresom aktívovaná MAPKK (SIMKK)

SIMK (ortológ AtMPK6) bola identifikovaná pri *M. sativa* ako elicitorom a soľným stresom indukovaná MAPK (Munnik *et al.*, 1999; Cardinale *et al.*, 2000; Ovečka *et al.*, 2014), Aktivačné štúdie *in vivo* a *in vitro* pomocou kvasinkového dvojhybridného testu identifikovali SIMKK ako upstream aktivátor SIMK. Ďalej sa ukázalo, že SIMKK aktivuje SIMK aj v reakcii na soľný stres (Munnik *et al.*, 1999; Cardinale *et al.*, 2000; Ovečka *et al.*, 2014).

Pokiaľ je SIMKK a SIMK v neaktívnom stave, sú kolokalizované v cytoplazme a v jadre. Po aktivácii dochádza k presunu väčšej časti z jadra do cytoplazmatických kompartmentov (Ovečka *et al.*, 2014). SIMK bola tiež lokalizovaná v jadrách a meristematických bunkách koreňových vláskov. Ďalšie výsledky ukázali, že je exprimovaná aj v koreňových vláskoch. Pri tvorbe koreňových vláskov a ich vydutín (root hair bulges) sa SIMK polárne premiestňuje z jadier smerom k “bulge“ doménam (oblasti v mieste vydutín) trichloblastov a k špičkám rastúcich koreňových vláskov. Zároveň je umiestnená v špičkách koreňových vláskov, stabilizácia a depolymerizácia

F-aktínu aktivuje SIMK (Šamaj *et al.*, 2003). To naznačuje, že jej aktivita je spojená nielen s aktínovým cytoskeletom, ale aj to že je priamo ovplyvnená zmenou dynamiky F-aktínu. Na základe vyššie spomenutých údajov je SIMK zapojená do rastu špičiek koreňových vláskov, ktorý spája signalizáciu MAPK s aktínovým cytoskeletom (Šamaj *et al.*, 2003).

### **2.3 Mitogénom aktivované proteín kinázy v *A. thaliana***

V tejto časti rešerše budú uvedené niektoré MAPK, ktoré boli nájdené v *Arabidopsis thaliana* a ich funkcie. A to najmä na MPK3, MPK4 a MPK6, zároveň sa jedná o najviac študované MAPK v *A. thaliana*.

#### **2.3.1 MPK4**

MPK4 sa podieľa nezávisle vo vrodenných imunitných odpovediach, na oxidatívnom strese a v regulácii organizácie kortikálnych mikrotubulov a cytokinéze (Pitzschke *et al.*, 2009; Kong *et al.*, 2012; Beck *et al.*, 2010; Beck *et al.*, 2011). Zároveň je zacielená na viaceré substráty. Jedným z nich je MAP kinase substrate 1 (MKS1) (Andreasson *et al.*, 2005), ten je potrebný na úplnú rezistenciu závislú od kyseliny salicylovej (salicylic acid, SA). MKS1 ďalej interaguje s transkripčnými faktormi WRKY25 a WRKY33, ktoré sú nevyhnutné v obrane rastlín proti abiotickému stresu (Bigeard a Hirt, 2018). MPK4 fosforyluje PAT1, ktorá je zapojená do mechanizmu zodpovedného za oddeľovanie mRNA (decapping machinery) (Bigeard a Hirt, 2018).

MPK4 je zapojená do organizácie cytoskeletu a cytokinézy prostredníctvom niekoľkých proteínov. ANP2/ANP3 a MPK4 spolu cieľia na proteíny spojené s mikrotubulami (microtubules-associated proteins, MAPs) a to konkrétne na MAP65-1. Vzhľadom na tento cieľ, vykazujú mutantné línie *mpk4* zreteľne abnormálny fenotyp (Beck *et al.*, 2010). Ďalej MPK4 fosforyluje proteíny (IQ67-Domain proteins, proteíny s doménou IQ67, IQD) IQD31 a IQD32, pričom oba tieto proteíny patria do skupiny MAP, zároveň sú niektoré proteíny zo skupiny IQD zapojené do bazálnej obrannej imunitnej odpovedi (Rayapuram *et al.*, 2018). MPK4 bola lokalizovaná na bunkových doštičkách (cell plate), v koreňových vláskoch (Kosetsu *et al.*, 2010).

#### **2.3.2 MPK6**

MPK6 je aktivovaná etylénom, zvýšená hladina etylénu môže byť spôsobená bičikovým peptidom flg22 (fragment of bacteria flagellin), ktorý rýchlo indukuje jeho

tvorbu (Ouaked *et al.*, 2003; Bigeard a Hirt, 2018). Proces môže byť sprostredkovaný pomocou MKK9, čo vedie k fosforylácii závislej od MAPK a aktivácii transkripčného faktora EIN3 (Yoo *et al.*, 2008; Bigeard a Hirt, 2018). Zároveň MAPK priamo regulujú produkciu etylénu prostredníctvom interakcie s (1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthetase, 1-aminocyklopropán-1-karboxylát syntetáza, ACS)ACS7, ACS8 a ACS11, ACS sú kľúčové enzýmy v produkcii etylénu. Pričom transkripcia môže byť sprostredkovaná cez aktiváciu transkripčných faktorov WRKY33, ktoré sú aktivované cez MPK3/6 (Mao *et al.*, 2011; Bigeard a Hirt, 2018).

Zdá sa, že MPK6 je tiež zapojená do vývoja cytoskeletu. Ukázalo sa, že MPK6 cieľi na proteín VILLIN3, ktorý sa podieľa na zväzovaní aktínových vlákien, keďže táto schopnosť bola ovplyvnená v mutantnej línii *mpk6*, okrem toho nebol prítomný ani peptid obsahujúci S415 TPX2/WDL5, ktorý sa podieľa na organizácii vretenového aparátu (Rayapuram *et al.*, 2018; Vos *et al.*, 2008). Ďalej sa MPK6 spája s  $\gamma$ -tubulínom čo naznačuje, že má úlohu v procesoch nukleácie mikrotubulov (Kohoutová *et al.*, 2015).

Pri napadnutí patogén rastliny menia svoj metabolizmus. MPK6 cieľi na niekoľko kľúčových enzýmov vrátane enzýmov v metabolizme uhlíku ako napríklad 3-fosfoglycerát dehydrogenáza sacharóza fosfát syntáza 1F a fosfoenolpyruvát karboxykináza (Rayapuram *et al.*, 2018). Taktiež treba spomenúť tri pravdepodobné priame ciele MPK6, ktoré majú zvýšenú reguláciu pri reakcii na flg22, ktoré sú Varicose (proteín interagujúci s aktínom) a proteíny s neznámou funkciou, ktoré sú kódované na lokusoch AT5G43830 a AT3G03570, tieto zistenia predstavujú ďalšie možné substráty pri odpovedi na abiotický stres (Rayapuram *et al.*, 2018). Zároveň je MPK6 spojená s duálne špecifickou fosfatázou MKP1, ktorá reguluje aktivačné úrovne ostatných MAPK a je dôležitým regulátorom odpovede na biotický a abiotický stres (Anderson *et al.*, 2008; Vos *et al.*, 2008).

### 2.3.3 MPK3

MPK3 je okrem iného zacielená aj na AZI1, ktorý sa podieľa na odpovedi na stres zo zasolenia. Jedná sa o hybridný proteín bohatý na prolín, ktorý súvisí slipidovým transferovým proteínom. MPK3/6 reguluje dráhu spojenú s multivezikulárnymi telieskami (Multivesicular bodies, MVBs) prostredníctvom fosforylácie LIP5, čo je AAA ATPasa v MVB biogenéze a pozitívny regulátor SKD1 (Suppressor of K+



Transport Growth Defect1), a hrá kritickú úlohu v odpovedi na biotický a abiotický stres (Bigeard a Hirt, 2018). Zistilo sa, že MPK3 a MPK6 pôsobia s nadradenou „upstream“ MAPKKK YODA a majú rozhodujúcu úlohu pri tvorbe, vzorovaní a počte prieduchov. Na druhej strane mutantné línie, ktorým chýbala MAPKKK YODA mali množstvo prieduchov. Avšak dvojité RNAi mutanti, kde boli umlčané gény *mpk3* a *mpk6* vykazovali združené stomátálne vzory, čo naznačuje defekty v špecifikácii prieduchov a v dlaždicových bunkách (Wang *et al.*, 2007). drahá MKK7-MPK6 fosforyláciou downstream cieľového proteínu PIN1 ovplyvňujú tvorbu výhonkov, avšak dráha MKK7-MPK3 je zapojená do regulácie vývoju listov (Jia *et al.*, 2016)

## 2.4 Cytoskelet

Cytoskelet udržiava bunkovú štruktúru, obmedzuje difúziu membránových proteínov a organizuje bunkové kompartmenty (Fletcher *et al.*, 2010). Okrem týchto funkcií cytoskelet vytvára koordinované sily, ktoré sú potrebné pre mnohé morfológické procesy počas vývoja a fungujú ako cesta pre vezikulový transport (Wang *et al.*, 2017). Biochemicky a fyzicky prepája bunky s vonkajším prostredím a vďaka tomu ho je možné považovať za senzor vývojových a environmentálnych signálov (Peter Nick 2013), ako napríklad modulácia kortikálneho cytoskeletu pomáha bunkám odolávať stresu zo sucha, reguluje predlžovanie hypokotylu v reakcii na svetlo a podieľa sa na etylénom indukovanej inhibícii predlžovania koreňov (Liu *et al.*, 2013).

Rastlinný cytoskelet je zložený z mikrotubulov a aktínových filament (F-aktín), vďaka čomu je dynamickou a adaptívnou štruktúrou. Fyzické spojenia medzi mikrotubulmi alebo F-aktínom vytvárajú vyššie štruktúry ako napríklad ortogonálne siete a zväzky (Dixit *et al.*, 2013). F-aktín podlieha procesu volajúceho sa „treadmilling“, pri tomto procese sa monoméne podjednotky jedného mikrotubulu alebo aktínového filamentu pridávajú na rýchlo rastúci koniec (plus koniec) a zároveň sa strácajú z pomaly rastúceho konca (mínus koniec) (Fletcher *et al.*, 2010). Jednotlivé mikrotubuly striedavo rastú a zmršťujú sa pričom rastúce a zmršťujúce sa mikrotubuly sa vyskytujú v bunkách súčasne (Dixit *et al.*, 2013). Zároveň cytoskeletálne štruktúry v bunkách podliehajú neustálym zmenám, formujú sa alebo rozpadajú v nadväznosti na vnútorne a vonkajšie podnety (Li *et al.*, 2004).

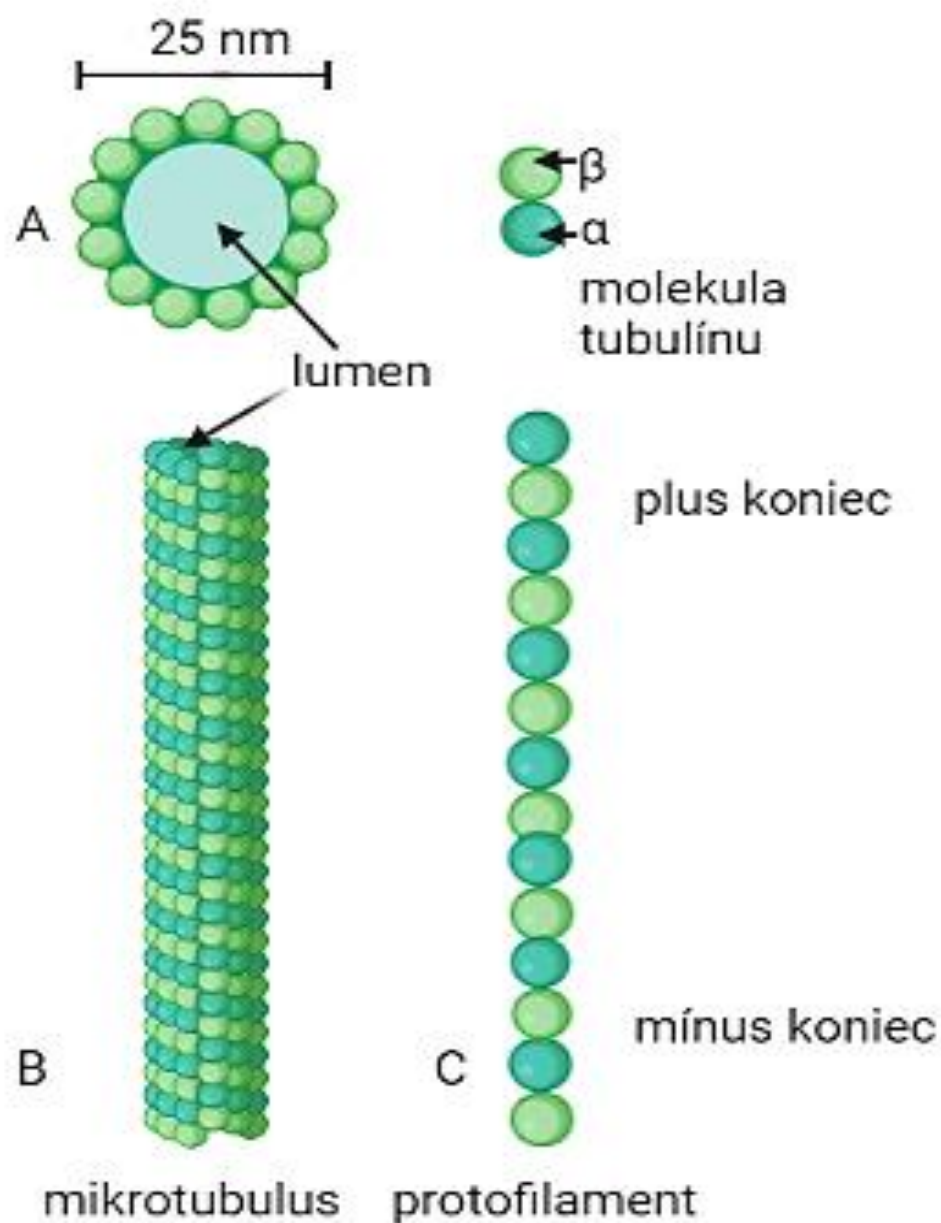
Funkcia a dynamika cytoskeletu je ovplyvnená MAP a proteínmi viažucimi aktín (actin binding protein, ABP) (Li *et al.*, 2004). Dôležité je, že biochemické dôkazy

podporujú myšlienku, že tieto proteíny sú kľúčovými prenášačmi informácii, pričom ich aktivita a hladiny sú presne kontrolované v rôznych fyziologických procesoch čo má za následok rýchle a adaptívne zmeny v cytoskelete (Lian *et al.*, 2021)

#### 2.4.1 Mikrotubuly

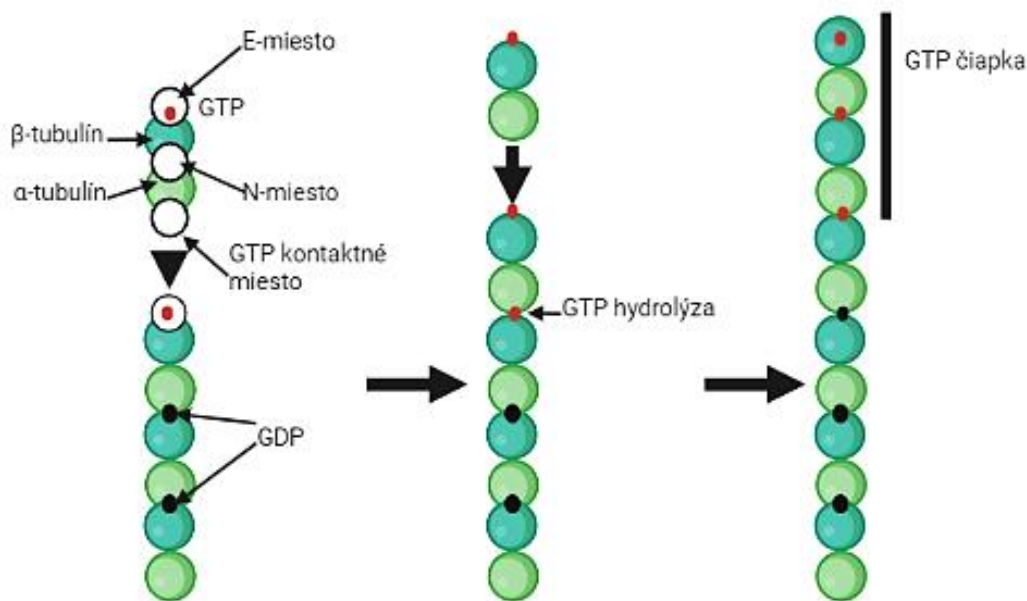
Mikrotubuly (MT) majú v eukaryotných bunkách zásadnú organizačnú funkciu. Majú tvar dlhých, pomerne málo ohybných dutých trubíc a ich vonkajší priemer je 25 nm, ktoré sa môžu rýchlo rozpadat' na jednom mieste a zase rýchlo vystavat' na inom mieste (Alberts *et al.*, 1998). Celý systém cytoplazmatických mikrotubulov je súčasťou cytoskeletu a jeho hlavnou úlohou je určovanie pozície membránových bunecných organel a riadenie transportu vo vnútri bunky.

MT sú tvorené z podjednotiek, ktoré pozostávajú s molekúl tubulínu, pričom každá podjednotka je dimér dvoch veľmi podobných globulárných proteínov, nazývaných  $\alpha$ -tubulín a  $\beta$ -tubulín, a sú spojené pevnými nekovalentnými väzbami. Tubulínové podjednotky sa navzájom spájajú a vytvárajú steny dutého cylindrického mikrotubulu. Každý cylinder pritom obsahuje 13 paralelných protofilament, každý protofilament je tvorený reťazcom tubulínových podjednotiek, v ktorom sa postupne striedajú  $\alpha$ -tubulín a  $\beta$ -tubulín (Alberts *et al.*, 1998). Vďaka tejto stavbe má každý protofilament polárnu štruktúru, s  $\alpha$ -tubulín na jednom konci a  $\beta$ -tubulín na konci druhom. Jeden koniec mikrotubulu na ktorom vyčnievajú  $\alpha$ -tubulínové podjednotky sa nazýva mínus koniec a druhý s koniec na ktorom vyčnievajú  $\beta$ -tubulínové podjednotky sa nazýva plus koniec (Alberts *et al.*, 1998). Každá podjednotka tubulínu viaže jednu molekulu GTP, heterodimérna podjednotka  $\alpha\beta$ -tubulínu má naviazané GTP na dvoch miestach. Miesto N v  $\alpha$ -tubulíne je umiestené vo vnútri tubulínového diméru, (vďaka čomu sa táto molekula GTP nehydrolyzuje a jej úloha spočíva v štruktúrnom zapojení (Takashi Hashimoto 2015). Druhé väzobné miesto pre GTP je na E mieste, ktoré sa nachádza na  $\beta$ -tubulíne a je umiestené na jeho povrchu, rovnako sa nachádza aj na povrchu plusového konca už existujúceho mikrotubulu (Takashi Hashimoto 2015).



Obrázok 1 Schematické zobrazenie mikrotubulu. A) 13 molekúl protofilamentu tvoriace mikrotubul zobrazené v priečnom reze. B) Bočný pohľad na úsek mikrotubulu. C) protofilament zložený s opakujúcich sa podjednotiek alfa/beta tubulínu. (Upravené podľa Alberts et al., 1998, kreslené v BioRender.com)

Tubulínové heterodiméry sa prednostne pridávajú na plus koniec, po pridaný tubulínového diméru k rastúcemu plus koncu, podjednotka  $\alpha$ -tubulínu interaguje s GTP na mieste E koncovej podjednotky  $\beta$ -tubulínu, čo má za následok hydrolyzu GTP (Takashi Hashimoto 2015). Keďže sa GTP-tubulínové podjednotky pevne viažu k sebe, čo má za následok vznik GTP-čiapčky, ktorá má schopnosť zabrániť depolymerizácii mikrotubulu (Alberts *et al.*, 1998). Avšak keď je rast mikrotubulu pomalý môže dôjsť k hydrolyze GTP skôr ako je naviazaný nový tubulínový dimér, ktorý nesie GTP, v tomto prípade dôjde k strate GTP-čiapčky a dochádza k uvoľňovaniu GDP-tubulínových podjednotiek, čo vedie k skracovaniu mikrotubulu (Alberts *et al.*, 1998), tento dej je nazývaný aj katastrofa (z anj catastrophe), ak sa GTP čiapčka obnoví a mikrotubul začne opäť rásť, v tomto prípade sa tento dej nazýva záchrana (z anj rescue) (Takashi Hashimoto 2015).



Obrázok 2 Schématické zobrazenie tvorby GTP čiapčky na jednom protofilamente. GTP viazaný na  $\beta$ -tubulíne v jeho E mieste sa hydrolyzuje na GDP, keď  $\alpha$ -tubulín v prichádzajúcom tubulínovom heterodiméri vstúpy do kontaktu s molekulou GTP. Polymerizácia spustená hydrolyzou nukleotidu vytvára malú GTP čiapčku na plus konci rastúceho MT. GDP viazané v N mieste nie je znázornené (upravené podľa Takashi Hashimoto 2015, kreslené v BioRender.com)

## 2.4.2 Aktínové filamenty

F-aktín je zložený z monomérnych alebo globulárnych aktínových podjednotiek (G-aktín), ktoré sú usporiadané do dvojvláknovej špirálovej štruktúry s priemerom 5-7 nm (Blanchoin *et al.*, 2014). G-aktín je vysoko konzervovaný proteín, ktorý má molekulovú hmotnosť 42-kDa. Na jeho povrchu sa vyskytujú dva hlavné laloky, ktoré sú oddelené štrbinou. V štrbine sú prítomné väzobné miesta pre nukleotidy a dvojmocné katióny. Pre vytvorenie nového aktínového vlákna je nevyhnutné aby prišlo k interakcii troch podjednotiek, ktoré vytvoria základ pre vznik nového vlákna (Li *et al.*, 2015).

## 2.5 Všeobecná charakteristika katanínu

Katanín je proteínový konzervovaný komplex AAA ATPázy oddeľujúci mikrotubuly (MT), bol objavený v *Xenopus laevis* (McNally a Vale, 1993). Jedná sa o heterodimér, ktorý je tvorený z katalytických p60 a regulačných p80 podjednotiek, pričom jeho oddeľovacia aktivita vyžaduje hexamerizáciu na povrchu MT (Hartman a Vale, 1999; Stoppin-Mellet *et al.*, 2007). Jeho katalytická podjednotka p60 predstavuje mikrotubulmi stimulovanú ATPázu, tá vyžaduje hydrolýzu ATP na oddelenie MT, presné načasovanie oddelenia MT zatiaľ nie je dobre pochopené, katanín sa pravdepodobne pohybuje pozdĺž mikrotubulu pred jeho samotným prerušením (Eckert *et al.*, 2012).

Faktory, ktoré môžu špecifikovať oddelenie MT, zahŕňajú tubulínové post-translačné modifikácie (Sudo a Baas, 2010), výskyt voľných tubulínových dimérov, tie môžu inhibovať aktivitu katanínu prostredníctvom ich karboxylových koncov (Bailey *et al.*, 2015;) a defekty mikrotubulovej mriežky (Davis *et al.*, 2002; Díaz-Valencia *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2017;). Podjednotka p80, ktorá má regulačnú úlohu obsahuje WD40 doménu, tá stimuluje aktivitu oddeľovania MT katalytickej podjednotky p60. Predpokladá sa, že v živočíšnych bunkách sprostredkováva zacielenie katanínu na špecifické miesta, ako centrozóm a zosilňuje väzbu na MT (McNally a Vale, 1993; Hartman *et al.*, 1998; McNally *et al.*, 2000). U rastlín podjednotka katanínu p60 postačuje na oddelenie MT (Stoppin-Mellet *et al.*, 2002). V prípade *Arabidopsis thaliana* zacielenie katanínu na špecifické miesta prerušenia MT je sprostredkované štyrmi rôznymi regulačnými podjednotkami p80 (Wang *et al.*, 2017). Štúdie, ktoré boli vykonané na mutantnej línii ryže *OsKTN80a*, preukázali, že nadmerná expresia ortológu p80 súvisí s predlžovaním buniek a defektami v bunkovom delení (Wan *et al.*, 2014;). Štvoritý mutant *ktn80.1234 A. thaliana* vykazuje trpasličí fenotyp s menšími,

okrúhlejšími tmavozelenými rozetovými listami a širšími a kratšími stonkami v porovnaní s (wild type, divoký typ, WT). Fenotypovo je mutantná línia *A.thaliana ktnt80.1234* podobná mutantnej línii *A.thaliana leu1* (Wang *et al.*, 2017). Pozorovanie epidermálnych buniek listov štvoritého mutantu *ktn80.1234* odhalilo zložitejšiu sieť MT s ohnutými a dlhými MT pri vyššej hustote ako pri divokom type (Wang *et al.*, 2017). Organizácia MT pripomínala pozorovania mutantných línii *fra2*, *leu1* a *bot1* pričom tieto mutanty majú absenciu KTN1 p60 (Burk *et al.*, 2001; Bouquin *et al.*, 2003.; Wightman *et al.*, 2013).

Experimenty s ľudským katanínom p60 ukázali väzobnú a oddeľovaciu doménu, ktorá sa nachádza na N-koncovej oblasti. Prvých 29 aminokyselinových zvyškov je potrebných na spojenie s podjednotkou p80 (McNally *et al.*, 2000; Burk *et al.*, 2007). Štúdie na kataníne p80 ukázali, že doména WD40 má úlohu zacielenia katanínu na centrozóme (McNally *et al.*, 1996; Burk *et al.*, 2007) a C-terminálna polovica proteínu sprostredkováva interakciu s podjednotkou p60 (McNally *et al.*, 1998; Burk *et al.*, 2007).

### **2.5.1 Charakteristika katanínu pri *Arabidopsis thaliana***

Prvý identifikovaný rastlinný homológ živočíšneho katanínu p60 bol objavený v rastline *Arabidopsis thaliana*. Niekoľko nezávislých skupín vedcov študovalo jeho funkcie súčasne, čo viedlo k jeho identifikácii pod rôznymi názvami ako BOTERO1 (Bichet *et al.*, 2001), AtKTN1 (Burk *et al.*, 2001), AtKSS (McClinton *et al.*, 2001), Atp60 (Stoppin-Mellet *et al.*, 2002;), ECTOPIC ROOT HAIR 3 (ERH; Webb *et al.*, 2002), FRAGILE FLOWER 2 (FRA2, Burk *et al.*, 2001) alebo LUE1 (Bouquin *et al.*, 2003). Proteín katanín sa skladá z 523 aminokyselinových zvyškov, pričom jeho molekulová hmotnosť je 57,27 kDa. V genóme *Arabidopsis thaliana* je prítomný jeden katanín p60 a štyri homológy katanínu p80 (Bouquin *et al.*, 2003; Keech *et al.*, 2010).

### **2.5.2 Funkcie Katanínu**

Ako bolo vyššie spomenuté katanín je proteín, ktorý je schopný oddeľovať MT. Výskumy ukázali, že je potrebný na počiatočné prelomenie izotropie organizácie kortikálnych MT a zároveň na ich organizáciu počas delenia buniek, zároveň je jeho ďalšou funkciou aj koordinácia rastu apikálneho meristému, meristémov výhonkov a vzniku listových primordií vo vzťahu k tlakovým mechanickým silám (Uyttewaal *et al.*, 2012). Rovnako hrá úlohu pri auxínovej signalizácii (Sassi *et al.*, 2014). Ďalej sa

podieľa na predlžovaní hypokotylových buniek, ktoré sú indukované modrým svetlom alebo auxínom (Lindeboom *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2013).

Ukázalo sa, že katanín oddeľuje vznikajúce mikrotubuly s jadrami  $\gamma$ -tubulínu a augmínu, ktoré sa rozvetvujú z existujúcich mikrotubulov (Nakamura *et al.*, 2010), ako aj mikrotubuly, ktoré sa navzájom krížia počas ich predlžovania (Wightman a Turner, 2007; Zhang *et al.*, 2016;). Táto schopnosť katanínu je dôležitá na preorientovanie kortikálnych mikrotubulov, ktoré sú indukované modrým svetlom alebo etylénom (Soga *et al.*, 2010a; Lindeboom *et al.*, 2013;), a to kvôli podpore dekonštrukcie mikrotubulov s nevhodnou orientáciou (Luptovčiak *et al.*, 2017).

### **2.5.2.1 Vplyv katanínu na organizáciu kortikálnych mikrotubulov**

V mutantných líniah *fra2*, *bot1* a *leu1* sa ukázala značná dezorganizácia kortikálnych MT v predlžujúcich sa bunkách (Bichet *et al.*, 2001; Burk *et al.*, 2001; Burk *et al.*, 2002; Bouquin *et al.*, 2003; Komorisono *et al.*, 2005; Burk *et al.*, 2007). V mutantných líniah *fra2* sa značný počet kortikálnych mikrotubulov zhromažďuje v bežných miestach v kortikálnej oblasti. Pozorované konvergujúce miesta mikrotubulov v kortikálnej oblasti naznačujú, že sa môže jednať o nukleačné miesta kortikálnych mikrotubulov, a teda mutácia *fra2* môže spôsobiť oneskorené uvoľňovanie mikrotubulov. Zároveň v tejto mutantnej línii bolo pozorované aj oneskorenie v miznutí perinukleárneho zoskupenia mikrotubulov v bunkách vyradených z bunkového delenia. (Burk *et al.*, 2001; Burk *et al.*, 2007)

Bolo dokázané, že nadmerná expresia AtKTN1 spôsobuje náhodnú fragmentáciu a depolymerizáciu kortikálnych mikrotubulov (Stoppin-Mellet *et al.*, 2006), pričom fragmentované mikrotubuly sú často organizované do hrubých zväzkov (Burk *et al.*, 2007).

### **2.5.2.2 Vplyv katanínu na ukladanie celulósových mikrofibríl a bunkovej morfogénézy**

Mutantná línia *Arabidopsis thaliana fra2* mala aberantnú orientáciu celulósových mikrofibríl v predlžujúcich sa parenchymatických bunkách v stopke rovnako ako aj vo vláknach podliehajúcich postupnému sekundárnemu zhrubnutiu bunkovej steny (Burk a Ye 2002; Burk *et al.*, 2007). Predpokladá sa, že kortikálne mikrotubuly poskytujú “stopy (tracks)” na preorientovanie ukladania celulósových mikrofibríl (Baskin, 2001). Z toho vyplýva, že dezorganizácia kortikálnych mikrotubulov v mutantnej línii *fra2*

vyvoláva poruchy v ukladaní celulóзовých mikrofibrilov. Zároveň tento jav bráni normálnej biosyntéze bunkovej steny, čo malo za následok znížené zhrubnutie bunkovej steny (Burk a Ye 2002; Burk *et al.*, 2007).

### **2.5.2.3 Vplyv katanínu na preprofázový pás v súvislosti s jeho tvorbou**

Preprofázový pás (preprophase band, predprofázový pás,)PPB, sa tvorí počas interfázy a to reštrukturalizáciou difúzneho kortikálneho mikrotubulového systému, pričom sa transformuje na široký kruh tvorený kortikálnymi mikrotubulami a následne sa progresívne zužuje. Nakoniec sa na začiatku mitózy rozkladá súčasne s rozpadom jadrového obalu (Van Damme *et al.*, 2007; Komis *et al.*, 2017).

Na základe štúdie, ktorá porovnávala bunky pri *Arabidopsis thaliana* Columbia-0 (Col-0) s bunkami mutantnej línie *ktn 1-2*, boli preukázané značné defekty na PPB. Pričom rastlinné bunky v preprofáze mutantnej línie *ktn 1-2* väčšinou vykazovali veľmi široké a často rozťahnuté PPB, ktoré malo asymetrickú organizáciu. Zároveň obsahovali priveľa predĺžených a často ohnutých mikrotubulov, ktoré boli lokalizované mimo oblasť PPB, ako aj vejárovité, široké, neusporiadané a neúplné PPB. (Komis *et al.*, 2017).



## **3 Experimentálna časť**

### **3.1 Materiály**

#### **3.1.1 Použité chemikálie**

70% a 96% etanol (Penta, Česká republika)

1 kbp Plus DNA Ladder (Invitrogen, USA)

1 M Hydroxid draselný (KOH) (Sigma Aldrich, Nemecko)

1-bróm-3-chlórpropán (Sigma-Aldrich)

50x TAE (Tris, Acetát, EDTA) (Sigma Aldrich, Nemecko)

6x loading dye (Invitrogen, USA)

Acetosyringon (3',5'-dimetoxy-4'-hydroxyacetofenon, Sigma Aldrich)

Agarosa (Sigma Aldrich, Nemecko)

BAP (Sigma Aldrich, Nemecko)

Centimónium bromid CTAB (Sigma Aldrich, Nemecko)

Destilovaná voda

DNA Gel Loading Dye, 6X (Thermo Fisher Scientific; USA)

DNase RNase free voda (Thermo Fisher Scientific, USA)

dNTPs (Thermo Fisher Scientific, USA)

Dusičnan draselný ( $\text{KNO}_3$ ) (Sigma Aldrich, Nemecko)

EDTA (Kyselina etyléndiamintetraoctová) (Sigma Aldrich, Nemecko)

Gellan Gum (AlfaAesar, USA)

Chloroform (Sigma Aldrich, Nemecko)

Kanamycin (Duchefa Biochemie, Holandsko)

LB (Luria-Bertani) medium tuhé (MO BIO laboratories)

MES monohydrát (Duchefa Biochemie)

$\text{MgCl}_2$  (Sigma-Aldrich, Nemecko)

Midori barvivo (Nippon Genetics, Nemecko)

MiliQ voda (připravená Simplicity Water Purification System, Merk, Nemecko)

Murashige and Skoog basal salt mixture (Duchefa Biochemie, Holandsko)

Phire plant Direct PCR Kit (Thermo Fisher Scientific, USA)

propan-2-ol (izopropylalkohol) (liehovar Kojetín)

Rifampicin (Duchefa Biochemie, Nizozemí)

RNasa A s koncentraciou 10 mg/ml (Fermentas)

Sacharóza (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>) (Sigma Aldrich, Nemecko)

Síran horečnatý (MgSO<sub>4</sub>) (Sigma Aldrich, Nemecko)

Tri reagent (Sigma-Aldrich)

Tris (*tris*(hydroxymethyl)aminomethan) (Sigma Aldrich, Nemecko)

Tween 20 (Sigma Aldrich, Nemecko)

### **3.1.2 Použité přístroje**

Analytické váhy (XA 110/2X, RADWAG, Česká republika)

Aparatura pre elektroforézu Wide MiniSub Cell GT (BioRad, USA)

Autokláv Sterrivap HP IL (MMM Group, Nemecko)

Automatické pipety (Eppendorf, Nemecko)

Centrifuga (Allegra 64 R, Beckman Coulter, USA)

Centrifúga/vortex Micro-Spin (Biosan)

Elektromagnetická miešачka MSH-420 (BOECO, Germany)

Epifluorescenčný mikroskop (Axio Imager M2, ZEISS)

Fytotronová komora (Weiss Gallenkamp, Nemecko)

Image Scanner III (GE Healthcare, USA)

Konfokálny mikroskop LSM 710 (Zeiss, Německo, confocal, laser, scanning, microscopy, CLSM),

Laboratórna trepačka (Orbital Shaker Incubator ES-20)

Laboratórne predvažovacie váhy (Bel Engineering)

Laboratórny Inkubátor (Labnef)

Mikrovlnná trúba (MHE21 HITACHI, Japonsko)

Molecular imager peo detekci fragmentů z gelu (Bio Rad, USA)

Mraznička LIE G 5216 513L (Liebherr Comfort, Nemecko)

NanoDrop Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA)

Orbital shaker Model 420 (ThermoForma, USA)

PCR cykler (T100 Thermal Cyclers, BioRad, USA)

pH meter PC 2700 (Eutech Instruments, USA)

Spektrofotometer Infinite M Nano (Tecan, Švajčiarsko)

Stereo zoom mikroskop (Zeiss, Nemecko)

Stolná centrifúga (Microfuge 16, Beckman Coulter, Česká republika)

Trepací inkubátor (Heidolph UNIMAX 1010)

Výborník de-ionizované vody Simplicity water purification system (Merck Millipore, USA)

Zdroj napätia pro elektroforézu (PowerPac Basic, Bio Rad, USA)

### **3.1.3 Roztoky a média**

½ MS tekuté:, 2,15 g/L MS basal salt mix, 10 g/L sacharózy, 1 g/L MES, pH 5,8  
pomocou KOH

1% agarózový gél : 1g araróza, 100 ml 1x TAE pufor

1x TE pufor: 10 mM Tris pH8, 1 mM EDTA pH 8

50x TAE: 242 g/L Tris, 57.1 g/L, 100 ml/L 0,5 M EDTA pH 8,

CTAB A: 100 mM Tris pH 8, 2% CTAB, 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl

CTAB B: 100 mM Tris pH 8, 2% CTAB

Inokulačné médium A: 1,96 g/L bezvodého MES, 10 g/L 1 M MgCl<sub>2</sub>, 1 ml/L 150 mM AS, pH 5,6 pomocou KOH,

Inokulačné médium B: 4,43 g/L MS basal salt, 36 g/L glukózy, 68,5 g/L sacharózy, 0,5 g/L MES, 100 µM AS, 0,01% Silwet L-77, pH 5,2 pomocou KOH

Inokulačné médium C: 41,65 mM glukózy, 100mM CaCl<sub>2</sub>, 100mM MES-KOH pH 5,6, 0,011 µM BAP, 0,01 % Silwet L-77, 0,05 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 µM AS,

Ko-kultivačné médiu: 4,43 g/L MS basal salt, 10 g/L glukózy, 20 g/L sacharózy, 0,5 g/L MES, 100 µM AS, 2 g/L Phytoagar, 5,8 pH pomocou KOH

Tekuté LB médium: 25 g/L LB Broth, pH 7,2 pomocou KOH

Tuhé LB médium: 40 g/L LB agar, pH 7,2 pomocou KOH

### **3.1.4 Biologický materiál**

*Allium cepa*

Bakteriálna kultúra *Agrobacterium tumefaciens* kmeň GV3101

*Medicago sativa* kultivar RSY (Regen SY)

*Nicotiana benthamiana*

### **3.1.5 Plazmidy a konštrukty**

35S::*tagRFP:TUA6*

35S::*KTN1:YFPc* v plazmide *pDEST-KTN1:VYCE*

35S::*MPK4:YFPn* v plazmide *pDEST-MPK4:VYNE*

## 3.2 Metódy

### 3.2.1 Tranzientná transformácia

Všetky tranzientné transformácie vykonané v tejto práci boli sprostredkované pomocou baktérie *Agrobacterium tumefaciens*, kmeň GV3101 obsahujúci gén rezistencie pre antibiotiká spektinomycín, kanamycín.

#### 3.2.1.1 Príprava rastlín *Nicotiana benthamiana*

Na samotnú transformáciu je nutné vybrať čo najlepšie rastliny. Rastliny boli pestované vo fytotronovej komore, vďaka čomu boli dosiahnuté optimálne podmienky pre rast. Zároveň pri raste musia mať rastliny dostatok priestoru pre rozširovanie do šírky a nesmú sa navzájom priestorovo obmedzovať, čo by viedlo k rastu do výšky a celkovému zmenšeniu plochy listov. Listy by mali byť zelené bez začínajúceho žltnutia a dostatočne veľké. Rastliny by nemali mať kvety. Optimálna doba pestovania je medzi 4-6 týždňami. Pričom pred samotným vysadením boli semená umiestnené v chladničke aby bolo dosiahnutý rovnaký čas klíčenia. V deň transformácie je nutné rastliny dostatočne zaliať vodou, tým sa dosiahne maximálny počet otvorených prieduchov na abaxiálnej strane listov. Tieto podmienky umožnia lepší prienik baktérii do rastlín čím sa zvýši úspešnosť transformácie.

#### 3.2.1.2 Tranzientná transformácia *Nicotiana benthamiana*

Bakteriálna kultúra *A. tumefaciens* bola vytiahnutá z mrazničky a rozmrazená na ľade. Následne boli baktérie očkované na pevné LB médium (25 ml) s pridanými antibiotikami (kanamicín 12,5  $\mu$ l a rifampicín 50  $\mu$ l) metódou krížového rozteru, v sterilnom flow boxe, podmienky kultivácie boli 28°C, tma a 2 dni a 0 RPM (Revolutions per minute, otáčky za minútu, RPM). Po narastení boli baktérie prenesené do tekutého LB média (10 ml média v 50ml sterilnej falkónevej skúmavke) s prídavkom antibiotík podľa rezistencie, opäť v sterilných podmienkach (kultivácia prebehla v trepačke pri RPM.180 28°C, tma a 1 deň). Na druhý deň bola meraná optická hustota pri 600 nm ( $OD_{600}$ ) pomocou spektrofotometra, ako blank bolo použité čisté LB médium s antibiotikami. Následne bola kultúra centrifugovaná pri 2000 rpm 10 min a 4°C. Získaný pelet bol re-suspendovaný v inokulačnom médiu a nasledovala centrifugácia, pri 2000g 10min a 4°C postup sme zopakovali ešte jedenkrát. Následne sa pelet re-suspendoval v 2 ml inokulačnom médiu B. Takto pripravená kultúra sa ponechala inkubovať 2 hodiny pri laboratórnej teplote a v tme. Po uplynutí času bola kultúra *A. tumefaciens* vnesená do listov *N. benthamiana* na adaxiálnu stranu pomocou

injekčnej striekačky bez ihly. Miesta infiltrácie bakteriálnou kultúrou boli pznačené fixou pre ľahšie vytvorenie preparátu. Samotné rastliny *N. benthamiana* boli pred infiltráciou dostatočne zaliate vodou aby došlo k otvoreniu prieduchov. Mikroskopické pozorovanie prebehlo na tretí deň po infiltrácii ( 3DAT, days after transformation). Na prípravu preparátu sa vystrihli z listov trojuholníky, ktoré pozostávali z infiltrovaného miesta a pokračovali až po okraj listu.

### **3.2.1.3 Tranzientná transformácia cibule *A. cepa***

#### 3.2.1.3.1 Podľa protokolu (Zhang *et al.*, 2020)

Transformácia bola uskutočnená s rôznymi OD<sub>600</sub> a to konkrétne 0,8;1;1,5 a 2. Pričom boli použité baktérie *A. thumefaciens* kmeň GV3101, ktoré niesli konštrukt *35S::tagRFP-TUA6*. Kultivácia a príprava baktérii vid' kapitola 3.2.1.1, premytie baktérii bolo uskutočnené infiltračnom médiu B. Cibul'a kuchynská bola zbavená vrchnej šupky v nesterilných podmienkach až do dosiahnutia prvej celistvej vrstvy. Následne bola vrchná vrstva vysterilizovaná v 70% etanole a cibul'a bola premiestená do flow boxu. Vo flow boxe bola odstránená vysterilizovaná vrstva a ďalšia vrstva bola opäť vysterilizovaná v 70% etanole a odstránená. Takto pripravená cibul'a bola prekrojená na polovicu po vertikálnej osy. Po prekrojení bola odobratá jedna vrstva. Z vnútornej vrstvy bol uskutočnený výrez o veľkosti cca 1 cm<sup>2</sup>, pomocou skalpelu. Vyrezané kúsky boli vložené do inkubačného roztoku na dobu cca 15 min (v originálnom protokole bola uvedená doba 10min alebo 20min, pričom medzi intervalmi nebol štatisticky preukazný rozdiel). Následne boli tieto kúsky umiestené do Petriho misky s ko-kultivačným médiom a inkubované pri 21°C, a po dobu 24 hodín. Po inkubácii boli kúsky cibule vložené na podložné sklíčko do kvapky tekutého ½ MS.

#### 3.2.1.3.2 Podľa protokolu (Xu *et al.*, 2014)

Kultivácia a príprava baktérii vid' kapitola 3.2.1.1, premytie baktérii bolo uskutočnené infiltračnom médiu C. Transformácia bola vykonaná s OD<sub>600</sub> = 0,1. Zakúpená cibul'a bola pred samotnou infiltráciou pred inkubovaná pri 28°C po dobu 48hod. Cibul'a bola umiestnená v plastovej Hranatej miske o rozmeroch 10,6 cm x 9,5 cm a výške 9,5 cm, ktorá bola vystlaná navlhčenými papierovými utierkami. Papierové utierky bolo nutné vymeniť po 24 hod aby sa zabránilo tvorbe plesní. Cibul'a bola transverzálne odrezaná cca 4 cm pod jej vrchnou časťou. Následne boli vykonané

vertikálne rezy po obvode vo vzdialenosti , ktoré začínali na vrchnej časti a končili pri koreňovej časti. Rozdelené vrstvy boli rozprestreté, takto pripravená cibuľa nápadite pripomínala kvet ruže. Injektáž bola uskutočnená na vnútornej strane každej vrstvy. Pričom sa hrot ihly vpíchal pár mm pod epidermu. Infikovaná zóna bola označená fixkou. Následne bola cibuľa zafixovaná pomocou parafilmu a umiestená do inkubátoru. Inkubácia prebiehala 48 hod v tme. Príprava preparátu pozostávala z vyrezania infikovanej zóny (vyrezaná bola iba epiderma), ktorá bola umiestená na krycie sklíčko. Na epidermu bola pridaná kvapka tekutého ½ MS média.

### **3.2.2 Izolácia génovej DNA metódou CTAB**

Homogenát bol pripravený z mladých listov *M. sativa* RSY. Odobraté listy boli zabalené do alobalu a vhozené do tekutého dusíku. Zmrazené listy boli umiestené do predom vychladenej trecej misky, do ktorej bolo počas homogenizácie prilievajúci tekutý dusík. Rastlinná zmes po homogenizácii v tekutom dusíku bola premiestnená do 2ml ependorfovej skúmavky (takto pripravený homogenát je možné skladovať pri -80°C), a následne bola ependorfka vložená do tekutého dusíku. Po príprave vzoriek bol ku vzorkám pridaný roztok CTAB A, ktorý bol predom predhriaty na 65°C, následne boli vzorky jemne premiešané, následná inkubácia bola pri 65°C 90min. Po inkubácii boli vzorky centrifugované pri 12000g 10min/ izbovej teplote (room temperature, RT). Supernatant bol presunutý do čistej ependorfky, následne bolo k nemu pridané 0,8 ml roztoku chloroformu:isoamylalkoholu (24:1) a prebehlo premiešavanie 15min/RT. Ďalším krokom bola centrifugácia pri 12000g 15min/RT. Vodná fáza bola odobratá do čistej 2 ml ependorfky a bol pridaný roztok CTAB B 1:1. Ku zmesi bol pridaný isopropylalkohol tak aby tvoril 60% obsahu roztoku. Vzorky bola miešaná otáčaním 15min/RT. Nasledovala centrifugácia pri 12000g 10min/RT. Supernatant bol odliaty a pelet sa rozsuspendoval v 1ml 80% etanolu a následovala centrifugácia pri 6500g 5min/RT etanol bol odliaty a tento krok bol zopakovaný. Následne bol pelet zbavený etanolu a rozsuspendovaný v 50µl 1x TE a bola pridaná RNasa 10 µl/ml

### **3.2.3 Izolácia RNA (Trizol)**

Homogenizácia vzoriek prebehla rovnako ako pri izolácii gDNA. Ku homogenátu bolo pridané 0,8 ml Tri reagentu vzorka bola zortexovaná a inkubovaná 5min/RT. Nasledovala centrifugácia pri 12000g 15min/4°C. Supernatant bol prenesený

do čistej 2ml ependorfky a bolo pridané 80 µl BCP, zmes bola premiešaná a inkubovaná 10min/RT. Po inkubácii nasledovala centrifugácia pri 12000g 10min/4°C. Vodná fáza bola presunutá do čistej 2ml ependorfky. Ku vodnej fáze bol pridaný isopropylalkohol tak aby tvoril 70% objemu. Zmes bola premiešaná a inkubovaná 10min/RT následne bola centrifugovaná pri 12000g 8min/4°C. Supernatant bol odstránený a pelet rozsuspendovaný v 1ml 80% etanole. Roztok bol premiešaný a inkubovaný 1hod/RT, po uplynutí doby bola vzorka centrifugovaná pri 7500g 5min/4°C. Pelet bol následne zbavený etanolu a rozsuspendovaný 50 µl PCR vody.

### 3.2.4 PCR overenie izolovanej gDNA

Overenie izolácie gDNA prebehlo pomocou PCR reakcia za použitia primerov MMK3 I3 forward a MMK3 I3 reverz vid' tab. č. 1. Cyklov v PCR bolo 35x.

Tabuľka č.1: zloženie master mixu pre PCR a jej podmienky

Reaktanty	Objem pre 10 µl	cyklus	Teplota v °C	Čas
H <sub>2</sub> O	5,6	Iniciácia	98	5min
5x buffer	2	Denaturácia	98	10sec
dNTP	0,2	žíhanie??)	57,5	10sec
Primer F ( MMK3 I3F)	0,5	Polymerizácia	72	1min
Primer R (MMK3 I3R)	0,5	Finálna polymerizácia	72	1min
pHire (polymeráza)	0,2	držanie	12	∞
Templát	1			

### 3.2.5 Prepis RNA na cDNA

Prepis prebehol v dvoch krokoch. V prvom kroku bola pripravená reakčná zmes, ktorá obsahovala 4,5 µl PCR H<sub>2</sub>O 0,5 µl oligoDT primerov a 5 µl RNA (2 µg na 20 µl reakcie). Pred pridaním RNA sa roztok vortoxoval. Následne bola pridaná RNA a zmes sa dala okamžite inkubovať v cykleri 70°C/10min lid 75°C. Po inkubácii bola zmes okamžite prenesená na ľad. Roztok pre druhý krok pozostával s 4 µl 5x buffer M-MbV, 0,4 µl M-MLX reverse transcript, 1 µl 10mM dNTP a 4,2 µl PCR H<sub>2</sub>O, následne bol tento roztok zmiešaný s reakčnou zmesou a bol inkubovaný v cykleri 3hod/42°C lid 45°C. Po uplynutí inkubácie bola zmes presunutá na ľad a pridalo sa k nemu 60 µl PCR H<sub>2</sub>O.

### 3.2.6 Overenie cDNA pomocou PCR reakcie

Overenie cDNA prebehlo v dvoch replikách za použitia primerov pre MMK3 sekvencie primerov sú uvedené v tab. 2. Počet cyklov v PCR reakcii bolo 35.



Tabuľka č.2: zloženie reakčnej zmesi PCR a jej podmienky

Reaktanty	Objem pre 10 $\mu$ l	cyklus	Teplota v $^{\circ}$ C	Čas
H <sub>2</sub> O	5,6	Iniciácia	98	5min
5x buffer	2	Denaturácia	98	10sec
dNTP	0,2	žihanie??)	57,5	10sec
Primer F (MMK3 start)	0,5	Polymerizácia	72	1min
Primer R (MMK3 EX4)	0,5	Finálna polymerizácia	72	1min
pHire (polymeráza)	0,2	držanie	12	$\infty$
Templát	1			

### 3.2.7 Separácia DNA v 1% agarózovom gély

Prvým krokom bolo riedenie 50x TAE na požadovanú koncentráciu, ktorá bola 1x TAE. Do odmerného valca bolo pridané 980 ml destilovanej vody a 20 ml 50x TAE. Následne bol v 250 ml Erlenmayerovej banke navážený 1 g agarózy, ku ktorému bolo pridaných 100 ml 1x TAE. Takto pripravená zmes bola umiestená do mikrovlnnej trúby, kde bola až do rozpustenia agarózy. Po rozpustení a ochladení na laboratórnu teplotu bol ku roztoku pridaný 1  $\mu$ l Midori farbiva a roztok bol rozliaty do elektroforetickej aparatury, v ktorej bol umiestený hrebeň. Tuhnutie prebehlo pri laboratórnej teplote. Gél bol prenesený do elektroforetickej vane a zaliati 1x TAE pufrom tak aby bola hladina 2-3mm nad géлом. Následne bol vytiahnutí hrebeň a do jamiek boli aplikované vzorky. Ku samotným vzorkám bol ešte pred aplikáciou pridaný 6x DNA vzorkovacie farbivo (6x loading dye) v pomere 1:5 ( na jeden 1 $\mu$ l vzorky boli pridané 4  $\mu$ l PCR H<sub>2</sub>O). Do krajných jamiek bolo nanesených 1,5  $\mu$ l štandardu ( 1kbp Plus DNA Ladder). Elektroforetická aparatura bola zapojená do zdroja pri napätí 90V a časom 30min. Po uplynutí času boli fragmenty vizualizovaná pomocou aparatury Molecular Image.

### 3.2.8 In silico analýzy

#### 3.2.8.1 Príprava primerov

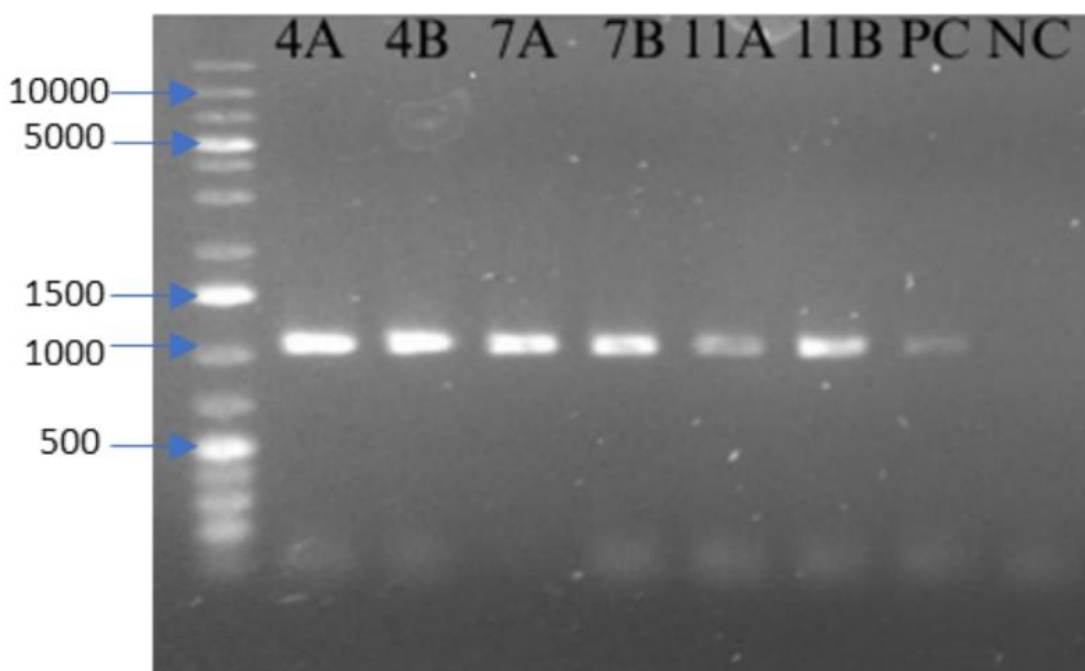
Najprv bol nájdený gén *AtKTNp60* pomocou databázy TAIR (Ref.1), ktorý má označenie AT1G80350 následne bola stiahnutá jeho CDS (coding sequence) a jeho aminokyselinová sekvencia obe vo FASTA formáte. Tieto sekvencie boli následne porovnávané pomocou LIS – legume information system SequenceServer (Ref.2). CDS génu *AtKTNp60* bola zadaná do vyhľadávania . Prvé štyri gény prítomne v *M. Sativa*, ktoré mali najvyššiu zhodu boli ďalej porovnávané podľa aminokyselinovej sekvencie pomocou programu BLASTP (Ref.3) následne bol vybraný ten, ktorý mal najväčšiu

zhodu. Vybraný gén mal označenie medsa.XinJiangDaYe.gnm1.ann1.MS.gene79528.t1. Následne bola nájdená jeho celá CDS so sekvenciou 500 bp upstream a 500bp downstream pomocou databázy Medicago Analysis Portal (Ref.4) kde sa zvolil JBrowse2 (Ref.5) tu bola nájdená táto sekvencia pomocou koordinátor, ktoré sme našli pri získaní názvu génu. Bola vybratá sekcia pre forward a reverz primer, ktoré sa analyzovali na stránke ThermoFisher (Ref.6), upravili sme primery aby ich žihacia teplota nebola väčšia ako 1°C, ich pomer G:C bol v rozmedzí 40%-60% a rozmedzie ich báz bolo od 18 do 24 párov. Takto navrhnuté primery boli následne analyzované pomocou Oligo Calc (Ref.7), kvôli možnému nešpecifickému nasadeniu a tvorbe primer dimérov.

## 4 Výsledky

### 4.1 Izolácia genomickej DNA

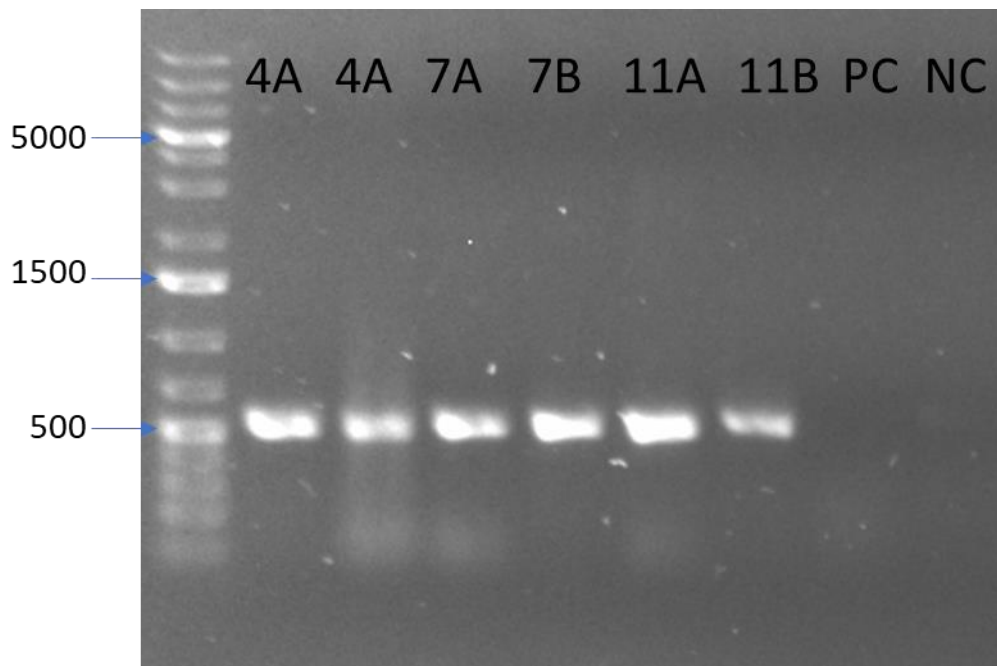
Izolácia prebehla v troch biologických replikách. Z každej biologickej repliky boli zhotovené dve technické repliky pre samotnú izoláciu. Izolovaná gDNA bola overená pomocou PCR reakcie a následnej elektroforézy. Pred samotnou PCR reakciou bola gDNA zriedená na koncentráciu 200 ng/ $\mu$ l a následne pre PCR reakciu bola použitá koncentrácia 25ng na 10 $\mu$ l reakcie. Sekvencia primerov, ktoré boli použité na izoláciu sa nachádza v treťom intróne génu *MMK3* a zachytávajú časť o veľkosti 1065pb, pričom celý tento intrón má dĺžku 2418pb. Na obr. č3. sú fragmenty, ktoré zodpovedajú očakávaniu. Ako pozitívna kontrola bola použitá už overená gDNA z *M.sativa* RSY. Negatívna kontrola bol master mix pre PCR, do ktorého nebol pridaný templát. Ako pozitívna kontrola bola použitá už overená gDNA z *M.sativa* RSY. Negatívna kontrola bol master mix pre PCR do, ktorého nebol pridaný templát.



Obrázok 3 č. : Výsledok gélovej elektroforézy pre overenie genomickej DNA po PCR reakcii s polymerázou PhireII. Podmienky gélovej elektroforézy boli 90V/30min. 4A-11B – repliky, PC – pozitívna kontrola, NC – negatívna kontrola.

## 4.2 Prepis RNA do cDNA

Prepis do cDNA bol uskutočnený po selektovaní vzoriek z izolácie RNA. Pričom boli vybrané najlepšie vzorky na základe hodnôt z nanodropu a výsledkoch z elektroforézy. Úspešnosť prepisu bola vykonaná pomocou PCR reakcie, za použitia primerov pre gén *MMK3* sekvencia je uvedená v tabuľke č. . Priemery boli zvolené tak aby zachytávali úsek o dĺžke 472 párov bázy. Tento úsek začínal štart kodónom a končil v štvrtom exóne génu. Obrázok č5. ukazuje elektroforézu po PCR reakcií. Pásky na gély zodpovedajú nami očakávaným výsledkom, keďže sa nachádzajú tesne nad pásom, ktorý reprezentuje 500 párov bázy. Negatívna kontrola pozostávala z reakčnej zmesi, do ktorej nebol pridaný templát. Pozitívna kontrola pozostávala z reakčnej zmesi a templátom, ktorý nám bol poskytnutý ako overený, avšak pri PCR reakcií nebol amplyfikovaný.

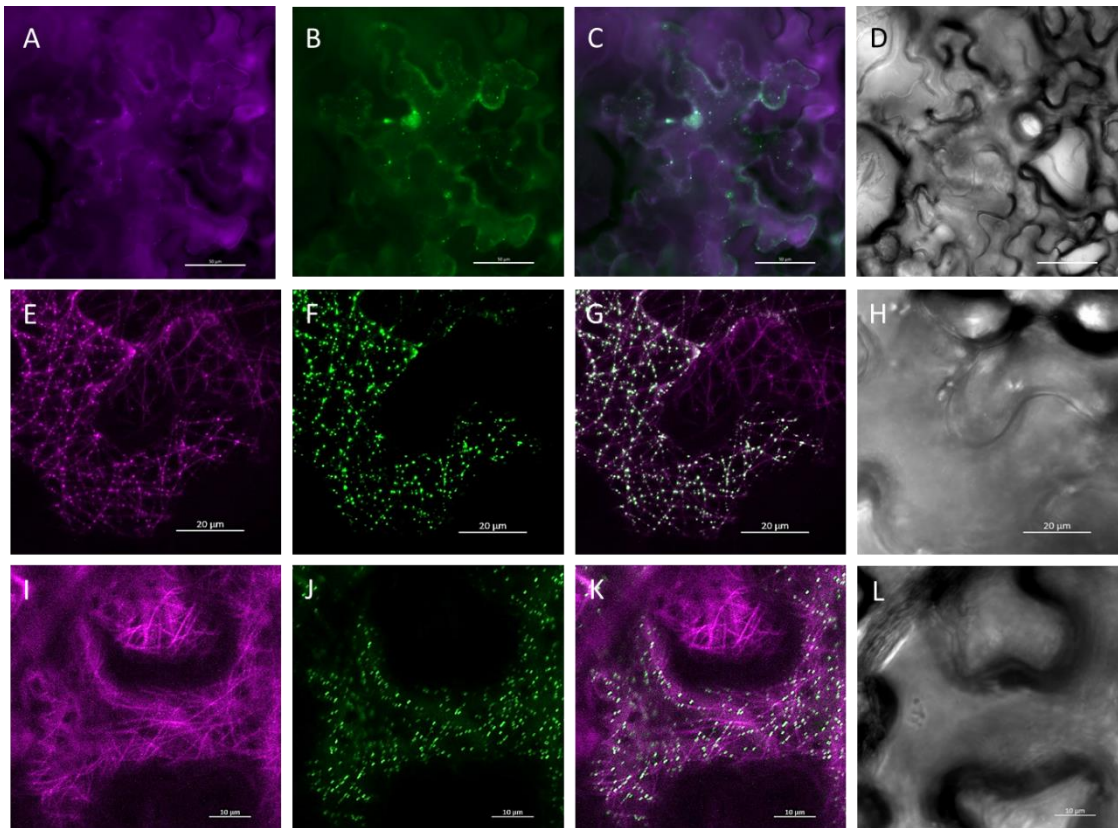


Obrázok 4. Výsledok gélovej elektroforézy pre overenie cDNA po PCR reakcii s polymerázou Phire II. Podmienky gélovej elektroforézy boli 90V/30min. 4A-11B – repliky, PC – pozitívna kontrola, NC – negatívna kontrola.

### 4.3 Tranzientná transformácia *N. benthamiana*

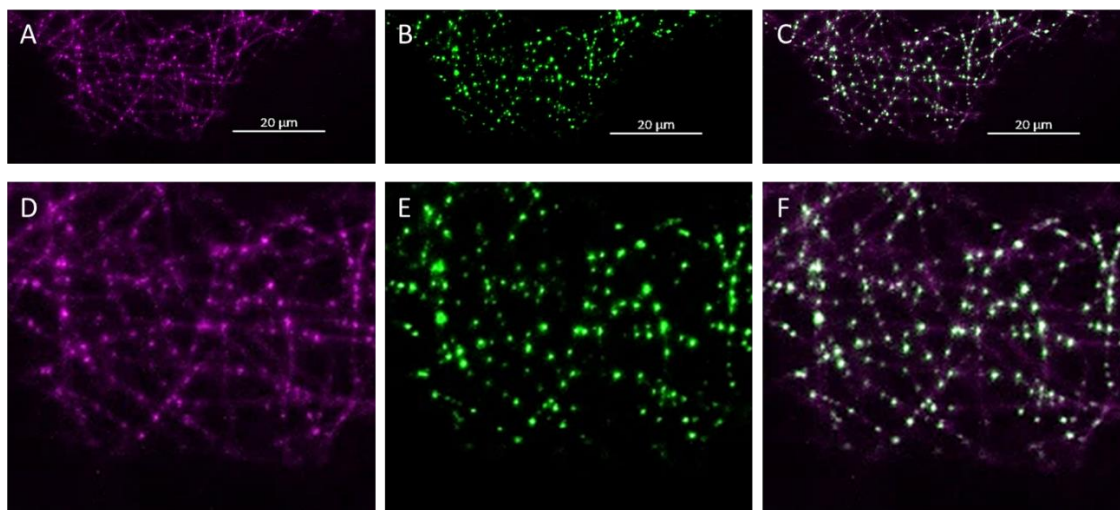
Tranzientná transformácia listov *N. benthamiana* bola sprostredkovaná *A. tumefaciens* kmeň GV3101. Prvý krát prebehlo mikroskopické pozorovanie preparátov na epifluorescenčnom mikroskope. Pri tomto pozorovaní bolo možné sledovať spoty (značené YFP), ktoré boli tvorené interakciou MPK4 a KTN1. Avšak kvalita sledovaných mikrotubulov (značené tagRFP) bola veľmi nízka vid' (obr 5) , kde je možné vidieť veľký šum pozadia, ktorý na tomto mikroskope nie je možné filtrovať. Zároveň pozorovanie na epifluorescenčnom mikroskope slúžilo ako overenie funkcie konštruktov a získania praktických skúsenosti s mikroskopiou. Po overení konštruktov boli ďalšie pozorovania uskutočnené na CLSM V tomto prípade bola kvalita rádovo lepšia, keďže bolo možné odfiltrovať šum pozadia. Vďaka čomu bolo možné sledovať opäť spoty tvorené interakciou MPK4 a KTN1, ktoré sa nachádzali priamo na mikrotubuloch vid' (obr 5)

Pozorovania na CLSM boli uskutočnené 3DAT (day after transformation, d'en po transformácii, DAT), 5DAT a 6DAT vid' (obr 5). . Z našich pozorovaní vyplýva, že najlepšie podmienky pre pozorovanie boli 3DAT . Signál z mikrotubulov mal príliš slabú intenzitu v prípade 5DAT a 6DAT. Okrem slabého signálu mikrotubulov bol taktiež prítomný silný šum pozadia čo ešte viac znemožňovalo vizualizáciu mikrotubulov a následnú analýzu. Snímky zhotovené 6DAT neboli vhodné na ďalšie analýzu, kvôli veľmi nízkej kvalite. Avšak signál so spotov mal podobnú intenzitu ako v prípade pozorovania v 3DAT.



Obrázok 5. :Porovnanie tranzientnej transformácie listov *N. benthamiana* a vizualizácia ko-lokalizácie proteínov MPK4 a KTN1 na kortikálnych mikrotubuloch. Snímky A-H boli zhotovené 3DAT. Snímky I-L boli zhotovené 5DAT. A-D) epifluorescenčný mikroskop,

Na približnom výseku (obr 6) je možné pozorovať detailne interakciu proteínov MPK4 a KTN1 na mikrotubuloch. Pričom zelené spoty na obrázkoch predstavujú spojenie proteínov MPK4 a KTN1. Mikrotubuly sú značené fialovou farbou, táto farba bola zvolená kvôli lepšej vizualizácii interakcie. V spojených kanáloch je možné pozorovať biele a zelené spoty na mikrotubuloch. Biela farba značí interakciu s mikrotubulmi. Avšak táto interakcia nemusí byť úplne presná, keďže obrázkom bol zvýšený histogram. Histogram bol upravený, kvôli slabej viditeľnosti mikrotubulov.



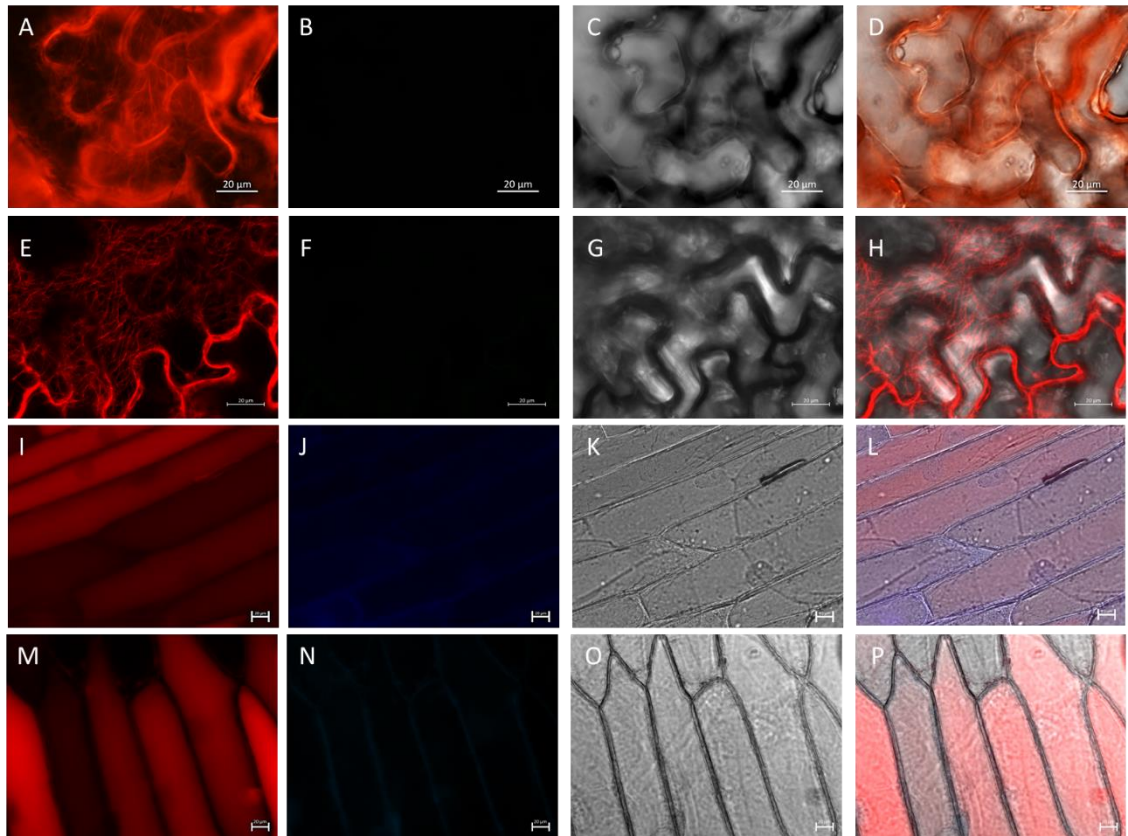
Obrázok 6 detailný pohľad na interakciu MPK4 a KTN1 s mikrotubulmi. A-C) výrez. D-F) detail. CLSM, zväčšenie 40x10. A,D) RFP kanál, B,E) GFP kanál. C,F spojené kanály

#### 4.4 Tranzientná transformácia *A. cepa*

Tranzientná transformácia šupky cibule kuchynskej *A. cepa* bola sprostredkovaná *A. thumefaciens* kmeň GV3101, ktorý niesol konštrukt *35S::tagRFP:TUA6*. Testovanie konštrukt prebehlo v epidermálnych bunkách *N. benthamiana*. Mikroskopické pozorovanie prebehlo na epifluorescenčnom mikroskope (obr 8 A-D a I-P) a zároveň aj na CLSM (obr. 7 E-H). Transformácia bola sledovaná na tretí deň od infiltrácie. Na (obr. 7 A-D) sú epidermálne bunky *N. benthamiana* fotené na epifluorescenčný mikroskop. Mikrotubuly sú tu pozorovateľné avšak nie moc zreteľne, čo je spôsobené vysokým šumom pozadia. Avšak pri pozorovaní na CLMS boli mikrotubuly lepšie pozorovateľné, keďže bolo možné odfiltrovať pozadie a signál z chloroplastov. Na druhej strane pri pozorovaní epidermálnych buniek *A. cepa* mikrotubuly neboli viditeľné ani v jednom prípade. Pričom transformácia bola vykonaná podľa dvoch rozdielnych protokolov.

V prípade *A. cepa* bol rastlinný materiál zakúpený v miestnom obchode, vybrane cibule boli čo možno najčerstvejšie a bez prítomnosti povrchových väd (chýbajúce vrstvy obalu a bez prítomnosti mäkkých miest čo by naznačovali začínajúcu hnilobu). Prvá transformácia bola vykonaná na červenej cibuli, ako bolo uvedené v protokoloch. Avšak pri červenej cibuli sa často vyskytovali problémy pri mikroskopickom pozorovaní, ktoré boli spôsobené prítomnými antokyánmi. Na druhej strane tento prípad bol pozorovaný iba v prípade transformácie podľa protokolu (Xu *et al.* , 2014), keďže tu bol dlhší čas inkubácie. V ďalších opakovaníach bola použitá cibula kuchynská žltá.





Obrázok 7 Porovnanie konštruktu *35S::tagRFP-TUA6*. A-H) epidermálne bunky *N. benthamiana*. I-L) epidermálne bunky *A. cepa*. M-P) transformácia podľa protokolu (Zhang et al., 2020)  $OD_{600}=2$ . I-L) transformácia podľa protokolu (Xu et al., 2014). A-L) epifluorescenčný mikroskop. A-D) zväčšenie 40x10. M-P) zväčšenie 20x10. E-L) CLSM mikroskop, zväčšenie 20x10. A,E,I,M) mRFP kanál. B,F,J,N) DAPI kanál. C,G,K,O) prechádzajúce svetlo. D,H,L,P) spojené kanály.

## 5 Diskusia

Tranzientnou transformáciou listou *N. benthamiana*, ktorá je sprostredkovaná *A. thumefaciens*, je možné získať značné množstvo rekombinantných proteínov, ktoré je možné ďalej testovať napr. imunoblotingom a ich následné využívanie v biochemických štúdiách. Zároveň je jej využitie aj v experimentoch, ktoré sú zamerané na vizualizáciu bunecných proteínov pomocou flouresnečného značenia ako napríklad značenie pomocou GFP, YFP alebo RFP (Křenek *et al.*, 2015). Avšak s mikroskopickým pozorovaním tranzientne transformovaných listov *N. benthamiana*, nastáva problém s vizualizáciou, čo je spôsobené morfológiou listov. Listy nie sú v jednej rovine a majú značnú 3D štruktúru. Zároveň v pozorovaniach sú prítomne aj mezofylové bunky listu, vďaka čomu dochádza k zvýšenému flourescenčnému signálu v pozadí. Tento efekt nesie so sebou značnú nevýhodou najmä pri pozorovaní cytoskeletu a proteínov, ktoré s ním interagujú. Problémy s mikroskopickým pozorovaním by mohli byť prekonané výberom vhodnejšieho rastlinného materiálu pre tranzitnú transformáciu. Kvôli tejto nevýhode pri mikroskopovaní listov *N. benthamiana* bol v tejto práci testovaný protokol zameraný na tranzientnú transformáciu epidermálnych buniek *A. cepa*.

Epiderma *A. cepa* je tvorená iba jednou vrstvou buniek, čo má veľkú výhodu pri mikroskopickom pozorovaní. Boli testované dva protokoly pre tranzientnú transformáciu epidermálnych buniek *A. cepa* prvým bol (Xu *et al.*, 2014), v tomto protokole sú baktéria injekčne aplikované medzi adaxiálnu stranu epidermy a mezofylové bunky a následne je celá cibul'ová „hlava“ ko-kultivovaná. Pričom na prípravu preparátu je použitá iba epiderma. V našom prípade sme pre transformáciu použili baktérie *A. thumefaciens* kmeň GV3101, ktoré niesli konštrukt 35S::tagRFP-TUA6 (pre oba protokoly bol použitý rovnaký konštrukt). Samotná transformácia prebehla úspešne. Avšak transformované bunky mali iba difúzny červený flourescenčný signál vid' obr. č.8. Pre overenie funkcie konštrukt bol vykonaný test pomocou overeného protokolu pre tranzientnú transformáciu listov *N. benthamiana*. Overenie prebehlo úspešne a bolo možné pozorovať cytoskelet vid' obr. 8. Druhým testovaným protokol bol podľa (Zhang *et al.*, 2020). Testované bolo zároveň aj rôzne OD<sub>600</sub> pre transformáciu. V originálnom protokole bola uvedená úspešnosť iba pre OD<sub>600</sub>= 0,1 – 0,3 a 0,5. Zároveň pri tomto protokole je epiderma z cibule ponorená do inokulačného média s bakteriálnou kultúrou, a ďalej ko-kultivovaná v Petriho miske na médiu. V našom prípade sme testovali OD<sub>600</sub> = 0,5 ; 0,8; 1; 1,5 a 2. Avšak transformácia bola úspešná iba v prípade, keď bolo OD<sub>600</sub> = 2. Treba však podotknúť, že signál bol opäť iba difúzny vid' obr. č.8.

Testovania oboch protokol malo za cieľ zvýšiť kvalitu mikroskopického pozorovania. Vzhľadom na to, že mikroskopický preparát v prípade *A. cepa* tvorí iba jedna vrstva epidermálnych buniek vďaka čomu je možné zaostrenie na väčšiu plochu. Zároveň by bolo možné pozorovať cytoskelet v celej bunke, čo nie je možné v prípade listov *N. benthamiana*, kvôli morfológii. Zhotovovanie takýchto obrázkov v živých rastlinných bunkách predstavuje určité nevýhody ako napríklad bunečný pohyb a pohyb preparátu na podložnom sklíčku. Mikroskopické preparáty pripravené z *A. cepa* by bolo možné použiť aj na výkonnejších mikroskopoch.

V ďalšom možnom pokračovaní tranzientnej transformácie cibule by stálo za vyskúšanie použiť iné cytoskeletálne markery, ako napríklad GFP-TUA6 (Shaw *et al.*, 2003). Zároveň by mohla byť vykonaná tranzientná transformácia prostredníctvom mikroprojektilovej metódy. Avšak opäť by bolo vhodné konštrukty, ktoré by boli predom overené.

MPK4 priamo interaguje s proteínmi, ktoré sú zapojené do modulácie cytoskeletu (Beck *et al.*, 2010). Interakcia MPK4 a KTN1 bola potvrdená (Ivan Luptovčiak, 2017). V tejto práci bola vykonaná transformácia epidermálnych buniek *N. benthamiana* za cieľom sledovania kolokalizácie MPK4 a KTN1 na mikrotubuloch. Táto kolokalizácia je ukázaná na obrázku č. 6, pričom jej detail je zachytený na obrázku č. 7, pozorovania boli vykonané na CLSM. V prípade pozorovania tejto kolokalizácie na epifluorescenčnom mikroskope bolo možné sledovať iba interakciu MPK4 a KTN1, ktorá bola pozorovaná v nepríliš dobrej kvalite. Zároveň pri tomto pozorovaní nebolo možné sledovať cytoskelet. V tejto práci boli vykonané pozorovanie kolokalizácie na CLSM v rôznych dňoch po infiltrácii a to 3DAT, 5DAT a 6DAT. Pozorovania ukázali, že najvhodnejšie podmienky sú dosiahnuté 3DAT. V prípade neskorších pozorovaní bol fluorescenčný signál z mikrotubulov veľmi nekvalitný ako môžeme vidieť na obrázku č. 6 I-L. Zároveň tu bol prítomný aj príliš veľký cytoplazmatický šum, čo mohlo byť spôsobené nezačleneným tagRFP-TUA6 do cytoskeletu. Tento šum zhoršoval kvalitu pozorovania ako aj následnú vizualizáciu kolokalizácie. Čo sa týka pozorovania 6DAT bola kvalita až príliš zlá čím bolo znemožnené mikroskopické pozorovanie.

Ďalšie možné pozorovania by mohli zahŕňať kolokalizáciu s nadradenými „upstream“ kinázami, za cieľom skúmania ďalších interakcií v tejto kaskáde. Tieto poznatky by priniesli celkový pohľad na zapojenie MPK4 do organizácie cytoskeletu.

Zároveň by bolo zaujímavé vykonať tieto pozorovania v rôznych vývojových štádiách a rôznych rastlinných pletivách. Vďaka čomu by bolo možné získať celkový pohľad tejto dráhy do vývojových procesov v rastlinných bunkách.

V ďalšej časti bola venovaná snaha izolácii génov *MsKTNI* a *MsMKK2*. Avšak v tomto sa vyskytol problém s návrhom primerov pre *MsKTNI*. Prvé pokusy o izoláciu génov prebehli z cDNA, ktorá nám bola poskytnutá. Po neúspešných pokusoch bola izolovaná genomická DNA a RNA z mladých listov *M. sativa* RSY. Následne bol uskutočnený úspešný prepis RNA do cDNA. Avšak v izolácii sa ďalej nepokračovalo z časových dôvodov.

Problémy v návrhu primerov mohli byť spôsobené chybami v databázach sekvencií pre *M. sativa*. Tieto problémy boli pravdepodobne spôsobené rozdielmi v kultivaroch, keďže dostupnú databázu boli iba pre kultivar XinJiangDaYe. Zatiaľ čo my sme mali k dispozícii kultivar RSY. Vzhľadom na to by bolo vhodné pri ďalšom pokračovaní získať kultivar XinJiangDaYe, čím by bolo zamedzené možným rozdielom v sekvenciách. Prípadne získať kompletnú sekvenciu pre kultivar RSY.

## 6 Záver

Teoretická časť bakalárskej práce bola zameraná na prehľad mitogénom aktivovaných proteín kináz v *A. thaliana* a ich ortológoch v *M. sativa*. Väčšia pozornosť bola zameraná na AtMPK3, AtMPK4 a AtMPK6, keďže sa jedná o najviac preskúmané MAPK u *A. thaliana* a ich ortológoch v *M. sativa* a to najmä SIMK a SIMKK. Okrem iného sú AtMPK3, AtMPK4 a AtMPK6 zapojené aj to vývoja rastliny. AtMPK4 priamo ovplyvňuje cytoskelet buniek napríklad prostredníctvom interakcie s MAP a inými proteínmi a transkripčnými faktormi. Ďalší prehľad sa zaoberá proteínom Katanín, so zameraním na jeho podjednotky p60 a p80 a ich funkcie v bunkách.. Posledná časť teoretického úvodu bola zameraná na rastlinný cytoskelet. V tejto časti bola venovaná pozornosť mikrotubulovým vláknám a aktínovým vláknám.

Praktická časť bola zameraná na klonovanie génov *MsKTNI* a *MsMMK2*. Vzhľadom na počiatočné neúspechy, ktoré boli spôsobené pravdepodobne zle navrhnutými primermi pre gén *MsKTNI* (jednalo sa o primery pre gateway cloning), keďže nebolo možné izolovať tento gén z cDNA, ktorá nám bola poskytnutá. Avšak po tomto neúspechu bola izolovaná čerstvá genomická DNA a RNA, ktorá bola následne prepísaná do cDNA z rastlín *M. sativa* RSY. Izolácia bola overená pomocou PCR metódy za použitia overených primerov pre gén *MsMCK3* a následnou elektroforézou, vďaka čomu bolo možné vyhodnotiť izoláciu ako úspešnú. Bohužiaľ už neboli časové možnosti pokračovať v tomto kroku praktickej časti.

Ďalšia časť praktickej časti sa venovala overovaniu protokolov pre tranzientnú transformáciu *A. cepa*, podľa vyhladaných protokolov s vysokou úspešnosťou. V tejto časti sme sa zamerali na epidermálne bunky *A. cepa*, keďže epidermu týchto buniek tvorí iba jedna vrstva buniek. Úspech v tomto kroku by znamenal značne lepšiu vizualizáciu kortikálnych mikrotubulov, a tým by bola zvýšená celková kvalita vizualizácie cytoskeletu v jednej rovine. Avšak po transformácii bolo možné pozorovať v bunkách iba difúzny signál. Konštrukt, ktorým boli transformované bunky *A. cepa* bol predom overený v epidermálnych bunkách *N. benthamiana*, pričom pri tejto transformácii bolo možné vizualizovať mikrotubuly. Pozorovanie prebehlo na epifluorescenčnom mikroskope a na CLMS.

Posledným krokom praktickej časti bola tranzientná transformácia listov *N. benthamiana*. V tomto kroku bolo v pláne sledovať interakcie *AtMPK4* s *AtKTNI* a ich

následne analýzy ko-lokalizácie na mikrotubuloch, ktoré boli značené florescenčným proteínom tagRFP. Prvým krokom bolo osvojenie si metódy. Prvotné pozorovanie boli uskutočnené na epifluorescenčnom mikroskope pre získanie skúseností. Následné pozorovania boli vykonané na CLSM.

## **7 Zoznam skratiek**

CLSM (confocal laser scanning microscopy, konfokálny laserový skenovací mikroskop)

Col-0 (Columbia-0)

CTAB (Centimonium bromid)

DAT (days after transformation, dni potransformácii)

gDNA (genomická DNA)

KTN1 (katanín p60)

LB médium (Lysogeny broth)

MAPK ( mitogén aktivovaná proteín kináza )

MAPKK (mitogén aktivovaná proteín kináza kináza)

MAPKKK (mitogén aktivovaná proteín kináza kináza kináza)

MAPs (MT- associated proteins, s mikrotubulmy asociované proteíny)

MPK4 (MAP kinaza 4)

MS médium (Murashige and Skoog medium)

MT (mikrotubuly)

OD (optical density, optická denzita)

PPB (Pre-prophase band, Predprofázový pás)

RSY (Regen SY)

SAMK (salt activated mitogen activated protein kinase, stresom indukovaná MAPK)

SIMK (Stress-induced mitogen activated protein kinase, Stresom indukovaná MAPK)

SIMKK (Stresom indukovaná MAPK kináza)

WT (wild type, divoký typ)

## 8 Referencie

- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., (1998). *Essention Cell Biology*. 2. vydanie -New York: Garland Publishing. ISBN 80-902906-2-0
- Anderson, Jeffrey C., Sebastian Bartels, Marina A. González Besteiro, Bationa Shahollari, Roman Ulm, a Scott C. Peck. “Arabidopsis MAP Kinase Phosphatase 1 (AtMKP1) Negatively Regulates MPK6-Mediated PAMP Responses and Resistance against Bacteria”. *The Plant Journal* 67, č. 2 (2011): 258–68. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04588.x>.
- Berson, T., von Wangenheim, D., Takáč, T. *et al.* Trans-Golgi network localized small GTPase RabA1d is involved in cell plate formation and oscillatory root hair growth. *BMC Plant Biol* 14, 252 (2014). <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0252-0>
- Bigeard J and Hirt H (2018) Nuclear Signaling of Plant MAPKs. *Front. Plant Sci.* 9:469. doi: 10.3389/fpls.2018.00469
- Blanchoin, Laurent, Rajaa Boujemaa-Paterski, Cécile Sykes, a Julie Plastino. “Actin Dynamics, Architecture, and Mechanics in Cell Motility”. *Physiological Reviews* 94, č. 1 (január 2014): 235–63. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2013>.
- Burk, David H., Ruiqin Zhong, a Zheng-Hua Ye. The Katanin Microtubule Severing Protein in Plants. *Journal of Integrative Plant Biology* 49, č. 8 (august 2007): 1174–82. <https://doi.org/10.1111/j.1672-9072.2007.00544.x>.
- Cardinale, Francesca, Claudia Jonak, Wilco Ligterink, Karsten Niehaus, Thomas Boller, a Heribert Hirt. “Differential Activation of Four Specific MAPK Pathways by Distinct Elicitors\*”. *Journal of Biological Chemistry* 275, č. 47 (2000): 36734–40. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007418200>.
- Claudia Jonak, Hirofumi Nakagami, Heribert Hirt, Heavy Metal Stress. Activation of Distinct Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways by Copper and Cadmium, *Plant Physiology*, Volume 136, Issue 2, October 2004, Pages 3276–3283, <https://doi.org/10.1104/pp.104.045724>
- David H. Burk, Zheng-Hua Ye, Alteration of Oriented Deposition of Cellulose Microfibrils by Mutation of a Katanin-Like Microtubule-Severing Protein , *The Plant Cell*, Volume 14, Issue 9, September 2002, Pages 2145–2160, <https://doi.org/10.1105/tpc.003947>



- Fletcher, Daniel A., a R. Dyche Mullins. “Cell Mechanics and the Cytoskeleton”. *Nature* 463, č. 7280 (január 2010): 485–92. <https://doi.org/10.1038/nature08908>.
- Forde, Brian G., Sean R. Cutler, Najia Zaman, a Patrick J. Krysan. “Glutamate Signalling via a MEKK1 Kinase-Dependent Pathway Induces Changes in Arabidopsis Root Architecture”. *The Plant Journal* 75, č. 1 (2013): 1–10. <https://doi.org/10.1111/tpj.12201>.
- Fuente van Bentem, Sergio de la, Dorothea Anrather, Ilse Dohnal, Elisabeth Roitinger, Edina Csaszar, Jos Joore, Joshua Buijnink, et al. “Site-Specific Phosphorylation Profiling of Arabidopsis Proteins by Mass Spectrometry and Peptide Chip Analysis”. *Journal of Proteome Research* 7, č. 6 (01. jún 2008): 2458–70. <https://doi.org/10.1021/pr8000173>.
- Haiyun Yue, Shengjun Nie, Da Xing, Over-expression of Arabidopsis Bax inhibitor-1 delays methyl jasmonate-induced leaf senescence by suppressing the activation of MAP kinase 6, *Journal of Experimental Botany*, Volume 63, Issue 12, July 2012, Pages 4463–4474, <https://doi.org/10.1093/jxb/ers122>
- Hashimoto, Takashi. “Microtubules in Plants”. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists* 13 (27. apríl 2015): e0179. <https://doi.org/10.1199/tab.0179>
- Huachun Wang, Njabulo Ngwenyama, Yidong Liu, John C. Walker, Shuqun Zhang, Stomatal Development and Patterning Are Regulated by Environmentally Responsive Mitogen-Activated Protein Kinases in Arabidopsis, *The Plant Cell*, Volume 19, Issue 1, January 2007, Pages 63–73, <https://doi.org/10.1105/tpc.106.048298>
- Ivan Luptovčiak. *The role of selected mitogen-activated protein kinases in Arabidopsis*. UPOL Olomouc, 2017 [cit. 2023-05-08]
- J. S. López-Bucio, J. G. Dubrovsky, J. Raya-González, Y. Ugartechea-Chirino, J. López-Bucio, L. A. de Luna-Valdez, M. Ramos-Vega, P. León, A. A. Guevara-García, Arabidopsis thaliana mitogen-activated protein kinase 6 is involved in seed formation and modulation of primary and lateral root development, *Journal of Experimental Botany*, Volume 65, Issue 1, January 2014, Pages 169–183, <https://doi.org/10.1093/jxb/ert368>
- Jagodzik P, Tajdel-Zielinska M, Ciesla A, Marczak M and Ludwikow A (2018) Mitogen-Activated Protein Kinase Cascades in Plant Hormone Signaling. *Front. Plant Sci.* 9:1387. doi: 10.3389/fpls.2018.01387

- Jan W. Vos, Laurent Pieuchot, Jean-Luc Evrard, Natacha Janski, Marc Bergdoll, Dryas de Ronde, Laurent H. Perez, Teresa Sardon, Isabelle Vernos, Anne-Catherine Schmit, The Plant TPX2 Protein Regulates Prospindle Assembly before Nuclear Envelope Breakdown, *The Plant Cell*, Volume 20, Issue 10, October 2008, Pages 2783–2797, <https://doi.org/10.1105/tpc.107.056796>
- Jia, Weiyan, Baohua Li, Shujia Li, Yan Liang, Xiaowei Wu, Mei Ma, Jiyao Wang, et al. “Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade MKK7-MPK6 Plays Important Roles in Plant Development and Regulates Shoot Branching by Phosphorylating PIN1 in Arabidopsis”. Zostavil Mark Estelle. *PLOS Biology* 14, č. 9 (12. september 2016): e1002550. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002550>.
- Ken Kosetsu, Sachihito Matsunaga, Hirofumi Nakagami, Jean Colcombet, Michiko Sasabe, Takashi Soyano, Yuji Takahashi, Heribert Hirt, Yasunori Machida, The MAP Kinase MPK4 Is Required for Cytokinesis in *Arabidopsis thaliana*, *The Plant Cell*, Volume 22, Issue 11, November 2010, Pages 3778–3790, <https://doi.org/10.1105/tpc.110.077164>
- Kohoutová, Lucie, Hana Kourová, Szilvia K. Nagy, Jindřich Volc, Petr Halada, Tamás Mészáros, Irute Meskiene, László Bögre, a Pavla Binarová. “The Arabidopsis Mitogen-Activated Protein Kinase 6 Is Associated with  $\gamma$ -Tubulin on Microtubules, Phosphorylates EB1c and Maintains Spindle Orientation under Nitrosative Stress”. *New Phytologist* 207, č. 4 (2015): 1061–74. <https://doi.org/10.1111/nph.13501>.
- Komis, George, Ivan Luptovčiak, Miroslav Ovečka, Despina Samakovli, Olga Šamajová, a Jozef Šamaj. “Katanin Effects on Dynamics of Cortical Microtubules and Mitotic Arrays in Arabidopsis Thaliana Revealed by Advanced Live-Cell Imaging”. *Frontiers in Plant Science* 8 (24. máj 2017): 866. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00866>.
- Komis, George, Olga Šamajová, Miroslav Ovečka, a Jozef Šamaj. “Cell and Developmental Biology of Plant Mitogen-Activated Protein Kinases”. *Annual Review of Plant Biology* 69, č. 1 (29. apríl 2018): 237–65. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040314>.
- Lee JS, Kuroha T, Hnilova M, Khatayevich D, Kanaoka MM, McAbee JM, Sarikaya M, Tamerler C, Torii KU. Direct interaction of ligand-receptor pairs specifying stomatal

- patterning. *Genes Dev.* 2012 Jan 15;26(2):126-36. doi: 10.1101/gad.179895.111. Epub 2012 Jan 12. PMID: 22241782; PMCID: PMC3273837.
- Li, Jiejie, Laurent Blanchoin, a Christopher J. Staiger. “Signaling to Actin Stochastic Dynamics”. *Annual Review of Plant Biology* 66, č. 1 (2015): 415–40. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-040327>.
- Lian, Na, Xinwei Wang, Yanping Jing, a Jinxing Lin. “Regulation of Cytoskeleton-Associated Protein Activities: Linking Cellular Signals to Plant Cytoskeletal Function”. *Journal of Integrative Plant Biology* 63, č. 1 (2021): 241–50. <https://doi.org/10.1111/jipb.13046>.
- Liu, Jun, James M. Elmore, Anja T. Fuglsang, Michael G. Palmgren, Brian J. Staskawicz, a Gitta Coaker. “RIN4 Functions with Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPases to Regulate Stomatal Apertures during Pathogen Attack”. *PLOS Biology* 7, č. 6 (6 2009): e1000139. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000139>.
- Luptovčiak I, Komis G, Takáč T, Ovečka M and Šamaj J (2017) Katanin: A Sword Cutting Microtubules for Cellular, Developmental, and Physiological Purposes. *Front. Plant Sci.* 8:1982. doi: 10.3389/fpls.2017.01982
- MAPK Group (Kazuya Ichimura et, Kazuya Ichimura, Kazuo Shinozaki, Guillaume Tena, Jen Sheen, Yves Henry, Anthony Champion, et al. “Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature”. *Trends in Plant Science* 7, č. 7 (2002): 301–8. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02302-6](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02302-6).
- Martina Beck, George Komis, Jens Müller, Diedrik Menzel, Jozef šamaj, *Arabidopsis* Homologs of Nucleus- and Phragmoplast-Localized Kinase 2 and 3 and Mitogen-Activated Protein Kinase 4 Are Essential for Microtubule Organization, *The Plant Cell*, Volume 22, Issue 3, March 2010, Pages 755–771, <https://doi.org/10.1105/tpc.109.071746>
- Matsuoka, Daisuke, Takuto Yasufuku, Tomoyuki Furuya, a Takashi Nanmori. “An Abscisic Acid Inducible Arabidopsis MAPKKK, MAPKKK18 Regulates Leaf Senescence via Its Kinase Activity”. *Plant Molecular Biology* 87, č. 6 (01. apríl 2015): 565–75. <https://doi.org/10.1007/s11103-015-0295-0>.
- Miroslav Ovečka, Tomáš Takáč, George Komis, Pavol Vadovič, Slávka Bekešová, Anna Doskočilová, Veronika Smékalová, Ivan Luptovčiak, Olga Šamajová, Alois Schweighofer, Irute Meskiene, Claudia Jonak, Pavel Křenek, Irene Lichtscheidl,

- Ľudovít Škultéty, Heribert Hirt, Jozef Šamaj, Salt-induced subcellular kinase relocation and seedling susceptibility caused by overexpression of *Medicago* SIMKK in *Arabidopsis*, *Journal of Experimental Botany*, Volume 65, Issue 9, June 2014, Pages 2335–2350, <https://doi.org/10.1093/jxb/eru115>
- Müller, Jens, Martina Beck, Ursula Mettbach, George Komis, Gerd Hause, Diedrik Menzel, a Jozef Šamaj. “Arabidopsis MPK6 Is Involved in Cell Division Plane Control during Early Root Development, and Localizes to the Pre-Prophase Band, Phragmoplast, Trans-Golgi Network and Plasma Membrane”. *The Plant Journal* 61, č. 2 (2010): 234–48. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.04046.x>.
- Nick, Peter. “Microtubules, Signalling and Abiotic Stress”. *The Plant Journal* 75, č. 2 (2013): 309–23. <https://doi.org/10.1111/tpj.12102>.
- Ovečka, Miroslav, Ivan Luptovčiak, George Komis, Olga Šamajová, Despina Samakovli, a Jozef Šamaj. “Spatiotemporal Pattern of Ectopic Cell Divisions Contribute to Mis-Shaped Phenotype of Primary and Lateral Roots of Katanin1 Mutant”. *Frontiers in Plant Science* 11 (09. jún 2020): 734. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00734>.
- Qing Kong, Na Qu, Minghui Gao, Zhibin Zhang, Xiaojun Ding, Fan Yang, Yingzhong Li, Oliver X. Dong, She Chen, Xin Li, Yuelin Zhang, The MEKK1-MKK1/MKK2-MPK4 Kinase Cascade Negatively Regulates Immunity Mediated by a Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase in *Arabidopsis*, *The Plant Cell*, Volume 24, Issue 5, May 2012, Pages 2225–2236, <https://doi.org/10.1105/tpc.112.097253>
- Ram Dixit, Richard Cyr, The Cortical Microtubule Array: From Dynamics to Organization, *The Plant Cell*, Volume 16, Issue 10, October 2004, Pages 2546–2552, <https://doi.org/10.1105/tpc.104.161030>
- Rayapuram, Naganand, Jean Bigeard, Hanna Alhoraibi, Ludovic Bonhomme, Anne-Marie Hesse, Joëlle Vinh, Heribert Hirt, a Delphine Pflieger. “Quantitative Phosphoproteomic Analysis Reveals Shared and Specific Targets of Arabidopsis Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs) MPK3, MPK4, and MPK6”. *Molecular & Cellular Proteomics* 17, č. 1 (január 2018): 61–80. <https://doi.org/10.1074/mcp.RA117.000135>.
- Samaj, Jozef, Miroslav Ovečka, Andrej Hlavacka, Fatma Lecourieux, Irute Meskiene, Irene Lichtscheidl, Peter Lenart, et al. “Involvement of MAP kinase SIMK and actin cytoskeleton in the regulation of root hair tip growth”. *Cell Biology International* 27, č. 3 (2003): 257–59. [https://doi.org/10.1016/S1065-6995\(02\)00344-X](https://doi.org/10.1016/S1065-6995(02)00344-X).

- Sangwan, Veena, Björn Lárus Örvar, John Beyerly, Heribert Hirt, a Rajinder S. Dhindsa. “Opposite Changes in Membrane Fluidity Mimic Cold and Heat Stress Activation of Distinct Plant MAP Kinase Pathways”. *The Plant Journal* 31, č. 5 (2002): 629–38. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01384.x>.
- Stanko, Vera, Concetta Giuliani, Katarzyna Retzer, Armin Djamei, Vanessa Wahl, Bernhard Wurzinger, Cathal Wilson, Erwin Heberle-Bors, Markus Teige, a Friedrich Kragler. “Timing Is Everything: Highly Specific and Transient Expression of a MAP Kinase Determines Auxin-Induced Leaf Venation Patterns in Arabidopsis”. *Molecular Plant* 7, č. 11 (01. november 2014): 1637–52. <https://doi.org/10.1093/mp/ssu080>.
- Šamaj, J., Ovecka, M., Hlavacka, A., Lecourieux, F., Meskiene, I., Lichtscheidl, I., Lenart, P., Salaj, J., Volkmann, D., Bögre, L., Baluška, F. and Hirt, H. (2002), Involvement of the mitogen-activated protein kinase SIMK in regulation of root hair tip growth. *The EMBO Journal*, 21: 3296-3306. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf349>
- Šamajová, Olga, George Komis, a Jozef Šamaj. “Emerging topics in the cell biology of mitogen-activated protein kinases”. *Trends in Plant Science* 18, č. 3 (2013): 140–48. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.11.004>.
- Wang, Chaofeng, Weiwei Liu, Guangda Wang, Jun Li, Li Dong, Libo Han, Qi Wang, et al. “KTN80 Confers Precision to Microtubule Severing by Specific Targeting of Katanin Complexes in Plant Cells”. *The EMBO Journal* 36, č. 23 (december 2017): 3435–47. <https://doi.org/10.15252/emboj.201796823>.
- Wang, Pengwei, Tim J Hawkins, a Patrick J Hussey. “Connecting Membranes to the Actin Cytoskeleton”. *Current Opinion in Plant Biology*, 40 Cell Biology 2017, 40 (01. december 2017): 71–76. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.07.008>.
- Xiaomin Liu, Tao Qin, Qianqian Ma, Jingbo Sun, Ziqiang Liu, Ming Yuan, Tonglin Mao, Light-Regulated Hypocotyl Elongation Involves Proteasome-Dependent Degradation of the Microtubule Regulatory Protein WDL3 in Arabidopsis, *The Plant Cell*, Volume 25, Issue 5, May 2013, Pages 1740–1755,
- Sidney L. Shaw et al. , Sustained Microtubule Treadmilling in Arabidopsis Cortical Arrays. *Science* **300**, 1715–1718 (2003). DOI: [10.1126/science.1083529](https://doi.org/10.1126/science.1083529)

## 9 Hypertextové odkazy

Ref.1 <https://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?id=30552&type=locus> ( navštívené 15.4.2022)

Ref.2 <https://sequenceserver.legumeinfo.org/> ( navštívene 16.2.2023)

Ref.3

[https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&BLAST\\_SPEC=blast2seq&LINK\\_LOC=blasttab&LAST\\_PAGE=blastp&BLAST\\_I\\_NIT=blast2seq](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=blast2seq&LINK_LOC=blasttab&LAST_PAGE=blastp&BLAST_I_NIT=blast2seq) ( navštívené 16.2.2023)

Ref.4. <https://medicago.legumeinfo.org/tools/> ( navštívené 16.2.2023)

Ref.5 <https://medicago.legumeinfo.org/jbrowse2/medicago/?session=local-h4bYE16yX> ( navštívené 16.2.2023)

Ref.6 <https://www.thermofisher.com/sk/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html> (navštívené 16.2.2023)

Ref.7 <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html> (navštívené 16.2.2023)

## 10 Zoznam obrázkov

Obrázok 1 Schematické zobrazenie mikrotubulu. ....	11
Obrázok 2 Schématické zobrazenie tvorby GTP čiapočky.....	12
Obrázok 3 č. : Výsledok gélovej elektroforézy pre overenie genomickej DNA .....	27
Obrázok 4. Výsledok gélovej elektroforézy pre overenie cDNA . ....	28
Obrázok 5. :Porovnávanie tranzientnej transformácie listov <i>N. benthamiana</i> .....	30
Obrázok 6 detailný pohľad na interakciu MPK4 a KTN1 s mikrotubulmi.....	31
Obrázok 7 Overenie konštruktu <i>35S::tagRFP-TUA6</i> . ....	33