

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

Prírodovedecká fakulta

Katedra biotechnológií



**Vývinové úlohy kataninu a MAPK kaskád v Lucerne sietej**

**BAKALÁRSKA PRÁCA**

Autor:	<b>Martina Omachelová</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 vypracovala 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. Bola 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.



## **Pod'akovanie**

Na prvom mieste by som hlavne rada poďakovala svojmu vedúcemu bakalárskej práce pánovi Mgr. Ivanovi Luptovčiakovi, Ph.D. za odborné vedenie, čas a rady pri vypracovaní tejto bakalárskej práce. Taktiež by som chcela poďakovať kolektívu Katedry biotechnológií za ich prívetivý a vľúdny prístup rovnako ako aj ochotu pri počiatočných praktických pokusoch. Rada by som poďakovala svojej rodine a blízkym za podporu pri vypracovaní bakalárskej práce a počas štúdia.

Tato práce vznikla za podpory projektu „Rostliny jako prostředek udržitelného globálního rozvoje“, reg. č.: CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/0000827 financovaného z EFRR.

## Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora	Martina Omachelová
Názov práce	Vývinové úlohy kataninu a MAPK kaskád v Lucerne siatej
Typ práce	Bakalárska
Pracovisko	Katedra biotechnológií
Vedúci práce	Mgr. Ivan Luptovčíak, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2023

### Abstrakt

Táto bakalárska práca bola zameraná na štúdium proteínu kataninu a vybraných mitogénom aktivovaných proteín kináz (MAPKs) v *Arabidopsis thaliana* konkrétne MPK4 a MPK6 a ich ortológoch v *Medicago sativa* MMK2 a SIMK. Katanin je heterodimérny proteín, ktorého primárnou funkciou je oddeľovanie mikrotubulov, čím reguluje ich organizáciu v bunke. Mitogénom aktivované proteín kinázy sú skupinou transferáz, ktoré tvoria hlavné regulačné moduly v bunkách v odpovedi na stresové faktory, rovnako ako aj na vývojové podnety a ďalšie stimuly. Bolo potvrdené, že MPK4 reguluje KTN1. Tranzientnou transformáciou listov *N. benthamiana* prostredníctvom *Agrobacterium tumefaciens* bola skúmaná potenciálna interakcia MPK4 a KTN1, prostredníctvom programu ImageJ boli uskutočnené analýzy tejto navrhovanej interakcie. Ďalšou časťou bakalárskej práce boli fenotypové analýzy, v rámci fenotypových analýz bolo otestovaných niekoľko protokolov zameraných na štúdium vývojových štádií embryí a umiestnenia polárnej a vaječnej bunky v embryonálnom vaku *A. thaliana* a *M sativa*.

Kľúčové slová	<i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Medicago sativa</i> , katanin, mikrotubuly, MAPK kinázy, MPK4, MPK6, SIMK, fenotypové analýzy, embryá, vývojové štádia
Počet strán	62
Počet príloh	0
Jazyk	Slovenský

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Martina Omachelová
Title	The developmental roles of katanin and MAPK cascades in alfalfa
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Biotechnology
Supervisor	Mgr. Ivan Luptovčíak, Ph.D.
The year of presentation	2023

### Abstract

This bachelor thesis focuses on the study of the protein katanin and the selected mitogen activated protein kinases (MAPKs) in *Arabidopsis thaliana* specifically MPK4 and MPK6 and their orthologs in *Medicago sativa* MMK2 and SIMK. Katanin is an heterodimeric protein whose primary function is to separate microtubules thus regulating their organization in the cell. Mitogen-activated protein kinases are a group of transferases that form the main regulatory modules in cells in response to stress factors as well as developmental cues and other stimuli. It was previously suggested that MPK4 regulated KTN1. This possible interaction between MPK4 and KTN1 was analysed in transiently transformed *N. benthamiana* leaves through *Agrobacterium tumefaciens* by using image analysis of this putative interaction and it was conducted using the ImageJ program. Another part of the bachelor's thesis involved phenotypic analyses and several protocols were tested to study the developmental stage of the embryos and the positioning of the polar and egg cells in the embryonic sac of *A. thaliana* and *M. sativa*.

Keywords	<i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Medicago sativa</i> , katanin, microtubules, MAPK kinases, MPK4, MPK6, SIMK, phenotypic analysis, embryos, developmental stages
Number of pages	62
Number of appendices	0
Language	Slovak

## OBSAH

1	ÚVOD .....	1
2	SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY .....	2
2.1	Základná charakteristika cytoskeletu a mikrotubulov .....	2
2.1.1	Nukleácia mikrotubulov .....	3
2.1.2	Dynamika mikrotubulov .....	4
2.1.3	Proteíny asociované s mikrotubulmi .....	6
2.2	Katanin .....	7
	.....	8
2.2.1	Celulárne funkcie kataninu .....	8
2.2.2	Funkcia kataninu vo vývoji embrya a vzniku semena .....	10
2.3	Mitogénom aktivované proteínové kinázy .....	12
2.4	Mitogénom aktivované proteín kinázy v <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	16
2.4.1	MPK3 .....	16
2.4.2	MPK4 .....	17
2.4.3	MPK6 .....	18
2.5	MAP kinázy v Lucerne siatej .....	19
2.5.1	MAP kináza SAMK .....	19
2.5.2	MAP kináza MMK2 .....	20
2.5.3	MAP kináza SIMK .....	20
3	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ .....	21
3.1	Materiál .....	21
3.1.1	Použité chemikálie .....	21
3.1.2	Roztoky a média .....	22
3.1.3	Biologický materiál .....	26
3.2	Použité prístroje .....	27
3.3	Software .....	28
3.4	Metodika .....	28
3.4.1	Príprava <i>in vivo</i> preparátov smenenáčikov <i>A. thaliana</i> mCherry-TUA6 a GFP-FABD2 v <i>ktn1-2</i> .....	28
3.4.2	Príprava <i>in vivo</i> preparátov divokého typu <i>A. thaliana</i> a mutantnej línie kataninu <i>A. thaliana</i> .....	29
3.4.3	Tranzientná transformácia listov <i>Nicotiana bethamiana</i> .....	30
3.4.4	Somatická embryogenéza .....	32
3.4.5	Fenotypové analýzy .....	33

4	VÝSLEDKY .....	36
4.1	<i>In vivo</i> sledovanie organizácie mikrotubulov v bunkách hypokotylu <i>A. thaliana</i> Col-0 a <i>ktn1-2</i> exprimujúcich <i>mCherry-TUA5</i> a <i>GFP-FABD2</i> .....	36
4.2	Tranzientná transformácia listov .....	38
4.3	Somatická embryogenéza línie <i>35S::tagRFP:TUA6</i> .....	42
4.4	Fenotypové analýzy .....	43
4.4.1	Trvalé preparáty embryí a vajíčok divokého typu rastlín <i>A. thaliana</i> a <i>M. sativa</i> RSY .....	43
4.4.2	Štvornásobné farbenie piestikov .....	45
4.4.3	<i>In vivo</i> mikroskopické pozorovanie embryí <i>A. thaliana</i> v Col-0 exprimujúcich GFP-KTN1 a mCherry-TUA5 .....	46
5	DISKUSIA .....	49
6	ZÁVER .....	52
7	REFERENCIE .....	53
8	ZOZNAM SKRATIEK .....	62
9	ZOZNAM OBRÁZKOV .....	64
10	ZOZNAM TABULIEK.....	65

## Ciele práce

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

### Teoretická časť bakalárskej práce

1. Prehľad publikácií o proteíne katanin p60 (katalytická funkcia, AtKTN1) a tiež katanin p80 (regulačná funkcia, 4 podjednotky) v *Arabidopsis thaliana* a taktiež jeho ortológoch predovšetkým v *M. sativa* a *M. truncatula*. Taktiež prehľad o ďalších MAPs a ich úlohách v regulácii cytoskeletu.
2. Prehľad publikácií o mitogen aktivovaných kinázach v *M. sativa* a ich ortológoch v *M. truncatula*, *A. thaliana*. Prehľad signálnych dráh MAPK so zameraním na úlohy PRKK a SAMK pri vývine a odpovedi na stres a taktiež v súvislosti s reguláciou cytoskeletu.

### Praktická časť bakalárskej práce

1. Tranzientná (ko-) transformácia *Nicotiana benthamiana*. Testovanie možnej interakcie KATANIN1 a MPK4 pomocou sledovania organizácie a dynamiky mikrotubulov prostredníctvom metódy bimolekulárnej fluorescenčnej komplementácie (Bimolecular Fluorescence Complementation, BiFC).
2. Somatická embryogenéza línie 35S::*tagRFP:TUA6* *M. sativa* a prezentovanie výsledkov úspešnosti somatickej embryogenézy.
3. Porovnávanie fenotypov transgénnych rastlín oproti divokému typu a to sledovanie organizácie mikrotubulov v jednotlivých embryonálnych štádiách stabilných kataninových mutantných línií *A. thaliana*, ďalej testovanie protokolu štvornásobného farbenia piestikov.

# 1 ÚVOD

Mikrotubuly sú dynamickou časťou rastlinného cytoskeletu, sú zložené z dvoch monomérnych podjednotiek  $\alpha$ - a  $\beta$ -tubulínu, ktoré tvoria heterodimér. Polymerizáciou týchto podjednotiek vzniká protofilament, pričom zoskupením 13 protofilamentov vzniká mikrotubulus. Mikrotubuly sú esenciálnou zložkou cytoskeletu rastlinných buniek, zabezpečujú umiestnenie organel na špecifické miesta v bunkách, taktiež sa zúčastňujú procesu bunkového delenia a rozdelenia chromozómov počas mitotického delenia buniek, rovnako zohrávajú rolu pri procese morfogénézy. Mikrotubuly sú regulované skupinou proteínov nazývaných proteíny asociované s mikrotubulmi, medzi ktoré spadá napríklad proteín katanin. Katanin je heterodimérny proteín, ktorý sa skladá z dvoch monomérnych podjednotiek a to katalytickej podjednotky p60 a regulačnej podjednotky p80. Hlavnou funkciou kataninu je oddeľovanie mikrotubulov, ku ktorému dochádza v procese hexamerizácie podjednotky p60. Katanin týmto spôsobom reguluje organizáciu mikrotubulov, čím vplýva na procesy delenia buniek, orientácie bunkového delenia a taktiež procesu elongácie buniek. Bola potvrdená účasť kataninu na vývojových procesoch, konkrétne embryogenézy. Mitogénom aktivované proteín kinázy je skupina transferáz, ktoré fungujú vo forme hierarchicky usporiadaných kaskád, sú esenciálnou súčasťou regulácie bunkových procesov v odpovedi na rôzne stresové faktory biotického alebo aj abiotického pôvodu, rovnako sa zúčastňujú regulácie vývojových procesov v odpovedi na určité stimuly. V praktickej časti bakalárskej práce bola otestovaná interakcia proteínov MPK4 a KTN1 a následne boli uskutočnené analýzy tejto interakcie. Súčasťou praktickej časti bakalárskej práce boli fenotypové analýzy, ktorý cieľom bolo preskúmať vplyv vybraných MAPKs a kataninu v *A. thaliana* a vybraných ortológoch daných MAPKs v *M. sativa* na jednotlivé vývojové štádia embryí.

## 2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

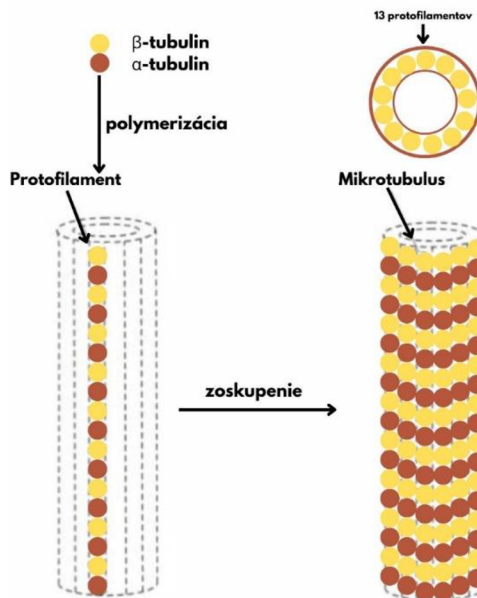
### 2.1 Základná charakteristika cytoskeletu a mikrotubulov

Mikrotubuly sú proteínové vlákna, ktoré sú súčasťou cytoskeletu. Prvýkrát boli identifikované v roku 1963, kedy boli pomocou transmisnej elektrónovej mikroskopie získané obrázky dutých vlákien (Slautterback, 1963; Ledbetter a Porter, 1963; Takashi Hashimoto, 2015). Následne boli objavené kortikálne mikrotubuly, t.j. mikrotubuly nachádzajúce sa tesne pod cytoplazmatickou membránou. V tomto období bolo zistené, že kortikálne mikrotubuly paralelne zarovnávajú celulóзовé mikrofibrily v bunkovej stene rastlín. Tento objav bol významný hlavne z toho dôvodu, že dovtedy bol cytoskelet vnímaný ako statická časť buniek. Vďaka tomuto objavu začal byť cytoskelet vnímaný ako dynamická štruktúra (Horio a Hotani, 1986; Takashi Hashimoto, 2015).

V rastlinných bunkách je cytoskelet sieť zložená z dvoch hlavných zložiek a to spomenutých mikrotubulov a aktínových filamentov. Tieto dve základné zložky sú proteínové polymery (Petrášek a Schwarzerová, 2009). Aktínové filamenty majú menší priemer a to 8 nm (Julien Berro *et al.*, 2007; Laurent Blanchoin *et al.*, 2013), zatiaľ čo mikrotubuly sú najhrubšími vláknami s priemerom 24 nm (Ledbetter a Porter, 1964; Takashi Hashimoto, 2015). Aktínové filamenty sa skladajú z dvoch hlavných proteínových komponentov a to globulárneho G-aktínu a fibrilárneho F-aktínu (Roberto Domínguez a Kenneth C. Holmes, 2011). Naopak základnými dvoma komponentami mikrotubulov sú  $\alpha$ - a  $\beta$ -tubulín. Tieto dva globulárne proteíny vytvárajú heterodimér, ten je základnou stavebnou jednotkou mikrotubulu. Jednotlivé heterodimery sa pozdĺžne na seba naviažu, čiže dochádza k polymerizácii, ktorej výsledkom je plnohodnotné vlákno mikrotubulu nazývané protofilament. Jednotlivé podjednotky tubulínu sú spojené prostredníctvom nekovalentných väzieb, pričom každá tubulínová podjednotka obsahuje vo svojej štruktúre 2 miesta na naviazanie GTP. Tieto dve miesta sa nazývajú N-site v  $\alpha$ -tubulíne a E-site v  $\beta$ -tubulíne. N-site GTP sa nachádza vo vnútri štruktúry heterodiméru tubulínu, GTP spĺňa v tomto prípade štruktúrnu funkciu a nie je hydrolyzované. E-site GTP sa nachádza na povrchu heterodiméru, ktorý nie je polymerizovaný, alebo na tubulínových podjednotkách plus konca vlákna mikrotubulu, v tomto prípade dochádza k hydrolyze čím vplýva na proces polymerizácie (Hashimoto, 2015). Následne je potrebné, aby sa trinásť protofilamentov zoskupilo, vďaka čomu dochádza k vzniku jedného



mikrotubulu. Jednotlivé protofilamenty sú vďaka striedaniu jednotiek  $\alpha$ -tubulínu a  $\beta$ -tubulínu štruktúrne polárne. Plus koniec vlákna je ten, ktorý je zakončený  $\beta$ -tubulínom, mínus koniec je naopak zakončený  $\alpha$ -tubulínom. Monoméry  $\alpha$ -tubulínu a  $\beta$ -tubulínu jedného protofilamentu sa navzájom viažu s monomermi druhého



Obrázok 1: Schéma vzniku mikrotubulu zoskupením 13 protofilamentov zložených zo základných jednotiek  $\alpha$ - a  $\beta$ -tubulín prostredníctvom ich polymerizácie, upravené podľa URL1

protofilamentu. Jednotlivé protofilamenty mikrotubulu sú medzi sebou vzájomne viazané vďaka laterálnym interakciám (Takashi Hashimoto, 2015).

### 2.1.1 Nukleácia mikrotubulov

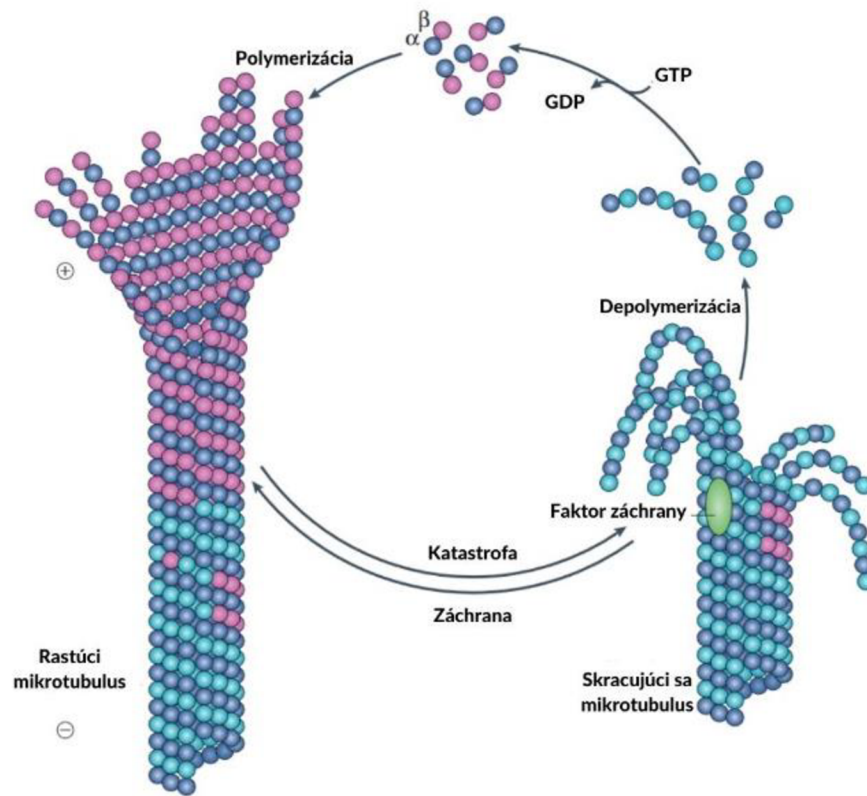
Nukleácia mikrotubulov je proces pri ktorom dochádza k vzniku nových mikrotubulov z už existujúcich mikrotubulov (Nakamura *et al.*, 2010). K tomuto procesu dochádza v miestach, ktoré sa nazývajú mikrotubulárne organizačné centrá, microtubule organizing centres (MTOCs). Rastlinné bunky na rozdiel od živočíšnych buniek, ktoré majú centrozóm, majú tieto organizačné centrá rozptýlené v rámci bunky, k nukleácii môže dôjsť na povrchu plastidov, v jadrovom obale alebo cytosolovej strane cytoplazmatickej membrány (Lee a Liu, 2019). Pravdepodobnosť spontánnej nukleácie a polymerizácie mikrotubulov je nízka a to hlavne z toho dôvodu, že vo vnútri bunky nie je dostatočná koncentrácia tubulínu. Hlavný faktor, ktorý vplýva na proces nukleácie je MT-nukleačný faktor  $\gamma$ -tubulín.  $\gamma$ -tubulín spolu s 5 proteínmi, ktoré sú si štruktúrne podobné a spolu sa označujú ako  $\gamma$ -tubulín

komplex proteíny, GCPs, vytvárajú funkčný komplex  $\gamma$ -tubulínu, ktorý sa nazýva  $\gamma$ -tubulín prstencový komplex,  $\gamma$ TuRC, je to komplex, ktorý je konzervovaný medzi eukaryotmi. Skladá sa zo 6-7  $\gamma$ -tubulínových malých komplexov,  $\gamma$  TuSC a z veľkých podjednotiek a to GCP4, GCP5, GCP6, NEDD1 a MOZART.  $\gamma$ -tubulínové malé komplexy zahŕňajú dve kópie  $\gamma$ -tubulínu a GCP2 a GCP3 (Hamada *et al.*, 2014). Hlavnou funkciou komplexu  $\gamma$ TuRC je ukotvenie nového mikrotubulu, keďže tento komplex funguje ako nukleačný templát. Pri procese nukleácie sa najprv  $\gamma$ -tubulín komplexy presúvajú pozdĺž existujúcich mikrotubulov, pričom dochádza k ich aktivácii. Aktivovaný funkčný komplex  $\gamma$ -tubulín následne aktivuje proces nukleácie nového mikrotubulu. Existujú dva spôsoby akými sa syntetizujú nové mikrotubuly prostredníctvom  $\gamma$ -tubulín komplexu, buď dochádza k syntéze pod uhlom  $40^\circ$  k existujúcemu mikrotubulu alebo môžu nové mikrotubuly vznikať paralelne k pôvodnému mikrotubulu.

### 2.1.2 Dynamika mikrotubulov

Jednou z hlavných charakteristických vlastností mikrotubulov je dynamická nestabilita. Dynamická nestabilita je schopnosť mikrotubulov podliehať cyklom rýchleho rastu a rozloženia. Jednotlivé mikrotubuly podliehajú striedaniu dvoch stavov a to buď polymerizácie, kedy dochádza k rastu, alebo depolymerizácie, kedy dochádza k skracovaniu mikrotubulu (Conde a Cáceres, 2009). Proces dynamickej nestability je závislý na GTP (Kent a Lele, 2017). V roku 1986 bol uskutočnený experiment, pri ktorom bol po prvýkrát zaznamenaný *in vitro* rast mikrotubulov. Pri tomto experimente bolo zaznamenané, že plus koniec protofilamentu rástol 10x rýchlejšie ako mínus koniec protofilamentu, navyac boli zaznamenané striedanie fáz rastu a rozloženia mikrotubulu (Vade, 2009). Plus koniec mikrotubulu a mínus koniec mikrotubulu prejavujú rozdielne vlastnosti vzhľadom na proces dynamickej nestability. Kedy plus koniec vlákna mikrotubulu rastie rýchlejšie a častejšie podlieha procesu katastrofy než mínus koniec. Naopak mínus koniec je charakteristicky chránený proteínmi alebo naviazaný na bunkovú štruktúru. Akonáhle je odhalený rovnako ako plus koniec podlieha dynamickej nestabilite. Prechod z fázy rastu do fázy depolymerizácie mikrotubulu sa nazýva katastrofa, pričom prechod z fázy skracovania do fázy rastu sa nazýva záchrana (obr.2). Pri proces polymerizácie dochádza k naviazaniu GTP na  $\beta$ -tubulín na nukleotidovom vymeniteľnom mieste, E-mieste. Dynamická nestabilita je esenciálna pre splnenie biologických funkcií

mikrotubulov, to vďaka rýchlej reorganizácii mikrotubulov rovnako ako aj priestorovej a dočasnej reorganizácii v súlade s bunkovým kortexom (Conde a Caceres, 2009).



Obrázok 2: Hlavné procesy dynamickej nestability mikrotubulov, kedy dochádza k striedaniu dvoch stavov a to polymerizácie, čiže rastu mikrotubulu a depolymerizácie alebo rozkladaniu mikrotubulu (upravené podľa Akhmanova *et al.*, 2015)

Aktínové filameny a mikrotubuly sa zúčastňujú prakticky všetkých intracelulárnych procesov v eukaryotických bunkách, týchto procesov sa zúčastňujú buď nezávisle od seba alebo v mnohých procesoch spolu interagujú a zúčastňujú sa na nich spoločne (Petrášek a Schwarzerová, 2009). Na správne fungovanie týchto procesov je nutná účasť signálnych molekúl a ďalších motorických proteínov. S aktínovými filamentami interagujú motorické proteíny a myozíny (Laurent Blanchoin *et al.*, 2013). Mikrotubuly interagujú napríklad s kinezínmi a dyneínmi (Jennifer L. Ross *et al.*, 2008). Medzi hlavné bunkové procesy, ktorých sa zúčastňujú tieto dve základné zložky cytoskeletu, je vznik mitotického vretienka, cytokinetického aparátu a intracelulárneho transportu. Napríklad na aktínových

filamentoch je závislé prúdenie cytoplazmy, kým umiestnenie organel, konkrétne kompartmentalizácia Golgiho aparátu a endoplazmatického retikula a pohyb organel je závislý od mikrotubúl. Rovnako ako stabilizovanie plastidov a mitochondrií s ktorým je spojená funkcia špecifických kinezínov a taktiež prenos vezikúl pri endocytóze (McNally a Vale, 1993). V prípade živočíšnych eukaryotických buniek je pohyb cytoplazmy rovnako ako aj pohyb organel riadený hlavne aktínovým cytoskeletom (Shimmen, 2007; Onelli *et al.*, 2015). Okrem toho že mikrotubuly zabezpečujú správnu morfológiu organel a ich správne umiestnenie na konkrétne miesta v bunkách, taktiež sa zúčastňujú bunkového delenia a morfogenézy. Vďaka mikrotubulom sú bunky schopné nadobudnúť finálny tvar, vďaka ktorému vedia vykonávať ich špecifické funkcie. Okrem týchto funkcií sa mikrotubuly podieľajú taktiež na zostavení bunkovej steny, tým že kontrolujú transport enzýmov zúčastňujúcich sa na syntéze celulózy. Počas mitotického delenia zohrávajú mikrotubuly fundamentálnu rolu pri správnom rozdelení chromozómov (McNally a Vale, 1993). Expanzia buniek, ktoré rastú vo vrcholoch a taktiež difúzne rastúcich bunkách, je umožnená vďaka koordinácii aktínových filamentov a mikrotubulov v kortikálnych častiach cytoplazmy (Petrášek a Schwarzerová, 2009). Pri vývojových procesoch rastlín hrajú dôležitú rolu kortikálne mikrotubuly, ktoré sú zoskupené v zväzkoch nachádzajúcich sa v kortexe bunky. Organizácia kortikálnych mikrotubulov je spojená s funkciou proteínu katanínu (Stoppin-Mellet *et al.*, 2006).

### **2.1.3 Proteíny asociované s mikrotubulmi**

Proteíny asociované s mikrotubulmi (microtubule associated proteins, MAPs) je rodina proteínov, ktorá je zodpovedná za organizáciu kortikálnych mikrotubulov. Do rodiny proteínov asociovaných s mikrotubulmi spadá už spomínaný  $\gamma$ -tubulinový komplex s nukleačnou funkciou. Ďalším dôležitým proteínom asociovaným s mikrotubulmi je komplex augminu. Komplex augminu má esenciálnu funkciu pri distribúcii a organizácii  $\gamma$ -tubulinového komplexu v mitotickom vretienku a fragmoplaste. AUG8 je komponent augminu špecifický pre rastliny. AUG8 zohráva úlohu pri organizácii kortikálnych mikrotubulov. Kinezín je motorický proteín s konzervovanou štruktúrou v eukaryotách. Aktivita kinezínu spočíva v jeho motorickej doméne, vďaka ktorej dochádza k hydrolýze ATP, prostredníctvom čoho dochádza k premene energie z hydrolýzy na mechanickú prácu. Okrem motorickej domény obsahuje aj veľké množstvo iných domén, ktoré sú zodpovedné za jeho ďalšie funkcie ako napríklad regulácia alebo transport „cargu“

proteínov. Charakteristickými funkciami kinezínu je transport, organel alebo depolymerizácia a zväzovanie mikrotubulov (Hamada, 2014).

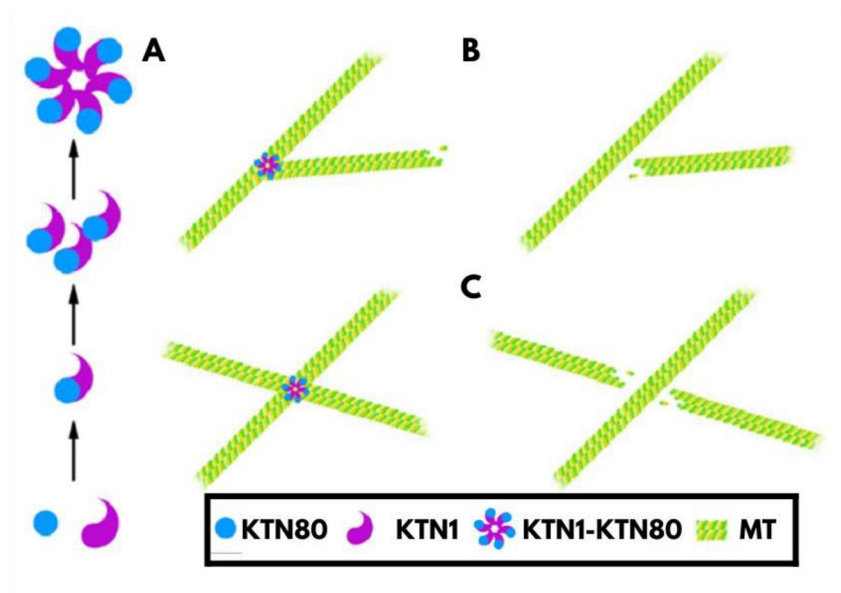
## 2.2 Katanin

Aktivita katanínu bola prvýkrát popísaná v mitotickom extrakte vajíčok Pazúrnatky vodnej, *Xenopus laevis*, kedy bolo objavené pozdĺžne oddeľovanie mikrotubulov (Vale, 1991). Následne bol identifikovaný proteín katanin prostredníctvom purifikácie z vajíčok ježovky (McNally a Vale, 1993). V Arábovke thalovej bol objavený prvý rastlinný homológ katalytickej podjednotky p60 katanínu. Katanin je fundamentálny regulátor mikrotubulov v rastlinných bunkách, ale je prítomný aj v živočíšnych bunkách. Okrem katanínu sa na regulácii cytoskeletu podieľajú aj iné proteíny a to FIDGETIN (Girard *et al.*, 2015) a SPASTIN (Gardiner, 2014), ktoré spadajú do rovnakej proteínovej rodiny ako katanin, ale sú menej preskúmané než katanin (Luptovčiak *et al.*, 2017a).

Katanin je proteín, ktorého funkciou je oddeľovanie mikrotubúl, čím vplýva na ich organizáciu. Je to heterodimérny proteín, skladá sa z dvoch monomérov a to z katalytickej podjednotky p60 a regulačnej podjednotky p80. Katalytická podjednotka p60 spadá medzi AAA ATPázy (Burk *et al.*, 2001; Luptovčiak *et al.*, 2017a). AAA ATPázy sú rozsiahla rodina enzýmov, pre ktorú je charakteristická účasť na mnohých celulárnych procesoch vrátane proteínovej degradácie, indukcie zmien v konformácii rôznych substrátov, konkrétne proteínov a polynukleotidov. Vďaka tejto funkcii sú ATPázy schopné účasti na rozsiahlom počte celulárnych procesov. Pre túto rodinu enzýmov je typická prítomnosť jednej alebo dvoch konzervovaných ATP-viažucich domén. Sú to enzýmy, ktoré hydrolyzujú ATP na ADP a anorganický fosfát. Pri hydrolyze dochádza k uvoľneniu energie, tá sa využíva na poháňanie chemických procesov, takže v prípade katanínu na oddeľovanie mikrotubulov (Bar-nun a Glickman, 2012).

Mikrotubuly podnecujú aktivitu katalytickej podjednotky p60. V prvom kroku procesu oddeľovania mikrotubulov musí dôjsť k hexamerizácii na ich povrchu. Hexamerizácia je proces, pri ktorom dochádza k oligomerizácii podjednotky p60, pričom vzniká hexamer vo forme kruhu. V prípade rastlinných buniek je na oddeľovaciu funkciu dostačujúca katalytická podjednotka p60, ale pri oddeľovaní mikrotubulov na špecifických miestach je potrebná aktivita 4 odlišných regulačných

podjednotiek p80. Naopak v prípade živočíšnych buniek je aktivita katalytickej podjednotky p60 stimulovaná regulačnou podjednotkou p80. V oboch prípadoch je ale esenciálna prítomnosť nukleotidov, bez ktorej by proces neprebehol (McNally a Vale, 1993). Súčasťou regulačnej podjednotky p80 je WD40 doména, WD40 je proteínová doména v tvare solenoidu zložená zhruba zo 40 aminokyselín. Katanin ovplyvňuje mnoho biologických procesov od bunkových procesov, konkrétne remodelovania cytoskeletu, predlžovania buniek, regulácie mitózy a orientácie bunkového delenia až po vplyvovanie na vývojové a fyziologické procesy. Rastlinné hormóny regulujú funkciu kataninu a tým vplyvajú na organizáciu mikrotubúl (Luptovčiak *et al.*, 2017a).



Obrázok 3: Schéma vzniku komplexu kataninu (A), podjednotky p60 KTN1 a podjednotky p80 KTN80, ktoré vytvárajú heterodimer KTN1-KTN80 a schéma spôsobu akým katanin oddeľuje mikrotubuly, a to buď v mieste kde dochádza k rozvetvovaniu mikrotubulu prostredníctvom nukleácie (B) alebo v mieste kde sa mikrotubuly prekrížia (C), upravené podľa Wang *et al.* (2017)

### 2.2.1 Celulárne funkcie kataninu

Na úrovni buniek je jednou z esenciálnych funkcií kataninu usporiadanie kortikálnych mikrotubulov, vďaka čomu dochádza k ich paralelnému usporiadaniu. Kortikálne mikrotubuly sú schopné reorganizovať sa v krátkom čase. V prvom rade zachytia hormonálny alebo fyzický stimul, vďaka týmto stimulom dochádza k rastu určitým smerom. Táto funkcia kortikálnych mikrotubulov je podstatná pri usmernení bunkového rastu počas vývojových procesov rastlín, konkrétne usmerňuje rast

apikálneho meristému ako aj rastu listového primordia (Uyttewaal *et al.*, 2012; Luptovčiak *et al.*, 2017a). Schopnosť rýchlej reorganizácie kortikálnych mikrotubulov je taktiež významná pri diferenciácii buniek. Počas elongácie kortikálnych mikrotubulov môže dôjsť k ich prekríženiu, jednou zo schopností kataninu je oddeliť takto prekrížené mikrotubuly, vďaka čomu prispieva k ich reorientácii (Wightman a Turner, 2007, 2008; Zhang *et al.*, 2016; Luptovčiak *et al.*, 2017a). Podmienkou pri oddeľovaní takto prekrížených mikrotubulov je špecifický uhol, pod ktorým musia byť prekrížené. Ak nie sú prekrížené pod daným uhlom, predpokladá sa, že dochádza k ich viazaniu (Deinum *et al.*, 2017). Predpokladá sa, že je táto schopnosť kataninu významná pri reorientácii kortikálnych mikrotubulov pomocou etylénu alebo aj modrého svetla (Soga *et al.*, 2010; Lindeboom *et al.*, 2013). Okrem oddeľovania mikrotubulov, ktoré sa krížia, je katanin rovnako potrebný pri oddeľovaní mikrotubulov, ktoré vznikajú už z existujúcich mikrotubulov. Konkrétne katanin slúži na oddeľovanie gama-tubulinu a augminom nukleovaných mikrotubulov (Nakamura *et al.*, 2010).

Keďže je funkcia kataninu spojená z organizáciou mikrotubulov, viacero štúdií sa zaujímalo či katanin vplyva na mitózu a rovinu orientácie bunkového delenia. V mutantných líniah *fra2*, *lue1*, *bot1* a *ktn1-2* bol dokázaný vplyv na polaritu profázového vretienka, konkrétne bola zapríčinená multipolarita, ale nebola dokázaná priama spojitosť na tvorbu mitotického vretienka (Panteris *et al.*, 2011; Panteris a Adamakis, 2012; Luptovčiak *et al.*, 2017a). Pri správnom umiestnení mitotického vretienka je dôležitá rovina preprofázového pásu. Preprofázový pás je sieť kortikálnych mikrotubulov, ktorá vzniká pred začiatkom mitózy. Počas S a G2 fázy sa kortikálne mikrotubuly reorganizujú do prstenca, tento prstenec sa postupne zväčšuje a pred začiatkom mitózy sa rozpadne, zároveň sa rozpadá aj jadrový obal (Vos *et al.*, 2004; Komis *et al.*, 2017). Vďaka čomu na jednu stranu vplyva a usmerňuje orientáciu bunkového delenia a na druhej strane limituje rotáciu mitotického vretienka (Schaefer *et al.*, 2017; Luptovčiak *et al.*, 2017a) V mutantných líniah *ktn1-2* nie je exprimovaný katanín, takže v nich nie je prítomná aktivita kataninu na organizáciu mikrotubulov. V bunkách mutantných líní *ktn1-2* dochádzalo k expanzii fragmoplastu v smere odchýlenej roviny preprofázového pásu. V týchto líniah taktiež dochádzalo k tvorbe odchýleného preprofázového pásu (Komis *et al.*, 2017). V bunkách týchto mutantov bolo preukázané že mikrotubulárny

rast bol výrazne spomalený a nedochádzalo k oddeľovaniu mikrotubulov. Neprítomnosť kataninu zapríčinila zmeny v usporiadaní preprofázového mikrotubulárneho pásu. Katanin je hlavný regulátor, ktorý umožňuje zhromaždenie mikrotubulov počas vzniku a taktiež rozširovania preprofázového pásu, keďže v mutantných liniach *ktn1-2* nie je prítomný katanin, tak v preprofázových bunkách nie je možné vytvoriť a rozširovať preprofázový pás. K rozširovaniu preprofázového pásu dochádza vďaka tomu, že katanin ovplyvňuje dĺžku kortikálnych mikrotubulov, preto v daných bunkách bol narušený nie len tvar ale aj organizácia a pozícia preprofázového pásu (Luptovčíak *et al.*, 2017a).

### 2.2.2 Funkcia kataninu vo vývoji embrya a vzniku semena

Okrem vplyvu kataninu na rovinu bunkového delenia, vzniku a rozpadu preprofázového pásu a reorganizáciu kortikálnych mikrotubulov, bolo dokázané že katanin vplýva na embryogenézu a vznik semena v *Arabidopsis thaliana* (Luptovčíak *et al.*, 2017b). V danej štúdií boli využité tri mutantné línie kataninu 1 v *Arabidopsis thaliana*, konkrétne *fra2*, *lue1* a *ktn1-2*. Všetky tri mutantné línie vykazovali nižšiu produkciu semien a celkovo zníženú fertilitu, rovnako boli pozorované abnormality vo vývoji embrya a semena.

Jednotlivé bunkové typy, tkanivá, orgány sú zoradené v špecifickom vzore už od počiatku embryogenézy, tieto jednotlivé bunkové zoskupenia majú pôvod v jednej počiatkovej bunke. Zoskupenie jednotlivých orgánov vyšších rastlín je determinované už v sadenici. Z toho dôvodu zohráva fundamentálnu rolu pri embryonálnom a post embryonálnom vývoji vzor bunkového delenia (Jürgens a Mayer, 1994; Luptovčíak *et al.*, 2017b). Katanin zohráva rolu aj pri spermatogenéze, keďže na transport spermatid aj bunkových organel je potrebný cytoskelet skladajúci sa zo siete mikrotubul, ktoré umožňujú ich prenos. Pričom sa predpokladá, že pri tom sieť mikrotubulov spolupracuje s aktínovým cytoskeletom (Tang *et al.*, 2013; Luptovčíak *et al.*, 2017b). Mikrotubuly zohrávajú fundamentálnu rolu pri polárnom umiestnení organel, jadra a taktiež transport jadra v embryonálnom vaku, ktorý je vo vývoji (Luptovčíak *et al.*, 2017b).

Ako bolo vyššie spomenuté regulácia vzniku a rozpadu mikrotubulov je esenciálna pri nespočetnom množstve celulárnych procesov, od reorganizácie kortikálnych mikrotubulov, po vplyv na rovinu bunkového delenia a vznik aj rozpad



preprofázového pásu. Vo všetkých týchto procesoch je rozhodujúca funkcia kataninu. Vďaka týmto aspektom je reorganizácia siete mikrotubulov významná taktiež v procesoch diferenciácie buniek a migrácie. Čo naznačuje, že aktivita kataninu by mala zohrávať významnú rolu pri embryogenéze a vzniku semena u vyšších rastlín. V štúdií bolo preukázané, že všetky tri mutantné línie prejavovali zníženú fertilitu. Šešule daných mutantných línií sa vyvíjali iregulárne, tento aberantný vývoj mal pôvod v defektoch, ktoré vznikli pri fertilizácii. Z fenotypového hľadiska boli pozorované skrátené šešule v porovnaní s kontrolnou líniou Col-0 (divý typ). Okrem skrátených šešúľ bol taktiež pozorovaný menší počet vajíčok na šešuľu, taktiež bol pozorovaný väčší počet neoplodnených vajíčok vo všetkých mutantných líniách. Taktiež boli preukázané defekty vo vývoji vajíčka, predpokladá sa že pôvod týchto defektov je v migrácii a nepresným umiestnením jadra a aberantnou fúziou polárneho jadra. Taktiež bol ovplyvnený vývoj prašníkov, okrem toho boli pozorované abnormality vo vývoji embrya, konkrétne mnohopočetné bunkové delenia v raných fázach embryogenézy, čo viedlo k malformovaným embryám. Z hľadiska semien bol preukázaný oveľa nižší počet životaschopných semien v jednotlivých mutantných líniách (Luptovčíak *et al.*, 2017b).

### 2.3 Mitogénom aktivované proteínové kinázy

Mitogénom aktivované proteínové kinázy (MAPK) sú zložkami tvoriacimi MAPK regulačné moduly. MAPK spadajú do skupiny transferáz, pričom ich hlavnou funkciou je fosforylácia konzervovaných serin/treoninových zbytkov cieľového proteínového substrátu. MAPK sa nachádzajú vo všetkých eukaryotických bunkách, konkrétne sa vyskytujú v jadre bunky ale aj v cytoplazme. Keďže sa tieto MAPK moduly vyskytujú medzi všetkými eukaryotmi a to vrátane rastlín, húb aj cicavcov, spadajú medzi najvýznamnejšie regulačné mechanizmy bunky (Zanke *et al.*, 1996; Jagodzík *et al.*, 2018). V roku 1993 boli uskutočnené prvé objavy v oblasti rastlinných MAPK, kedy bola identifikovaná MAPK msERK1 v lucerne siatej (Duerr *et al.*, 1993) a D5 kináza v hrachu (Stafstrom *et al.*, 1993).

V rastlinnej ríši bolo objavené najväčšie množstvo podrodín mitogénom aktivovaných proteínových kináz (Komis *et al.*, 2018). V genóme *Arabidopsis thaliana* bolo nájdených zhruba 110 génov, ktoré slúžia na kódovanie MAPK kaskády. Konkrétne dané gény kódujú 80 MAP kináz kináz kináz (MAPKKK, MAP3K, MEKK), 10 MAP kináz kináz (MAPKK, MAP2K, MKK alebo MEK) a 20 MAPK (Colcombet a Hirt, 2008; Jagodzík *et al.*, 2018).

MAP3K je rozsiahla rodina kináz, delí sa do dvoch podrodín a to MEKK-like a Raf-like podrodina. Rastlinné kinázy, ktoré sa radia do MEKK-like podrodiny sú podobné cicavčím MEKK1 a kinázam STE11 a BCK1, ktoré boli identifikované v kvasinkách. Rastlinné RAF-like kinázy sú viac podobné cicavčím RAF1. MEKK-like kinázy, ktoré boli identifikované v *A. thaliana* sa podieľajú kanonickej MAPK kaskády, ktorá fosforyláciou aktivuje MAP2K. CTR1 (CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1) a EDR1 (ENHANCED DISEASE RESISTANCE 1) sú najviac preštudované RAF-like MAP3K v *A. thaliana* účastnia sa v obranných odpovediach a taktiež signálnych dráhach, ktoré sú indukované etylénom. V prípade týchto Raf-like MAP3K zaitať nie je potvrdená účasť v kanonickej MAPK kaskáde, narozdiel od MEKK-like kináz (Rodrigues *et al.*, 2010).

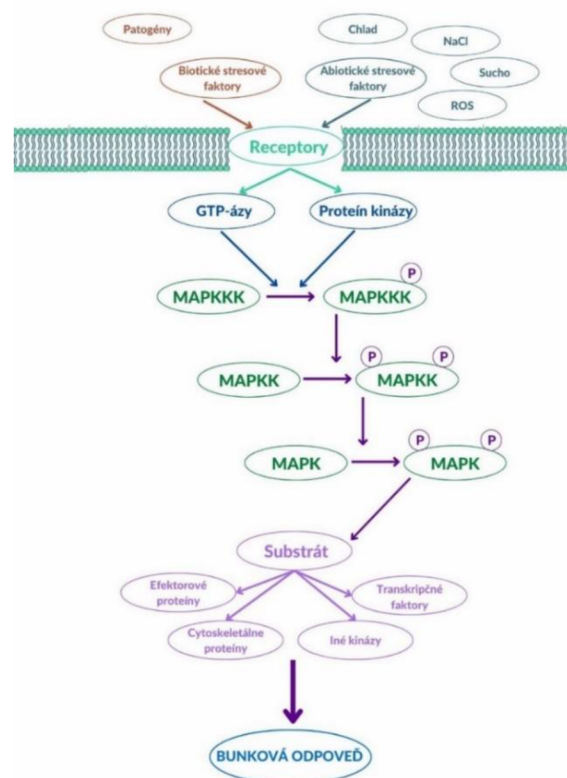
MAP2K sa delia do 4 skupín, A-D. Do skupiny A patrí napríklad MKK1 a MKK2 ktoré fosforyláciou aktivujú MPK4, okrem toho MKK2 sa zúčastňuje signálnej dráhy, ktorá je stimulovaná chladom a osmotickým stresom. MKK1 a MKK2 sa zúčastňujú vrodenej imunitnej odpovedi. Pre skupinu B je charakteristická NTF doména, táto

doména je potrebná pri procese nukleárneho importu „cargo“ proteínov, t.j. proteínov transportovaných prostredníctvom vezikúl. Okrem účasti na cytoplazmaticko-nukleárnom transporte sa MKK3 účastní kaskád, aktivované patogénmi a zároveň sú závislé na signalizácii prostredníctvom kyseliny jasmónovej. Skupina C zahŕňa MKK4 a MKK5 a skupina D zahŕňa zvyšok MKK7 *A. thaliana* (Rodrigues *et al.*, 2010).

Rastlinné MAPK obsahujú, podobne ako živočíšne ERK kinázy, extracelulárnym signálom regulované kinázy, TDY (Thr-Asp-Tyr) alebo TEY (Thr-Glu-Tyr) fosforylačné motívy v aktivačnej smyčke (Rodrigues *et al.*, 2010). V závislosti od kinázovej domény a sekvencie aktivačného motívu TXY sa rastlinné MAPK rozdeľujú do 4 fylogenetických skupín A-D. Do skupiny A, B a C spadajú MAPK, ktoré vo svojej aktivačnej smyčke majú TEY motív. Na rozdiel od skupiny D, ktorá má v aktivačnej smyčke TDY motív. Navyše je pre túto skupinu typická C-terminálna dokovacia doména. Táto doména pravdepodobne slúži ako dokovacie miesto pre MAP2K. Do skupiny A patria napríklad MPK3 a MPK6, rovnako ako aj ich ortológy v tabaku, lucerne siatej alebo ryži. Tieto MAPK sú aktivované biotickými a abiotickými stresovými faktormi, taktiež sa zúčastňujú vývojových procesov, najčastejšie sú spojené v hormonálnych a environmentálnych odpovediach (Ichimura *et al.*, 2002). Skupina B zahŕňa napríklad MPK4. Táto skupina sa zúčastňuje procesu bunkového delenia, taktiež odpovedí na environmentálny stres. Pre MAPK skupiny A a B je charakteristická evolučne konzervovaná dokovacia doména. Dokovacia doména má viacero funkcií, slúži ako dokovacie miesto nielen pre MAPKK ale aj pre proteínové substráty alebo fosfatázy (Rodrigues *et al.*, 2010). TXY motív je motív prítomný v aktivačnej smyčke MAPK a pri aktivácii danej MAPK dochádza k duálnej fosforylácii tohto motívu. MAPK sú esenciálnymi regulačnými komponentmi buniek, keďže sa podieľajú na mnohých celulárnych procesoch ako sú napr. vývoj, rast a reakcia na stres. (Seguí-Simarro *et al.*, 2005; Jagodzík *et al.*, 2018).

Mitogénom aktivované proteínové kinázy fungujú vo forme kaskád, tieto kaskády sa skladajú prevažne z troch hierarchicky usporiadaných kináz MAPKKK, MAPKK, a finálne MAPK, existuje ale aj MAP kináza kináza kináza kináza (MAP4K) (Rodrigues *et al.*, 2010). Na to aby kaskáda bola aktivovaná, musí sa aktivovať MAPKKK, a to prostredníctvom iných proteínových kináz, receptorových kináz, transmembránových receptorov alebo GTP-áz (Komis *et al.*, 2018). Na úplnom počiatku musí dôjsť k transdukcii určitého signálneho stimulu. Na prenos signálu

slúžia receptory, ktoré sa nachádzajú v cytoplazmatickej membráne. Receptory prenášajú signál na spomínané proteínové kinázy alebo GTP-ázy. Následne je prostredníctvom týchto komponentov signál prenesený na MAPKKK. V ďalšom kroku MAPKKK aktivujú MAPKK opäť fosforyláciou dvoch treoninových alebo serínových zbytkov a to prostredníctvom konzervovaného motívu S/T-X<sub>3-5</sub>-S/T. MAPKK je duálne špecifická kináza, aktivuje MAPK fosforyláciou treoninových a tyrozínových zbytkov konzervovaného motívu T-X-Y (Rodriguez *et al.*, 2010; Jagodzik *et al.*, 2018). MAPK spadá medzi serín/treoninové kinázy, medzi ciele aktivovaných MAPK spadajú napríklad efektorové proteíny nachádzajúce sa v jadre alebo v cytoplazme, cytoskeletálne proteíny, transkripčné faktory, iné kinázy alebo enzýmy. Napríklad funkciou cicavčích ERK1 a ERK2 MAPK kináz, ktoré sa predovšetkým nachádzajú v cytoplazme bunky, je fosforylácia špecifických proteínov v cytoplazmatickej membráne do jadra. Po aktivácii ERK1 a ERK2 sú translokované z cytoplazmy do jadra bunky, kde fosforylujú jadrové substráty (Khokhlatchev *et al.*, 1998).



Obrázok 4: Všeobecná schéma MAPK kaskády aktivovanej prostredníctvom abiotických a biotických stresových faktorov. Daný signál je zachytený receptormi v cytoplazmatickej membráne a prostredníctvom GTP-áz alebo iných proteínových kináz a následne je aktivovaná hierarchicky usporiadaná MAPK kaskáda, ktorá finálne aktivuje určitý substrát a ten vyvoláva bunkovú odpoveď na daný stimul, upravené podľa Jagodzik et al. (2018)

MAPK dráhy sú vysoko špecifické dráhy, ich špecificita spočíva na jednu stranu v organizácii týchto 3 členných modulov prostredníctvom tzv. „scaffold“ proteínov a kotviacich proteínov (Garrington a Johnson, 1999). Scaffold proteíny sú veľmi podstatnou súčasťou signálnych dráh a to z toho dôvodu, že spájajú jednotlivé komponenty určitej signálnej dráhy, čím uľahčujú, a taktiež urýchľujú priebeh danej signálnej dráhy. Scaffold proteíny sa skladajú z viacerých proteín-proteín interakčných modulov, vďaka tomu dokážu vykonávať svoju funkciu a usporiadať jednotlivé zložky signálnych dráh (Garbett a Bretscher, 2014). Na druhú stranu v špecificite MAPK kaskád zohráva dôležitú rolu odpoveď na určitý stimul. MAPK kaskády môžu byť aktivované rôznymi stimulmi, medzi ktoré spadajú hormóny, cytokiníny alebo rastové faktory. Okrem týchto stimulov, môže aktivovať určitú MAPK kaskádu stresové faktory. Stresové faktory môžu byť buď biotického alebo abiotického pôvodu. Medzi abiotické stresové faktory, ktoré aktivujú MAPK moduly, spadá napríklad soľný stres, radiácia, reaktívne formy kyslíka, medzi biotické stresové faktory spadajú patogény. Jednotlivé stimuly aktivujú špecifické receptory v cytoplazmatickej membráne, tie následne prenesú signál na spomínané aktivátory MAPKKK (Garrington a Johnson, 1999). MAPK kaskády sú deaktivované pomocou špecifických MAPK fosfatáz defosforyláciou (Komis *et al.*, 2018).

MAPK kaskády hrajú veľmi dôležitú rolu vo vývojových procesoch rastlín, MAPK kaskády kontrolujú nielen embryogenézu ale aj následný postembryonálny rastlinný vývoj a rast. Vyvíjajúca rastlina vie reagovať na externé stimuly podmienok prostredia, tak aby sa na dané zmeny príslušne adaptovala. MAPK moduly zohrávajú významnú rolu pri vývoji a produkcii gamét a vývoji gametofytu. Okrem týchto procesov sú dôležité pri vývoji orgánov počas embryogenézy, a taktiež regulujú následný rast a vývoj orgánov. Bolo preukázané že modul YODA reguluje vývoj embrya po fertilizácii, konkrétne vplýva na prvé asymetrické delenie zygoty a následne na vývoj embrya rovnako ako aj na vývoj suspensoru. WRKY je rodina transkripčných faktorov špecifických pre rastlinnú ríšu, tento transkripčný faktor je finálnym substrátom dráhy YODA (Komis *et al.*, 2018).

## 2.4 Mitogénom aktivované proteín kinázy v *Arabidopsis thaliana*

### 2.4.1 MPK3

MPK3 je jedna z najpreskúmanejších MAPK. Účastní sa v mnohých signálnych dráhach a to v odpovedi na abiotickej ale aj biotické stresové faktory. Okrem odpovedí na stres sa účastní aj vývojových procesov. Je zložkou jednej z prvých identifikovaných MAPK kaskád. Konkrétne je to MAPK kaskáda, ktorá je aktivovaná bakteriálnym flagelinom flg22. Bakteriálny flagelin sa zaradzuje medzi molekulárne vzory asociované s patogénom („pathogen-associated molecular patterns“, PAMPs). Rozpoznávanie PAMPs je súčasťou vrodeneho imunitného systému rastlín. PAMPs sú malé molekuly bežne odvodené zo štruktúry patogénu. Membránové receptory rozpoznávajú PAMPs v rámci niekoľkých minút, po ich identifikácii dochádza následne k modifikácii enzymatickej aktivity v rastlinách a génovej expresie. Pri obrannej reakcii dochádza k syntéze veľko počtu antimikrobiálnych látok vrátane aktívnych foriem kyslíka, active oxygen species (AOS) a fytoalexínov. Rozpoznanie PAMPs nie je špecifické. Rezistencia voči rozličným patogénom zahŕňa taktiež reguláciu a akumuláciu fytohormónov ako napríklad kyselina salicylová, kyselina jasmónová a etylén. V prípade flg22 je v prvom kroku tento bakteriálny elicitor rozpoznávaný receptorovým komplexom FLS2-BAK1. Signál sa následne prenáša na MEKK1 (MAP3K), ktorá následne môže aktivovať dve MAP2Ks a to prevažne MKK4 alebo MKK5. Po prenose signálu na jednu z MAP2K dochádza k prenosu signálu na MPK3 alebo MPK6. Po fosforylácii jednej z MAPK dochádza k indukcii expresie WRKY29 (WRKY DNA-BINDING PROTEIN 29) a FRK1 (FLG22-INDUCED RECEPTOR KINASE1). MPK3 špecificky fosforyluje VIP1 (VirE1-INTERACTING PROTEIN1) a bZIP (basic leucine zipper) transkripčné faktory, vďaka čomu je potom indukovaná expresia obranných génov PR1 (PATHOGEN-RELATED 1) (Colcombert a Hirt, 2008).

MPK3 je taktiež aktivovaná prostredníctvom exogénneho H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. K zachyteniu signálu dochádza prostredníctvom OXI1 (OXIDATIVE-SIGNAL-INDUCED 1) proteín kinázy. K aktivácii MPK3 môže dôjsť dvomi dráhami. Prvou možnosťou je aktivácia ANP1, ktorá downstream aktivuje MKK4 alebo MKK5, ktoré potom aktivujú MPK3 alebo MPK6. Druhou možnosťou je priama aktivácia MPK3 prostredníctvom NDP kináza 2, NDPK2 (Colcombert a Hirt, 2008).

MPK3 sa taktiež účastní odpovede na hyperosmotický ale aj hypoosmotický stres. MPK3 je aktivovaná kyselinou abscisovou. Kyselina abscisová (ABA) je fytohormón,

ktorý sa zúčastňuje mnohých fyziologických procesov ako napríklad adaptáciu na vodný stres alebo kontrolu dormancie semien. Pomocou inhibítora MAP2K bolo preukázané zníženie ABA-indukovaného uzatvorenia prieduchov. Táto skutočnosť indikuje že sa MPK3 účastní signalizovania prostredníctvom ABA. Dôležitým sekundárnym poslom v tejto signálnej dráhe je H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Ďalším stresovým faktorom, ktorý aktivuje MPK3 je ozón. K aktivácii tejto kaskády dochádza prostredníctvom reaktívnych kyslíkových druhov (ROS). Bolo dokázané, že v rámci 30 minút od vystavenia ozónu došlo k aktivácii MPK3.

Medzi ďalšie upstream aktivátory MPK3 spadá YODA (MP3K). YODA aktivuje downstream MKK4 alebo MKK5, v ďalšom kroku je aktivovaná MPK3. Čo značí že MPK3 je schopná regulovať ontogézu prieduchov vďaka tejto dráhe (Wang *et al.*, 2007).

Ťažké kovy sú ďalším stresovým faktorom, ktorý aktivuje MPK3. MPK3 konkrétne aktivujú ióny Cd a Cu. Bolo preukázané, že aplikáciou CdCl<sub>2</sub> došlo k aktivácii transkripcia MPK3. V prípade iónov kadmia dochádza k aktivácii MPK3 akumuláciou ROS (Taj *et al.*, 2010).

#### **2.4.2 MPK4**

MPK4 je jedna z najviac preštudovaných MAPK, zohráva rolu pri odpovedi na biotický a abiotický stres. Navyše zohráva dôležitú úlohu pri vývojových procesoch. MPK4 reguluje bunkové delenie, rast koreňa a taktiež vznik koreňových vláskov. MPK4 je aktivovaná abiotickým stresom a to konkrétne chladom a suchom. Táto signálna dráha začína aktiváciou receptorov v cytoplazmatickej membráne prostredníctvom chladu alebo sucha. Potom je signál prenesený na MEKK1, ktorá následne aktivuje MKK2 a finálne dochádza k aktivácii MPK4 (Teige *et al.*, 2004).

Pri mnohých stresových faktoroch dochádza k akumulácii H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pričom MPK4 hrá rolu ako negatívny regulátor. MPK4 je komponentom signálnej dráhy, ktorá je aktivovaná akumuláciou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aktivuje MEKK1, následne sú aktivované MKK1/MKK2, tie následne aktivujú MPK4, ktorá negatívne reguluje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Gao *et al.*, 2008).

Okrem toho že sa MPK4 zúčastňuje v mnohých signálnych dráhach pri odpovedi na abiotické ale aj biotické stresové faktory, bol potvrdený vplyv MPK4 na organizáciu

mikrotubulov v štúdiu, v ktorej bol analyzovaný fenotyp homozygotného recesívneho *mpk4* mutanta *A. thaliana*. MPK4 expresia bola zaznamenaná v epidermálnych bunkách koreňov a v koreňových vláskoch a výrazne v mieste vzniku nového koreňového vlásku. Nulový mutant *mpk4* prejavuje zakrpatený fenotyp so skrátenejšími koreňmi v porovnaní s divokým typom. Taktiež boli zaznamenané aberácie vo fenotype koreňových vláskoch, mutantná línia mala výrazne rozvetvené dvojnásobne až niekoľkonásobne koreňové vlásky v porovnaní s divokým typom. Navyše bol zaznamenané laterálne rozvetvovanie koreňových vláskov rovnako ako aj ektopické koreňové vlásky. Epidermálne bunky koreňov vykazovali radiálnu expanziu. Radiálna expanzia epidermálnych buniek koreňov rovnako ako aj rozvetvené a ektopické koreňové vlásky sú spojené s defektami v organizácii mikrotubulov. Kortikálne mikrotubuly prejavovali defektnú organizáciu. Kortikálne mikrotubuly nevykazovali orientovanú organizáciu, navyše namiesto paralelných sietí preukazovali náhodné zosieťovanie. V epidermálnych bunkách koreňov aj v rozvetvených koreňových vláskoch bolo zaznamenané zvýšené zväzovanie mikrotubulov. Z týchto zistení vyplýva, že MPK4 sa pravdepodobne zúčastňuje na vývojových signálnych dráhach, ktoré hrajú rolu v regulácii zväzovania kortikálnych mikrotubulov a taktiež bunkovej morfogénézy. Okrem týchto zistení, bolo navyše preukázané, že sa MPK4 zúčastňuje regulácie mitózy a cytokinézy. V *mpk4* mutantovi boli pozorované abnormality v mitotickom a cytokinetickom vývoji, konkrétne bol pozorovaný aberantný vznik mitotického vretienka a fragmoplastu (Beck *et al.*, 2011).

### 2.4.3 MPK6

MPK6 je ďalšia najpreštudovanejšia MAPK. Má esenciálnu rolu pri transdukcii stresových a vývojových signálov a taktiež sa podieľa na „cross talk“ medzi inými signálnymi dráhami. MPK6 je lokalizovaná v sekrečných vezikulách Trans-Golgiho siete (TGN) a v plazmatickej membráne. MPK6 sa účastní mnohých vývojových procesov ako napríklad embryogenézy, vzniku prieduchov, orientácii bunkového delenia a vývoja koreňa (Takáč *et al.*, 2016). MPK6 sa rovnako ako aj MPK3 účastní signálnej dráhy, ktorá je aktivovaná flg22. Po zachytení signálu receptormi v cytoplazmatickej membráne dochádza hierarchicky k aktivácii MEKK1, následne MKK4/MKK5 a MPK6 (Asai *et al.*, 2002). MPK6 sa podieľa na signálnych dráhach, ktoré sú aktivované biotickými a abiotickými stresovými faktormi, pričom indukujú produkciu etylénu. Táto kaskáda pozostáva z MPK6-MKK4/MKK5-MPK6, modul MKK4/MKK5 a MPK6 aktivuje dôležité enzýmy, ktoré umožňujú produkciu etylénu (Liu a Zhang, 2004). MPK6 funguje



taktiež ako negatívny regulátor akumulácie kyseliny jasmónovej (JA). MPK6 je fosforylovaná prostredníctvom MKK3, ktorá negatívne reguluje signálnu dráhu JA. Pomocou transkripčného faktoru *ATMYC2* vplýva na expresiu génu závislého na JA a senzitivitu koreňu. MKK3-MPK6 dráha hrá dôležitú úlohu pri regulácii rastu koreňov, ktorý je kontrolovaný prostredníctvom JA. MPK6 ja taktiež aktivovaná ťažkými kovmi a to kadmium (Taj *et al.*, 2010).

MPK6 rovnako ako aj MPK4 má okrem účasti na signálnych dráhach odpovedajúcich na stresové faktory účasť na vývojových procesoch. Bolo potvrdené, že MPK6 sa podieľa pri procese orientácie bunkového delenia a rovnako aj na vývoj koreňa. Bola zaznamenaná expresia MPK6 v koreňovom meristéme a to v apikálnej a prechodnej zóne. Tieto pozorovania naznačujú podieľanie sa MPK6 na procese vývoja koreňa. Na subcelulárnom leveli bola MPK6 lokalizovaná nielen v jadre a v cytoplazme, ale navyše bola lokalizovaná v rozličných bodoch v PPB a fragmoplaste koreňových buniek, ktoré prechádzali procesom delenia. V recesívnych mutantných líniah, *mpk6-2*, *mpk6-3*, *mpk6-1*, boli pozorované defekty vo vzore buniek a pletív v koreňoch, čo bolo zapríčinené defektnými rovinami bunkového delenia a naviac vplyvom defektov spôsobených ektopickými bunkovými deleniami. PPB spolu s fragmoplastom majú významný vplyv na rovinu bunkového delenia, v recesívnom mutantovi *mpk6-2* spôsobili defekty v rovine bunkového delenia posunuté a periklinálne bunkové delenia. Vďaka všetkým spomenutým defektom počas vývoja koreňa dochádza k narušenému zarovnaniu bunkových radov v koreni (Muller *et al.*, 2011). Okrem vplyvu MPK6 na vývoj koreňa, je potvrdená jej účasť na vývoji tyčiniek, kvetenstva a embrya. Nulové mutanty *mpk6-2* a *mpk6-4* vykazovali výrazne zníženú fertilitu. Mutantné línie sa taktiež fenotypovo odlišovali od divokého typu, mali zhruba o 50% skrátené šesule a taktiež mali významne zmenšené tyčinky. Skrátená dĺžka tyčiniek môže byť faktor vplyvajúci na zníženú samčiu fertilitu vplyvom zníženej efektívnosti opelenia (Bush a Krysan, 2007).

## **2.5 MAP kinázy v Lucerne siatej**

### **2.5.1 MAP kináza SAMK**

Stresom aktivovaná mitogénom aktivovaná proteín kináza (stress activated mitogen activated protein kinase, SAMK), stresom aktivovaná MAPK, je ortológom atMPK3. Táto kináza je komponentom signálnych dráh, ktoré sa zúčastňujú odpovede na nízke teploty. Nízke rovnako ako aj vysoké teploty spôsobujú zmeny štruktúry v cytoplazmatickej membráne. Pomocou cytoskeletu, Ca<sup>2+</sup> toku a CDPKs sa aktivujú

rozličné MAPK kaskády (Song *et al.*, 2018). SAMK sa podieľa na stresovej odpovedi v reakcii na ťažké kovy, konkrétne Cu a Cd. Ióny  $\text{Cu}^{2+}$  vo veľmi krátkom čase aktivujú SAMK, pričom  $\text{Cd}^{2+}$  spôsobujú oneskorenú aktiváciu. Bolo dokázané, že SIMKK špecificky sprostredkuje aktiváciu SAMK ale v prítomnosti  $\text{CuCl}_2$ , nie v prítomnosti  $\text{CdCl}_2$  (Jonak *et al.*, 2004, Song *et al.*, 2018), pričom SIMKK je aktivovaná prostredníctvom ROS (Jonak *et al.*, 2004). SAMK sa podieľa aj v obrannej reakcii na patogény a to bakteriálnymi elicitorami ako napríklad  $\beta$ -glukánom alebo ergosterolom (Cardinale *et al.*, 2000).

### **2.5.2 MAP kináza MMK2**

Mitogénom aktivovaná proteín kináza 2 z Lucerny siatej (medicago mitogen activated protein kinase 2, MMK2) je ortologom atMPK4. Účastní sa signálnych dráh v odpovedi na bakteriálne ale aj hubové elicitory. Konkrétne ju aktivuje chitín a  $\beta$ -glukán (Cardinale *et al.*, 2000). MMK2 sa podieľa signálnej dráhy, ktorá je aktivovaná ťažkými kovmi, konkrétne  $\text{CuCl}_2$  a  $\text{CdCl}_2$ .  $\text{Cu}^{2+}$  ióny rýchlo aktivujú MMK2 alebo MMK3.  $\text{Cd}^{2+}$  ióny taktiež aktivujú MMK2, ale zatiaľ nie je známy upstream aktivátor tejto dráhy (Jonak *et al.*, 2004)

### **2.5.3 MAP kináza SIMK**

Soľným stresom indukovaná mitogénom aktivovaná proteín kináza (stress induced mitogen activated protein kinase, SIMK) je ortológom atMPK6. SIMK sa nachádza prevažne v cytoplazme a jadre v bunkách rozličných orgánov (Ovečka *et al.*, 2014). V prípade soľného stresu dochádza k aktivácii SIMKK, ktorá následne špecificky aktivuje SIMK. SIMKK fosforyluje SIMK na treoninových ale aj tyrozínových zbytkoch aktivačnej smyčky (Kiegerl *et al.*, 2000). SIMK je okrem soľného stresu indukovaná prostredníctvom bakteriálneho ale aj hubového elicitoru. Jedným z elicitorov, ktoré ju prevažne aktivuje je chitín. Ergosterol je ďalší z elicitorov, ktorý preferenčne aktivuje SIMK.  $\beta$ -glukán je taktiež elicitorom aktivujúcim SIMK (Cardinale *et al.*, 2000). Okrem toho že je SIMK lokalizovaná v jadre a v cytoplazme, je potvrdené že sa nachádza v rastúcich koreňových vláskoch. Je preukázané podieľanie SIMK na vývojových procesoch. Konkrétne je aktivovaná a redistribuovaná z jadra do rastúcich špičiek koreňových vláskov pri vzniku koreňov. Navyše vplýva na vznik nodulov a produkciu biomasy (Hrbáčková *et al.*, 2021).

### **3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ**

#### **3.1 Materiál**

##### **3.1.1 Použité chemikálie**

LB broth (Sigma Aldrich, Nemecko)

LB agar (Sigma Aldrich, Nemecko)

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

0,1 M Hydroxid draselný (KOH) (Sigma Aldrich, Nemecko)

Spektinomycin (SPE) (Duchefa Biochemia, Holandsko)

Kanamycin (KAN) (Duchefa Biochemia, Holandsko)

Kyselina 2-(N-morfolino)etánsulfónová (MES) (Sigma Aldrich, Nemecko)

Chlorid horečnatý (MgCl<sub>2</sub>) (Sigma Aldrich, Nemecko)

Acetosyringon (1-(4-hydroxy-3,5-dimetoxyfenyl)etán-1-on) (Sigma Aldrich, Nemecko)

Gamborg B5 basal (Duchefa biochemie, Holandsko)

Dusičnan draselný (KNO<sub>3</sub>) (Sigma Aldrich, Nemecko)

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

L-prolín (Sigma Aldrich, Nemecko)

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

Gellan Gum powder (AlfaAesar, USA)

Glutamín

Serín

L-glutatión

Kinetin (KIN) (Duchefa Biochemie, Holandsko)

Kyselina dichlorfenoxyoctová (2,4-D) (Duchefa Biochemie, Holandsko)

Gamborg Vitamin (Duchefa biochemie, Holandsko)

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

Myoinositol (Sigma Aldrich, Nemecko)

1% roztok malachitovej zelene (Sigma Aldrich, Nemecko)

Kyslý fuchsin (Sigma Aldrich, Nemecko)

Anilinová modrá (Sigma Aldrich, Nemecko)

Oranž G (Sigma Aldrich, Nemecko)

Kyselina mliečna (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>) (Sigma Aldrich, Nemecko)

Chloralhydrát (2,2,2-trichloreťán-1,1-diol, C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>Cl<sub>3</sub>O<sub>2</sub>) (Sigma Aldrich, Nemecko)

Glycerol (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>) (Sigma Aldrich, Nemecko)

Fenol (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>OH) (Sigma Aldrich, Nemecko)

Etanol p.a. (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) (Sigma Aldrich, Nemecko)

Chloroform (CHCl<sub>3</sub>)

Kyselina octová (CH<sub>3</sub>COOH) (Sigma Aldrich, Nemecko)

MiliQ voda (pripravená pomocou Simplicity Water Purification System Merck, Nemecko)

### **3.1.2 Roztoky a média**

#### **3.1.2.1 Tranzientná transformácia listov *Nicotiana benthamiana***

##### **Tuhé a tekuté LB médium**

V prípade tuhého LB média bolo pridaných 40 g/l<sup>-1</sup> LB agar do MiliQ vody, po rozpustení bolo namerané a následne upravené pH na 7,2 najprv prostredníctvom 1 M KOH, pri blížení k želanej hodnote pH bolo následne pH upravené pomocou 0,1 M KOH. V prípade tekutého LB média bolo pridaných 25 g/l<sup>-1</sup> LB Broth do MiliQ vody, pH bolo opäť upravené na 7,2. Po autoklavovaní boli do médií pridané antibiotiká vzhľadom na selekčné gény použitého konštruktú (Tab. 1).

Tabuľka 1: Výpočet riedenia pre selekčné antibiotiká pridávané do LB média

<b>Selekčné antibiotiká (ATB)</b>	<b>Koncentrácia zásobného roztoku (µg/ml)</b>	<b>Koncentrácia finálneho roztoku (µg/ml)</b>	<b>Riedenie</b>	<b>Objem LB média (µl)</b>	<b>Objem ATB pridaných do LB média (µl)</b>
<b>KAN</b>	50000	25	1:2000	20000	10
<b>RIF</b>	50000	100	1:500		40

### Zásobné roztoky na infiltračné médium

Boli pripravené zásobné roztoky a to 50 ml 1000 mM MES (pH 5,6 upravené prostredníctvom 1 M KOH a 0,1 M KOH), 50 ml 100 mM MgCl<sub>2</sub> a 1 ml 150 mM AS rozpustený v DMSO (Tab. 2).

Tabuľka 2: Príprava zásobných roztokov pre infiltračné médium

<b>Látka</b>	<b>Mr (g/mol)</b>	<b>Koncentrácia finálneho roztoku (mM)</b>	<b>Objem finálneho roztoku (ml)</b>	<b>navážka (g)</b>
<b>MES</b>	195,2	1000	50	9,760
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	95,211	100	50	0,476
<b>AS</b>	196,19	150	1	0,029

### Infiltračné médium

Na prípravu infiltračného média boli použité pripravené zásobné roztoky MES, MgCl<sub>2</sub> a AS, ktoré boli napipetované podľa príslušných finálnych koncentrácií (Tab. 3) a doliate MiliQ vodou do finálneho objemu.

Tabuľka 3: Výpočet riedenia zásobných roztok na požadované koncentrácie na prípravu infiltračného média

Zásobný roztok	Koncentrácia zásobného roztoku (mM)	Koncentrácia finálneho roztoku (mM)	Riedenie	Objem infiltračného média (ml)	Objem zásobného roztoku (ml)
MES	1000	10	1:100	50	0,5
MgCl <sub>2</sub>	100	10	1:10		5
AS	150	0,15	1:1000		0,05

### 3.1.2.2 Somatická embryogenéza

#### Sterilizačný roztok

Do 50 ml falkónovej skúmavky bolo naliatych 36 ml dH<sub>2</sub>O, potom boli napipetované 4 ml hypochloridu sodného a 4 µl Tween-20, roztok bol následne premiešaný.

#### B5, B50 a B5H médium

Na prípravu B5 média bolo pridaných do 800 ml MiliQ vody 3,1 g/l GAMBORG B5 basal, 0,5 g/l KNO<sub>3</sub>, 0,25 g/l MgSO<sub>4</sub>, 0,5 g/l L-prolínu a 30 g/l sacharózy. Po rozpustení jednotlivých látok na magnetickej miešačke bolo pridaných 4,5 g/l Gellan gum. Následne bolo pH upravené na 5,7 pomocou 1 M KOH a 0,1 M KOH, do objemu bola pridaná MiliQ voda. V prípade prípravy B50 média bolo do vysterilizovaného B5 média napipetovaných 14,5 ml aminostock, 500 µl Gamborg vitamin. V prípade prípravy B5H média boli pridané ešte hormóny a to 500 µl KIN a 500 µl 2,4-D. Média boli po pridaní jednotlivých zložiek rozliate po 25 ml do okrúhlych Petriho misiek.

#### MMS médium

Do 800 ml MiliQ vody bolo pridaných 4,3 g/l MS basal salt mixture, 0,1 g/l myoinositolu, 30 g/l sacharózy. Po rozmiešaní bolo pridaných 4,5 g/l Gellan gum, potom bolo pH upravené na 5,7 prostredníctvom 1 M KOH a 0,1 M KOH, po upravení pH bolo do objemu pridaná MiliQ voda. Po sterilizácii bolo médium rozliate po 50 ml do štvorcových Petriho misiek.

### **1x MS médium**

4,3 g/l MS basal salt mixture a 30 g/l sacharózy bolo pridaných do 800 ml MiliQ vody, následne po rozpustení bolo pridaných 4,5 g/l Gellan gum. Bolo upravené pH na 5,7 pomocou 1 M a 0,1 M KOH, po úprave pH bola do objemu pridaná MiliQ voda. Po sterilizácii bolo médium rozliate po 50 ml do štvorcových Petriho misiek.

### **3.1.2.3 Fenotypové analýzy**

#### **Tuhé ½ MS médium na vysadenie stabilných kataninových mutantných línií**

Do 800 ml MiliQ vody bolo pridaných 10 g/l sacharózy a 2,15 g/l MS basal. Následne bol pridaný 1 g MES. Následne bolo pridaných 4,5 g/l Gellan gumu. Po rozpustení pridaných zložiek bolo upravené pH na 5,7 pomocou 1 M KOH a 0,1 M KOH. Po upravení pH bola do objemu pridaná MiliQ voda. Médium bolo vysterilizované. V prípade prípravy tekutého ½ MS média nebolo pridaných 4,5 g/l Gellan gum pred úpravou pH.

#### **3.1.2.4 Príprava trvalých preparátov embryí a vajíčok *A. thaliana* a *M. sativa***

Bol pripravený fixačný roztok do sklenenej Pyrexovej fľašky s objemom 50 ml bolo pridaných 25 ml etanolu p.a., 5 ml ľadovej kyseliny octovej a 20 ml vody, roztok bol následne premiešaný. Následne bol pripravený odfarbovací roztok do sklenenej Pyrexovej fľaše bolo pridaných 8 g chloralhydrátu, 3 ml glycerolu a 1 ml vody.

#### **3.1.2.5 Štvornásobné farbenie piestikov (Alexander *et al.*, 1987)**

##### **Carnoy's fluid**

Do sklenej 25 ml Pyrexovej fľaše bolo pridaných 6 ml etanolu p.a., 4 ml chloroformu a 1 ml ľadovej kyseliny octovej, roztok bol následne premiešaný.

##### **Zásobné roztoky farbiacich roztokov**

Boli pripravené zásobné roztoky a to 1% kyslého fuchsínu v dH<sub>2</sub>O (50 mg kyslého fuchsínu bolo pridaných do 5 ml dH<sub>2</sub>O), 1% anilínovej modrej v dH<sub>2</sub>O (50 mg anilínovej modrej bolo pridaných do 5 ml dH<sub>2</sub>O) a 1% oranže G v 50% etanole (50 mg oranže G bolo pridaných do 5 ml 50% etanolu, na prípravu 50% etanolu bol použitý etanol p.a.). Navážené farbivá boli rozpustené v 5 ml dH<sub>2</sub>O. Zásobné roztoky boli uskladnené v 15 ml Falkonových skúmavkách zabalených v alobale.

### **Farbiaca zmes**

19,5 ml kyseliny mliečnej, 1 ml 1% roztoku malachitovej zelenej, 1,5 ml 1% roztoku kyslého fuchsinu, 1 ml 1% roztoku anilínovej modrej, 0,5 ml 1% roztoku oranž G boli v uvedenom poradí postupne pridané do 25 ml Pyrexovej sklennej fľaše. Po premiešaní roztoku bolo pridaných 5 g chloralhydrátu. Roztok bol umiestnený na magnetickú miešačku dokým sa chloralhydrát úplne nerozpustil. Pyrexová fľaša s farbiacou zmes bola zabalená do alobalu.

### **Odfarbovacie a zmäkčovacie médium I**

19,5 ml kyseliny mliečnej, 2,55 ml fenolu, a 0,5 ml 1% roztoku oranž G bolo v uvedenom poradí pridaných do 25 ml sklenenej Pyrexovej fľaše. Ako posledných bolo pridaných 2,5 g chloralhydrátu. Roztok bol umiestnený na magnetickú miešačku až od úplného rozpustenia chloralhydrátu. Po rozpustení bola fľaša s roztokom zabalená do alobalu.

### **Odfarbovacie a zmäkčovacie médium II**

19,5 ml kyseliny mliečnej, 2,55 ml fenolu, a 0,5 ml 1% roztoku oranž G bolo v uvedenom poradí pridaných do 25 ml sklenenej Pyrexovej fľaše. Roztok bol premiešaný a následne zabalený v alobale.

### **Mounting médium**

12,5 ml kyseliny mliečnej a 12,5 ml glycerolu bolo pridaných do 25 ml Pyrexovej fľaše, roztok bol následne premiešaný.

### **3.1.3 Biologický materiál**

#### Rastlinný materiál

- Na fenotypovú analýzu organizácie mikrotubulov boli použité dve línie *A. thaliana* Col-0 a *35S::mCherry:TUA5* a *35S::GFP:FABD2* v *ktn1-2*
- Na fenotypové analýzy embryonálneho vývoja trvalých preparátov fixovaných vajíčok boli použité *A. thaliana* Col-0 a *M. sativa* RSY
- Na odtestovanie protokolu štvornásobného farbenia (Alexander *et al.*, 1987) bola použitá *A. thaliana* Col-0



- Na fenotypové analýzy *in vivo* preparátov embryí bola použitá línia *A. thaliana* Col-0 a *35S::mCherry:TUA5* a *35S::GFP:FABD2* v *ktn1-2*
- Na somatickú embryogenézu bola použitá *M. sativa* línia *35S::tagRFP:TUA6*, materiál bolo odobratý z rastlín umiestnených vo fytotrone

### Bakteriálne kultúry

- Bakteriálne kultúry boli poskytnuté vedúcim bakalárskej práce a pracovníkmi Katedry Biotechnológií (Tab. 4)
- Na tranzientnú transformáciu boli použité baktérie rodu *Agrobacterium tumefaciens* kmeň GV3101, nesúce konštrukty:
  - *P19* slúžiaci na supresiu RNAi
  - *35S::KTN1:YFPc* v plazmide *pDEST-KTN1:VYCE*
  - *35S::MPK4:YFPn* v plazmide *pDEST-MPK4:VYNE*
  - *35S::tagRFP:TUA6*

Tabuľka 4: Konštrukty použité na tranzientnú transformáciu s ich selekčnými antibiotikami (KAN-kanamycin, RIF-rifampicin)

Konštrukt	Selekčné antibiotiká	Zásobná koncentrácia (mg.ml <sup>-1</sup> )	Finálna koncentrácia (µg.ml <sup>-1</sup> )
<i>P19</i>	KAN/RIF	50/50	25/100
<i>35S::KTN1:YFPc</i>	KAN/RIF	50/50	25/100
<i>35S::MPK4:YFPn</i>	KAN/RIF	50/50	25/100
<i>35S::tagRFP:TUA6</i>	KAN/RIF	50/50	25/100

### 3.2 Použité prístroje

Analytické váhy (XA 110/2X, RADWAG Váhy s.r.o., Česká republika)

Autokláv Sterrivap HP IL (MMM Group, Nemecko)

Automatické pipety (Eppendorf, Nemecko)

Centrifuga (Allegra 64 R, Beckman Coulter, USA)

Elektromagnetická miešačka MSH-420 (BOECO, Nemecko)

Epifluorescenčný mikroskop Axio Imager.M2 (Zeiss, Nemecko)

Fytotronová komora (Weiss Gallenkamp, Nemecko)

Hlbokomraziaci box MDF-U500VX-PE (Panasonic, Japonsko)

Konfokálny laserový skenovací mikroskop (CLSM) LSM 710 (Zeiss, Nemecko)

Kultivačná trepačka Orbital Shaker-Incubator ES-20 (Biosan Ltd, Lotyšsko)

Laminárny box Biohazard (Merci, Česká republika)

Mikrosko Stereo ZOOM MS (A. Krüss Optronic GmbH, Nemecko)

Mikrovltná trúba (MHE21 HITACHI, Japonsko)

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

pH meter PC 2700 (Eutech Instruments, USA)

Prístroj na deionizovanú vodu Simplicity Water Purification System (Merck Milipore, USA)

Spektrofotometer SmartSpec™ (Bio-Rad Laboratories Inc., USA)

Vortex Microspin FV2400 (Biosan Ltd., Nemecko)

### 3.3 Software

Cytospectre (Kartasalo *et al.*, 2015)

ImageJ 1.53t (National Institutes of Health and Laboratory for Optical and Computational Instrumentation, University of Wisconsin, USA)

Zen 3.5

### 3.4 Metodika

#### 3.4.1 Príprava *in vivo* preparátov smenenáčikov *A. thaliana* mCherry-TUA6 a GFP-FABD2 v *ktn1-2*

##### Vysadenie divokého typu a mutantnej línie kataninu *A. thaliana*

Boli vysadené dve línie *A. thaliana* a to mCherry-TUA6 a GFP-FABD2 v Col-0 a *A. thaliana* mCherry-TUA6 a GFP-FABD2 v *ktn1-2* na tuhé ½ MS médium. Vysterilizované semená oboch línií boli prostrednítvom sterilného špáradla umiestnené na ½ MS médium v štvorcovej Petriho miske. Petriho misky boli následne zapáskované

a umiestnené na dva dni do chladničky. Po dvoch dňoch boli prenesené do fytotronu s fotoperiódou 16 hodín svetlo/8 hodín tma, vlhkosťou vzduchu 70% a teplotou 21°C, intenzitou osvetlenia 60-80  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Po troch dňoch boli semenáčky vyselektované na základe signálu.

### **3.4.2 Príprava *in vivo* preparátov divokého typu *A. thaliana* a mutantnej línie kataninu *A. thaliana***

Na podložné sklíčko boli nadĺžku nalepené dve dlhé tenké pásiky obojstrannej lepiacej pásky, medzi pásiky lepiacej pásky bolo napipetovaná kvapka tekutého ½ MS média, do kvapky ½ MS média bol umiestnený 7-dňový semenáčik *A. thaliana*. Podložné sklíčko bolo prikryté krycím sklíčkom. Následne boli oba okraje krycieho sklíčka zapáskované prostredníctvom parafilmu. Pripravené preparáty boli mikroskopicky pozorované prostredníctvom dvoch mikroskopov a to konfokálneho skenovacieho laserového mikroskopu (Zeiss) LSM 710 Axio Imager 2 s použitím objektívu Plan-Apochromat 40x/1.4 Oil DIC M27 a Spinning-Disc mikroskopu (Zeiss) Axio Observer.Z1 použitím objektívu Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC M27. Mikroskopické pozorovanie bolo zamerané na organizáciu mikrotubulov buniek hypokotylu, obe línie exprimovali fluorescenčne značený proteín mCherry-TUA6. Boli nastavené dva fluorescenčné kanály GFP kanál (excitačná vlnová dĺžka 488 nm, emisná vlnová dĺžka 509 nm), mCherry kanál (excitačná vlnová dĺžka 587 nm, emisná vlnová dĺžka 610 nm). Analýza organizácie mikrotubulov bola uskutočnená prostredníctvom programu Cytospectre, obrázky buniek hypokotylu boli upravené prostredníctvom programu Zen blue light, bola využitá funkcia „rotate“, obrázky boli otočené rozmedzí 15-50°, tak aby bunky hypokotylu smerovali kolmo. Upravené obrázky boli vložené do programu cytospectre, kde bola následne analyzovaná organizácia mikrotubulov.

### 3.4.3 Tranzientná transformácia listov *Nicotiana bethamiana*

Zásobné zmrazené bakteriálne kultúry, „stock kultúry“, baktérií *A. tumefaciens* boli vybraté z mraziaku, kde sú uchovávané pri  $-80^{\circ}\text{C}$ . Po rozmrazení baktérií na ľade, boli sterilne naočkované pomocou bakteriálneho očka na tuhé LB médium, do ktorého boli predom pridané špecifické selekčné antibiotiká (Tab. 1). Naočkované misky boli inkubované 2 dni v inkubátore pri  $28^{\circ}\text{C}$  v tme. Po naočkovaní boli zásobné bakteriálne stocky zmrazené prostredníctvom tekutého dusíku a umiestnené do mraziaku konkrétne na  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Po dvoch dňoch boli baktérie z tuhého LB média preočkované do tekutého LB média. Do 50 ml Falkónových skúmaviek bolo naliatych 10 ml tekutého LB média. Následne boli napipetované selekčné antibiotiká špecifické pre daný konštrukt. Sterilným špáradlom bola odobraná single kolónia, následne bolo špáradlo umiestnené do LB média. Do Eppendorfovej skúmavky boli napipetované 2 ml čistého LB média so selekčnými antibiotikami, ktoré bolo použité ako blank pri meraní optickej hustoty pri vlnovej dĺžke 600 nm ( $\text{OD}_{600}$ ) po namnožení naočkovaných bakteriálnych kultúr. Naočkované baktérie v tekutom LB médiu boli umiestnené do inkubátoru kde boli cez noc inkubované pri  $28^{\circ}\text{C}$ , 180 RPM.

Po namnožení bakteriálnej kultúry v tekutom LB médiu bolo zmerané  $\text{OD}_{600}$ . Do kyviet bolo napipetovaných 500  $\mu\text{l}$  namnoženej kultúry, ako blank bolo použité čisté LB médium. Absorbancia namnožených kultúr by mala byť v rozsahu hodnôt 0,5-1,5. Falkónové skúmavky boli vyvážené a umiestnené v centrifuge tak aby skúmavky s podobnými hmotnosťami boli oproti sebe. Nasledovala centrifugácia pri 3000 x g, teplote  $4^{\circ}\text{C}$  a na 10 minút. Po centrifugácii bol supernatant odliaty a pelet bol resuspendovaný v 1 ml infiltračného média. Opäť nasledovala centrifugácia pri 3000 x g,  $4^{\circ}\text{C}$  a na 10 minút. Po druhom premytí kultúry bol supernatant odpipetovaný a pelet bol resuspendovaný v 1 ml čerstvého infiltračného média. Potom bolo opäť zmerané  $\text{OD}_{600}$ , ako blank bolo použité čisté infiltračné médium. Do kyviet bolo napipetovaných 450  $\mu\text{l}$  infiltračného média a 50  $\mu\text{l}$  premytej bakteriálnej kultúry. Bakteriálna kultúra bola tak 10x zriedená, takže výsledné  $\text{OD}_{600}$  takto zriedenej kultúry bolo 10x nižšie, pričom reálna hodnota optickej hustoty bakteriálnej kultúry bola 10x vyššia. Po nameraní  $\text{OD}_{600}$  bola bakteriálna kultúra nariedená na hodnotu  $\text{OD}_{600}=0,6$  podľa vzorca  $\frac{2 \text{ (Finálny objem, ml)} \times \text{namerané } \text{OD}_{600}}{0,6 \text{ (želané } \text{OD}_{600})}$ . Do 5 Eppendorfových skúmaviek boli napipetované

jednotlivé kombinácie kultúr (Tab. 5) podľa vypočítaného riedenia, po napipetovaní kultúr bolo napipetované infiltračné médium do objemu 2 ml. Bakteriálne suspenzie boli inkubované na 2 hodiny v tme pri laboratórnej teplote.

Tabuľka 5: Kombinácie jednotlivých konštruktov, ktoré boli použité na tranzientnú transformáciu

Kombinácia		Použité konštrukty		
<b>A</b>	<i>P19</i>			
<b>B</b>	<i>P19</i>			<i>35S::tagRFP:TUA6</i>
<b>C</b>	<i>P19</i>	<i>35S::KTNI:YFPc</i>		<i>35S::tagRFP:TUA6</i>
<b>D</b>	<i>P19</i>	<i>35S::KTNI:YFPc</i>	<i>35S::MPK4:YFPn</i>	<i>35S::tagRFP:TUA6</i>
<b>E</b>	<i>P19</i>		<i>35S::MPK4:YFPn</i>	<i>35S::tagRFP:TUA6</i>

Po inkubácii nasledovala infiltrácia listov *Nicotiana benthamiana*. Rastliny boli minimálne dve hodiny pred infiltráciou zaliate vodou, aby došlo k otvoreniu prieduchov na spodnej strane listov. Do injekčnej striekačky bola odobratá bakteriálna suspenzia a následne bolo vťahovaná do spodnej strany listov. Listy boli od prebytočnej suspenzie osušené pomocou servítky, odpad bol likvidovaný v súlade s GMO školením. Po infiltrácii niekoľkých listov boli na adaxiálnej strane označené fixkou infiltrované miesta. Po infiltrácii všetkých rastlín boli rastliny prenesené do fytotronu.

3 dni po transformácii (3DAT), 5 dní po transformácii (5DAT) a 6 dní po transformácii (6DAT) bolo uskutočnené mikroskopické pozorovanie. Boli pripravené mikroskopické preparáty. Z označenej infiltrovanej časti listu bol odstrihnutý kúsok listu v tvare trojuholníku. Časť listu bola prenesená adaxiálnou stranou na podložné sklíčko. Na kúsok listu bola napipetovaná kvapka vody a list bol prikrytý krycím sklíčkom. Preparáty boli mikroskopicky pozorované prostredníctvom konfokálneho skenovacieho laserového mikroskopu (Zeiss) LSM 710 Axio Imager 2 s použitím objektívu Plan-Apochromat 40x/1.4 Oil DIC M27. Boli nastavené dve UV kanály, GFP kanál (excitačná vlnová dĺžka 514 nm, emisná vlnová dĺžka 551 nm) a RFP kanál (excitačná vlnová dĺžka 561 nm, emisná vlnová dĺžka 613 nm).

Následne analýzy mikroskopických obrázkov boli uskutočnené prostredníctvom programu ImageJ. Mikroskopické obrázky boli predtým upravené prostredníctvom

programu Zen blue light, následne boli vložené do programu ImageJ, prostredníctvom ktoré boli analyzované spoty zelené (samostatne GFP kanál) a biele (spojený kanál RFP a GFP). Po vložení do programu ImageJ bola nastavená mierka, následne bol obrázok konvertovaný na 8-bitový. V prípade mikroskopických obrázkov spojených kanálov, bola pred ďalším upravovaním posunutá farbená škála, aby boli viditeľné len biele spoty. V ďalšom kroku bol obrázok invertovaný prostredníctvom funkcie „invert“. Následne bolo nastavené prahovanie pomocou funkcie „threshold“, prahovanie bolo nastavené tak aby boli zachytené len spoty v rovine. V poslednom kroku bola použitá funkcia „analyse particles“, dáta boli spracované pomocou programu Microsoft Excel.

#### **3.4.4 Somatická embryogenéza**

##### **Sterilizácia listov Lucerny sietej línia 35S::tagRFP:TUA6 a prenos explantátov na B5H médium**

Bolo odstrihnutých zhruba 20-30 listov a následne boli vložené do vodovodnej vody vo Falkónovej skúmavke. Listy boli následne premyté v 70% etanole na 30 s pričom bola po celý čas Falkónová skúmavka pretrepávaná. Následne boli listy sterilizované v sterilizačnom roztoku na 1,5 min, po celú dobu sterilizácie bola Falkónová skúmavka pretrepávaná, aby boli dostatočne vysterilizované všetky listy. Sterilizačný roztok bol zliaty do kadičky vo flowboxe a zvyšky roztoku boli vymyté sterilnou destilovanou vodou 5x3 min, medzi jednotlivými premývaniami bola vždy pridaná čistá sterilná destilovaná voda (dokým nezmizla pena spôsobená detergentom Tween-20). Po sterilizácii boli listy osušené na sterilnom filtračnom papieri v sterilnej Petriho miske. Následne boli listy rozrezané na menšie časti tzv. explantáty. Explantáty boli umiestnené na B5H médium, ktoré indukuje dediferenciáciu buniek a vznik kalusov. Zapáskované Petriho misky s explantátmi boli umiestnené do fytotronu s fotoperiódou 16 hodín svetlo/8 hodín tma, vlhkosťou vzduchu 70% a teplotou 21°C, 60-80  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Explantáty boli kultivované zhruba 2-3 týždne pri stanovených podmienkach, kým nedošlo k vzniku kalusov.

##### **Prenos kalusov na B50 médium**

Zhruba po 2-3 týždňoch boli vzniknuté kalusy prenesené sterilne z B5H média na B50 médium, ktoré indukuje diferenciáciu buniek a vznik somatických embryí. Zapáskované Petriho misky s B50 médiom s kalusmi boli prenesené do fytotronu s fotoperiódou 16 hodín svetlo/8 hodín tma, pri 21°C a vlhkosťou vzduchu 70%. Kalusy boli opäť

kultivované zhruba 2-3 týždne, dokým nenarástli somatické embryá. Somatické embryá boli mikroskopicky pozorované prostredníctvom Stereo ZOOM mikroskopu (Zeiss) Axio Zoom.V16 (Zeiss) mikroskopu použitím objektívu PlanNeoFluar Z 2.3x. Somatické embryá boli pozorované prostredníctvom monochromatickej a farebnej kamery. Boli nastavené dva UV kanály dsRed (excitačná vlnová dĺžka 590 nm, emisná vlnová dĺžka 612 nm) a GFP kanál (excitačná vlnová dĺžka 488 nm, emisná vlnová dĺžka 509 nm).

### **Prenos somatických embryí na MMS médium**

Vzniknuté somatické embryá na B50 médiu boli sterilne preložené na MMS médium, ktoré indukuje rast koreňov. Zapáskované misky boli umiestnené do fytotronu s fotoperiódou 16 hodín svetlo/8 hodín tma s teplotou 21°C a vlhkosťou vzduchu 70%, intenzitou osvetlenia 60-80  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Somatické embryá boli kultivované zhruba 2-3 týždne dokým nezačali rásť korene.

### **Prenos mladých rastlín na 1x MS médium**

Mladé rastliny s koreňmi boli preložené z MMS média na MS médium. Zapáskované misky boli inkubované vo fytotrone s fotoperiódou 16 hodín svetlo/8 hodín tma s teplotou 21°C a vlhkosťou 70%, intenzitou osvetlenia 60-80  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

## **3.4.5 Fenotypové analýzy**

### **3.4.5.1 Príprava trvalých preparátov embryí a vajíčok *A. thaliana* a *M. sativa***

Boli odobraté šesule a piestiky v rôznych vývojových štádiách jednotlivých línií. Do mikroskopávky boli napipetované 2 ml fixačného roztoku, do ktorého boli následne pridané šesule alebo piestiky. Vzorky boli fixované cez noc, v prípade čerstvého fixačného roztoku boli vzorky fixované zhruba hodinu dokiaľ nedošlo k odfarbeniu. Po odfarbení boli vzorky umiestnené na podložné sklíčko do kvapky odfarbovacieho roztoku. Následne boli zo šesúl alebo piestikov vypreparované vajíčka pomocou ihly a pinzety na podložnom sklíčku prostredníctvom steromikroskopu. Po vypreparovaní vajíčok bolo podložné sklíčko prikryté krycím sklíčkom a pripravený preparát bol zalakovaný. Trvalé preparáty boli mikroskopicky pozorované prostredníctvom DIC optiky pomocou mikroskopu epifluorescenčného mikroskopu (Zeiss) Axio Imager 2. Na mikroskopické pozorovanie bolo použitých niekoľko objektívov EC Plan-Neofluar 10x/0.30 M27, LD Plan-Neofluar 20x/0.4 Korr M27, EC Plan-Neofluar 40x/0.75 M27, Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC M27.

### 3.4.5.2 Štvornásobné farbenie piestikov *A. thaliana*

#### 1. Deň

Najprv boli odstrihnuté ručne opelené kvety *A. thaliana*. Odstrihnuté kvety boli prenesené na Petriho misku v stereomikroskope. Prostredníctvom pinzety boli vypreparované piestiky, ktoré boli následne prenesené do 1 ml Carnoyovho roztoku. Piestiky boli odfarbované 12 hodín.

#### 2. Deň

Bol pripravený etanolový rad (50% EtOH, 40% EtOH, 30% EtOH, 20% EtOH, 10% EtOH) a napipetovaný do doštičky s jamkami. Piestiky boli následne umiestnené do sitka a premývané v klesajúcom etanolom rade, boli premývané po dobu 10 min. Po premytí v etanolovom rade boli premyté v dH<sub>2</sub>O. Následne boli piestiky premiestnené do 1 ml farbiacej zmesi v jamke doštičky a boli inkubované 12 hodín v inkubátore pri 42°C.

#### 3. Deň

Po inkubácii v farbiacom roztoku boli vzorky prenesené do 1 ml odfarbovacieho a zmäkčovacieho roztoku v jamke doštičky. Vzorky boli inkubované na 24 hodín v inkubátore pri 42°C.

#### 4. Deň

Po inkubácii v odfarbovacom a zmäkčovacom roztoku boli vzorky prenesené do 1 ml čerstvého odfarbovacieho a zmäkčovacieho roztoku. Následne boli inkubované na 30 min pri 58°C. Po inkubácii boli piestiky premyté v kyseline mliečnej. Boli pripravené mikroskopické preparáty. Na podložné sklíčko bolo napipetovaných 50 µl montážneho média do ktorého boli prenesené piestiky a sklíčko bolo prikryté krycím sklíčkom. Pripravené preparáty boli mikroskopicky pozorované prostredníctvom monochromatickej aj farebnej kamery. Pre monochromatickú kameru boli nastavené dva UV kanály, GFP kanál (excitačná vlnová dĺžka 488 nm, emisná vlnová dĺžka 509), DAPI (excitačná vlnová dĺžka 353 nm, emisná vlnová dĺžka 465 nm). Preparáty boli pozorované prostredníctvom dvoch objektívov EC Plan-Neofluar 10x/0.30 M27, EC Plan-Neofluar 40x/0.75 M27.



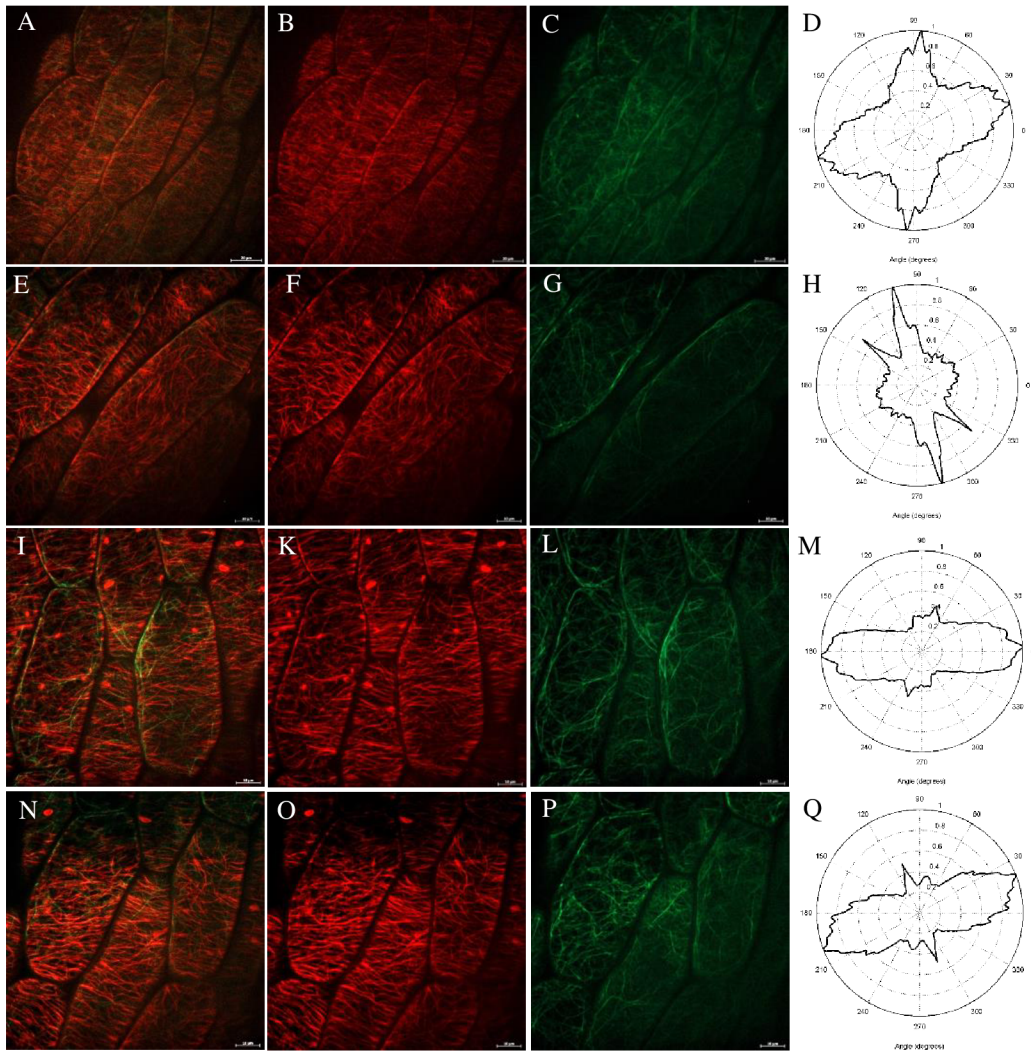
### **3.4.5.3 Príprava *in vivo* preparátov embryí *A. thaliana* genotyp Col-0 exprimujúci *GFP-KTN1* a *mCherry-TUA5***

Boli odobraté šesule z transgénnych rastlín *A. thaliana* genotyp Col-0 exprimujúcich *GFP-KTN1* a *mCherry-TUA6*. Na podložné sklíčko bola napipetované kvapka tekutého ½ MS média. Následne boli šesule umiestnené na podložné sklíčko a oplodnené vajíčka boli vypreparované pomocou pinzety a ihly. Podložné sklíčko bolo následne prikryté krycím sklíčkom. Pripravené preparáty boli umiestnené do vlhkej komôrky. Následne boli mikroskopicky pozorované prostredníctvom mikroskopu epifluorescenčného mikroskopu mikroskopu (Zeiss) Axio Imager.M2 a konfokálneho skenovacieho laserového mikroskopu (Zeiss) LSM 710 Axio Imager 2. V prípade epifluorescenčného mikroskopu boli nastavené tri UV kanály, konkrétne GFP kanál (excitačná vlnová dĺžka 488 nm, emisná vlnová dĺžka 509 nm), DsRed kanál (excitačná vlnová dĺžka 533-558, emisná vlnová dĺžka 570-640 nm), DAPI ako kontrolný kanál (excitačná vlnová dĺžka 353 nm, emisná vlnová dĺžka 465 nm) a prechádzajúce svetlo, na mikroskopické pozorovanie boli použité objektívy EC-Plan-Neofluar 40x/0.75 M27, Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC M27, Plan-Apochromat 100x/1.40 Oil DIC M27. V prípade konfokálneho skenovacieho laserového mikroskopu boli nastavené rovnaké UV kanály, ma mikroskopické pozorovanie bol použitý objektív Plan-Apochromat 20x/0.8 M27.

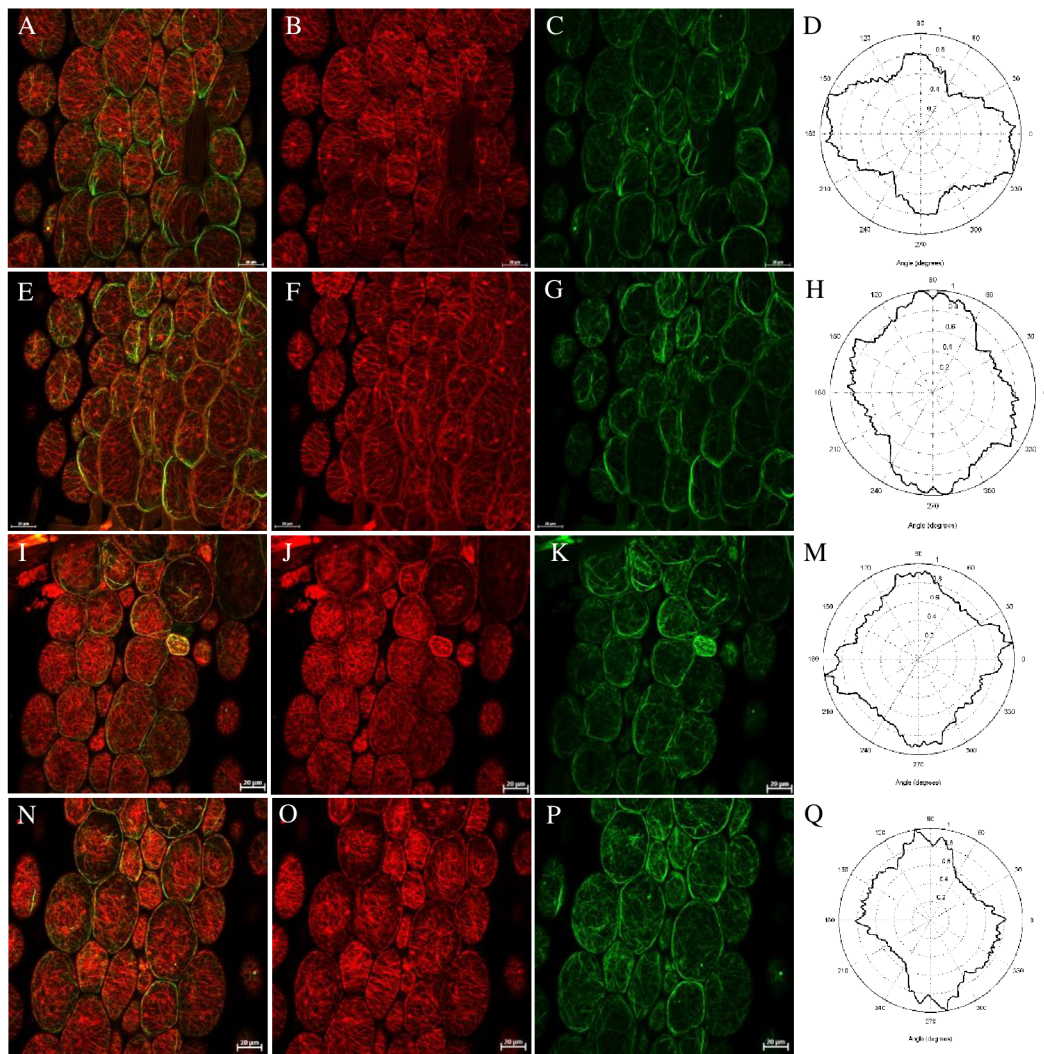
## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 *In vivo* sledovanie organizácie mikrotubulov v bunkách hypokotylu *A. thaliana* Col-0 a *ktn1-2* exprimujúcich *mCherry-TUA5* a *GFP-FABD2*

Bola uskutočnená analýza organizácie mikrotubulov buniek hypokotylu línií *A. thaliana* Col-0 exprimujúcich *mCherry-TUA5* a *GFP-FABD2* a *A. thaliana ktn1-2* exprimujúcich *mCherry-TUA5* a *GFP-FABD2*. V prípade buniek hypokotylu *A. thaliana* Col-0 bolo viditeľné usmernené transverzálne usporiadanie mikrotubulov (Obr.5A, B, C, D), bunky hypokotylu boli predĺžené na rozdiel od buniek hypokotylu mutantnej línie *ktn1-2*. Mikrotubuly v bunkách hypokotylu mutantnej línie *ktn1-2* boli náhodne usporiadané (Obr.6, A, B, C, D), pričom mali bunky zaguľatený tvar. Prostredníctvom programu cytospectre bola analyzovaná organizácia mikrotubulov oboch línií. Grafy preukázali, že v prípade *A. thaliana* Col-0 bola organizácia mikrotubulov usmernená (Obr.5 D, H, M, Q). Grafy *A. thaliana ktn1-2* vykazovali, že organizácia mikrotubulov nebola usmernená a boli usporiadané náhodne, na rozdiel od orientovanej organizácie *A. thaliana* Col-0, (Obr.6D, H, M, Q). Grafy organizácie mikrotubulov mutantnej línie kataninu *A. thaliana* boli značne rozptýlené v porovnaní s grafmi organizácie mikrotubulov *A. thaliana* Col-0, ktoré preukazovali usmernenú organizáciu pod určitými uhlami.



Obrázok 5: Organizácia mikrotubulov v bunkách hypokotylu *A. thaliana* Col-0 exprimujúce tagRFP-TUA6 a GFP-FABD2; A, E, I, N: Spojený kanál GFP a RFP; B, F, K, O: RFP kanál, C, G, L, P: GFP kanál; D, H, M, Q: cytospectre analýza organizácie mikrotubulov; mierka= 10  $\mu$ m, objektív 63x10, Spinning-Disc mikroskop (Zeiss) Axio.Observer.Z1



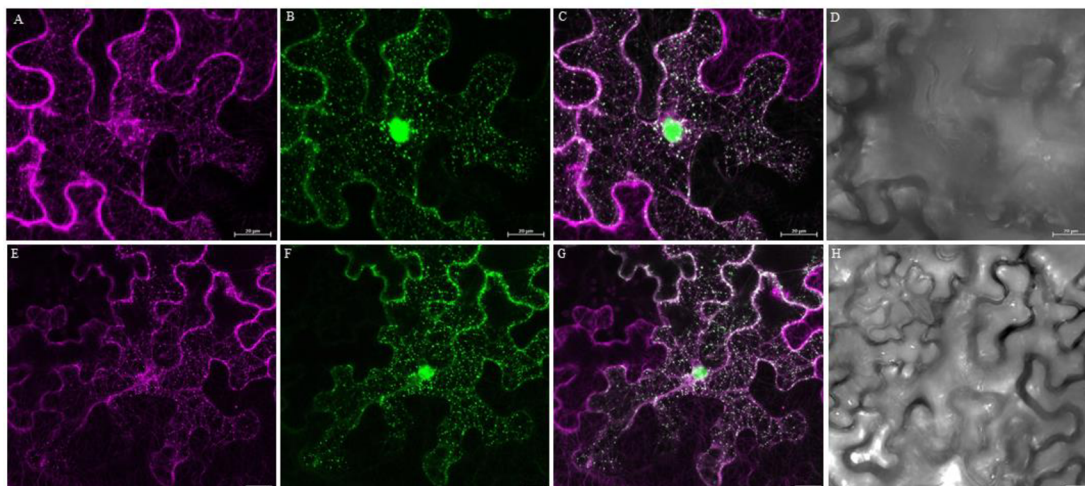
Obrázok 6: Organizácia mikrotubulov v bunkách hypocotylu *A. thaliana ktn1-2* exprimujúca mCherry-TUA5 a GFP-FABD2, A, E, I, N: Spojený kanál GFP a RFP; B, F, K, O: RFP kanál, C, G, L, P: GFP kanál; D, H, M, Q: cytospectre analýza organizácie mikrotubulov; mierka= 20 µm, objektív 40x10, konfokálny skenovací laserový mikroskop (Zeiss) LSM 710 Axio Imager 2

## 4.2 Tranzientná transformácia listov

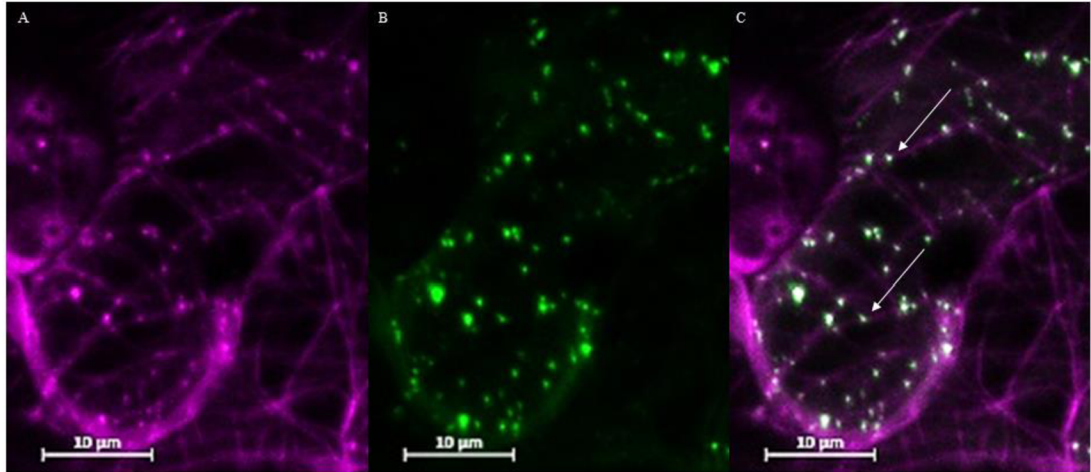
V rámci tranzientnej transformácie listov bol uskutočnený experiment prostredníctvom niekoľkých kombinácií konštruktov, konkrétne bola využitá potenciálna interakcia MPK4 a KTN1. Interakcia týchto proteínov už bola testovaná metódou YFP-split s pozitívnym výsledkom (Luptovčiak, 2017). Pre detailnejšie analýzy tejto potenciálnej interakcie bola využitá metóda bimolekulárnej fluorescenčnej komplementácie (BICF, alebo iným názvom YFP-split), ktorá sa bežne využíva na overenie interakcie proteínov. Konkrétne bola využitá YFP-split technológia, keďže oba proteíny MPK4 a KTN1 boli fúzované s jednou časťou YFP, MPK4 bola fúzovaná N-koncom s YFP a KTN1 bola



fúzovaná s C-koncom YFP. Keďže hlavnou funkciou proteínu kataninu je regulácia organizácie mikrotubulov a ich oddeľovania tento experiment zahŕňal taktiež kolokalizáciu tejto interakcie na mikrotubuloch, ktoré boli značené prostredníctvom červeného fluorescenčného proteínu tagRFP. Z infiltrovaných listov boli pripravené preparáty, ktoré boli následne mikroskopované prostredníctvom konfokálneho skenovacieho laserového mikroskopu (Zeiss) LSM 710 Axio Imager 2, pričom boli nastavené dva UV kanály a to GFP kanál, na sledovanie interakcie MPK4 a KTN1, a RFP kanál na sledovanie fluorescenčne značených mikrotubulov, tomuto kanálu bola následne prostredníctvom programu Zen blue light daná „pseudo color“ magenta. Interakcia MPK4 a KTN1 bola vizualizovaná vo forme zelených spotov (Obr. 7B,C; 8B,C; 9B,C). Akonáhle boli tieto dva proteíny lokalizované priamo na mikrotubuloch, došlo k prekrytiu oboch signálov, vďaka čomu bol viditeľný biely signál (Obr. 8C, Obr. 9C).

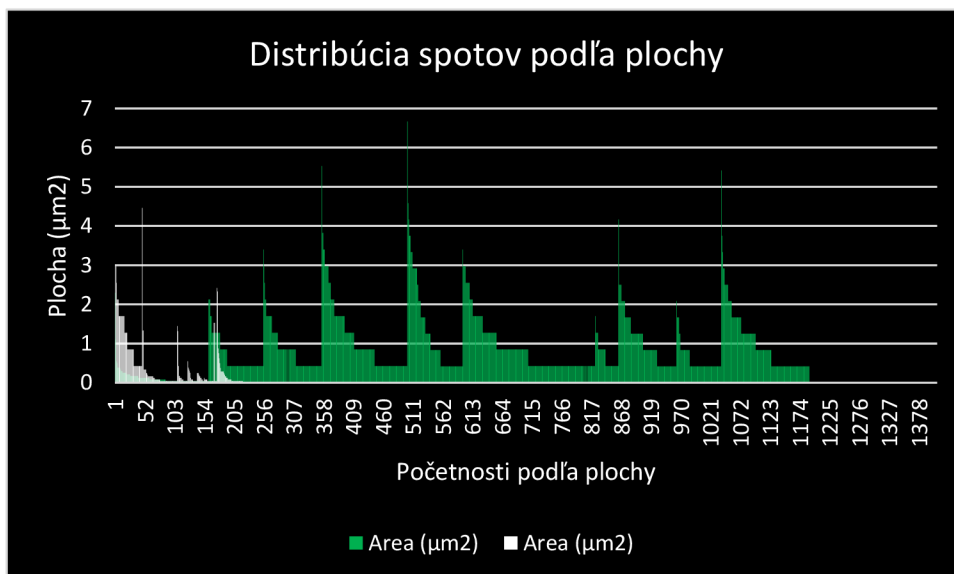


Obrázok 7: Epidermálne bunky *N. benthamiana* tranzientne transformované prostredníctvom štyroch konštruktov *35S::MPK4:YFPn*, *35S::KTN1:YFPc*, *35S::tagRFP:TUA6*, *P19* (3DAT); A, E: RFP kanál; B, F: GFP kanál; C, G: spojený kanál GFP a RFP kanálov; D, H: svetelný kanál, mierka= 20  $\mu\text{m}$ , objektív 40x10, konfokálny skenovací laserový mikroskop (Zeiss) LSM 710 Axio Imager 2



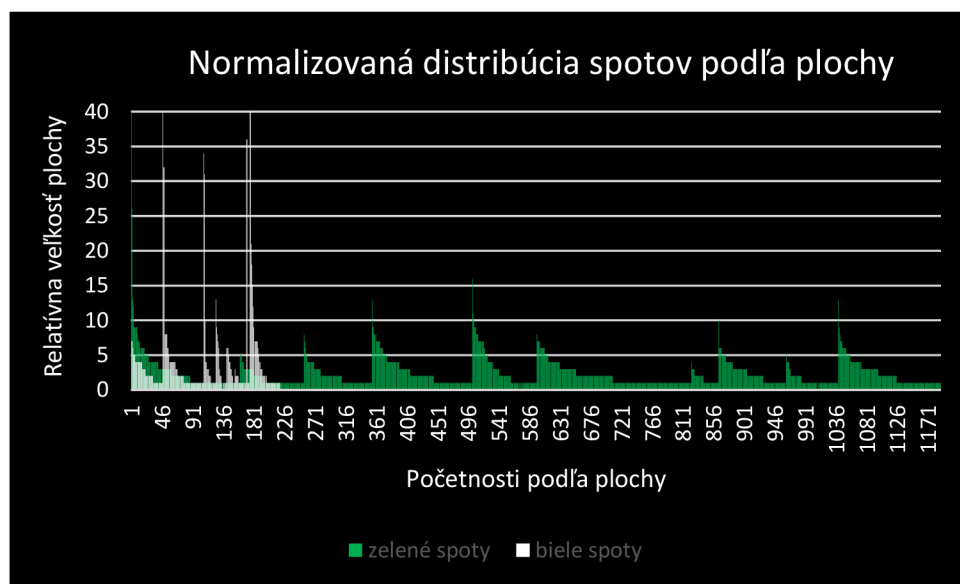
Obrázok 8: Detailný obrázok s viditeľnými bielymi spotmi na mikrotubuloch (šípky) epidermálnej bunky *N. benthamiana* tranzientne transformovanej prostredníctvom štyroch konštruktov *35S::MPK4:YFPn*, *35S::KTNI:YFPc*, *35S::tagRFP:TUA6*, *P19 (3DAT)*; A: RFP kanál; B: GFP kanál; C: spojený kanál RFP a GFP, objektív 40x10, konfokálny skenovací laserový mikroskop (Zeiss) LSM 710 Axio Imager 2

V rámci metódy tranzientnej transformácie boli zrealizované analýzy prostredníctvom programu ImageJ zamerané na analýzu distribúcie a relatívnej početnosti zelených a bielych spotov. Bolo uskutočnených 10 meraní z vybraných mikroskopických obrázkov. V prípade bielych spotov bolo uskutočnených 8 meraní, z dôvodu neprítomnosti bielych spotov na vybraných mikroskopických obrázkoch. Prvom rade bola analyzovaná distribúcia zelených a bielych spotov v rámci jednotlivých mikroskopických meraní. Distribúcia bielych a zelených spotov bola vyhodnotená na základe plochy ( $\mu\text{m}^2$ ) jednotlivých spotov v rámci vybraných analyzovaných mikroskopických obrázkov. Je viditeľná rastúca tendencia početnosti zelených aj bielych spotov so znižujúcou sa veľkosťou plochy v jednotlivých meraniach (Graf 1). Z tohto



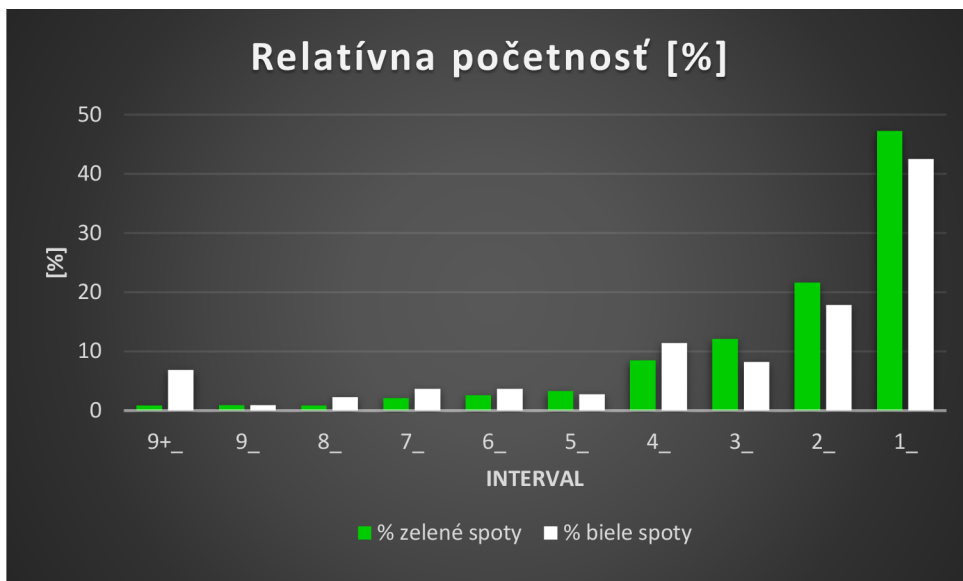
Graf 1: Distribúcia zelených a bielych spotov podľa plochy

dôvodu bola v ďalšom kroku prepočítaná relatívna veľkosť plochy. Následne bola analyzovaná normalizovaná distribúcia spotov podľa plochy z prepočítanej relatívnej veľkosti plochy v rámci jednotlivých meraní (Graf 2). Po vynesení závislostí do grafu, bola opäť viditeľná rastúca tendencia početnosti zelených aj bielych spotov so znižujúcou sa plochou v rámci jednotlivých meraní.



Graf 2: Normalizovaná distribúcia zelených a bielych spotov podľa plochy, vyhodnotenie závislosti početnosti zelených a bielych spotov na relatívnej veľkosti plochy

Z tohto dôvodu bola následne vyhodnotená relatívna percentuálna početnosť (Graf 3). Na vynesenie závislosti pre relatívnu percentuálnu početnosť boli využité prepočítané relatívne veľkosti plochy pre každý spot, na základe relatívnej veľkosti boli jednotlivé spoty rozdelené do 10 intervalov. Pričom pre každý interval bola následne prepočítaná percentuálna početnosť spotov. Z grafu je viditeľná rastúca početnosť pri stanovených intervaloch, pričom najnižšia početnosť pre zelené aj biele spoty je viditeľná pri intervale 9, od ktorého následne rastie početnosť pre zelené aj biele spoty, pričom v prípade oboch je najvyššia početnosť viditeľná pre interval 1.



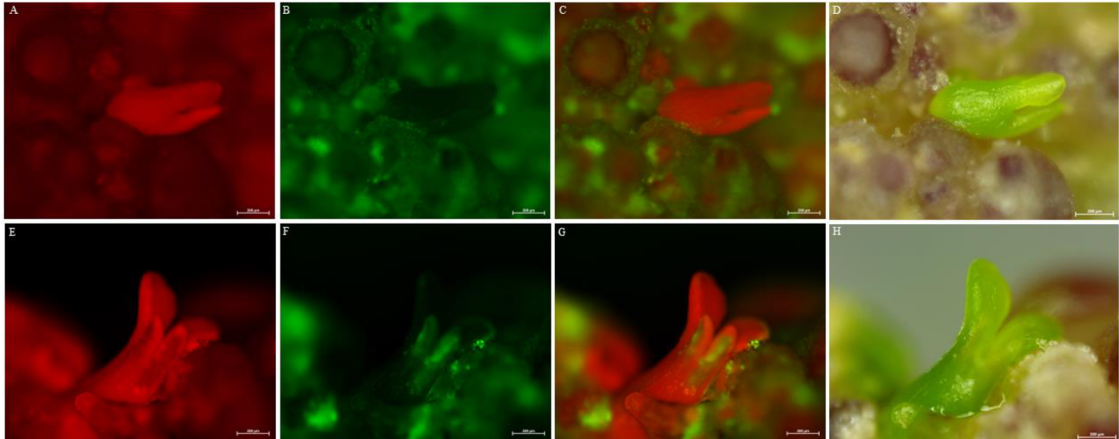
Graf 3: Relatívna percentuálna početnosť zelených a bielych spotov, porovnanie početnosti zelených a bielych spotov v rámci 10 intervalov

### 4.3 Somatická embryogenéza línie 35S::tagRFP:TUA6

Metóda nepriamej somatickej embryogenézy bola pôvodne uskutočnená s cieľom následne zrealizovať stabilnú transformáciu línie *M. sativa* tagRFP-TUA6. S časových dôvodov a taktiež nízkou úspešnosťou bola táto metóda len otestovaná. Boli uskutočnené dve kolá somatickej embryogenézy. Vysterilizované listy boli premiestnené na B5H médium, obsahujúce rastlinné hormóny, cytokiníny a auxíny, v pomere 1:1, vďaka čomu dochádza k dediferenciácii buniek a indukcii tvorby kalusov. Po niekoľkých týždňoch boli kalusy prenesené na B50, ktoré neobsahuje hormóny, čím dochádza k diferenciacii buniek a vzniku somatických embryí. Somatické embryá prechádzajú jednotlivými vývojovými štádiami, globulárne, srdcovité, torpédovité. Somatické embryá boli fotené prostredníctvom Axio ZOOM.V16 mikroskopu (Zeiss), pričom boli viditeľné niektoré z vývojových fáz. Konkrétne torpédovité štádium (Obr. 9A, B, C, D) a kotyledonárne štádium (Obr.9 E, F, G, H). Somatické embryá boli fotené prostredníctvom dvoch UV kanálov, DsRED a GFP kanálov. DsRED kanál bol využitý na potvrdenie expresie proteínu tagRFP-TUA6, pričom GFP kanál slúžil ako kontrolný kanál autofluorescencie. Somatické embryá boli následne prenesené na MMS médium, obsahujúce vyššiu koncentráciu auxínov nad cytokinínmi, vďaka čomu dochádza k indukcii rastu koreňov. Mladé rastliny s koreňmi boli prenesené na MS médium. V rámci 2 kôl somatickej embryogenézy bolo použitých 40 listov, vo výsledku bolo získaných 10 vitálnych rastlín na stabilnú transformáciu. Úspešnosť somatickej



embryogenézy sa počíta ako pomer použitých listov a vitálnych rastlín, čiže finálna úspešnosť bola 25%.



Obrázok 9: Somatické embryá línie *M. sativa* tagRFP-TUA6, konkrétne sú viditeľné dve vývojové štádiá torpédovité (A, B, C, D) a kotyledonárne (E, F, G, H); A, E: RFP kanál, B,F: GFP kanál, C,G: spojený kanál RFP a GFP; D, H: svetelný kanál, objektív= ,mierka= 200  $\mu$ m, mikroskop Stereo ZOOM.V16

#### 4.4 Fenotypové analýzy

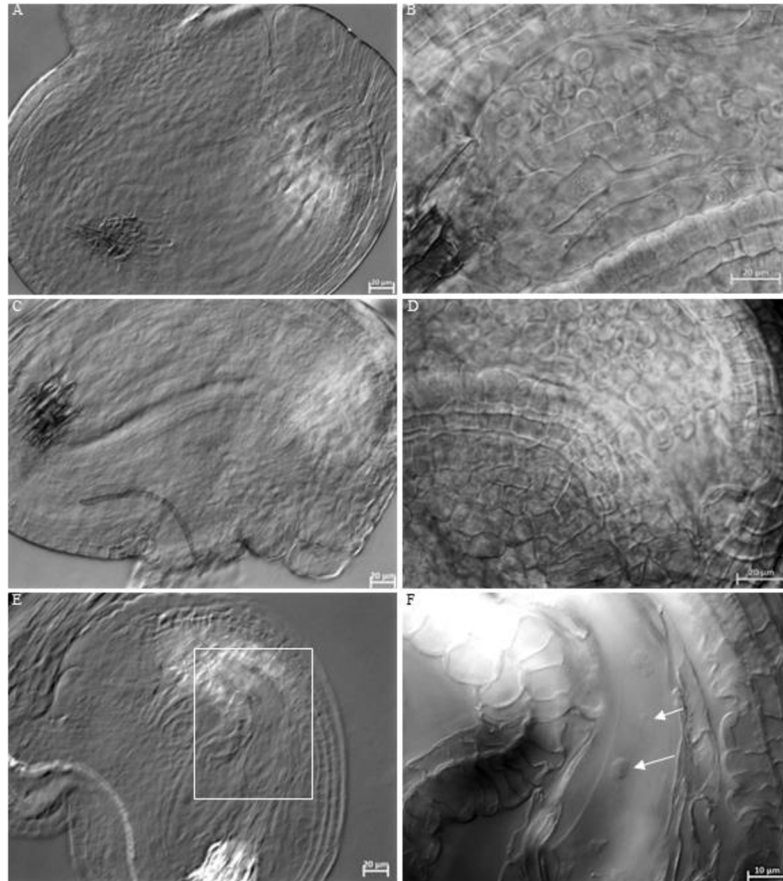
##### 4.4.1 Trvalé preparáty embryí a vajíčok divokého typu rastlín *A. thaliana* a *M. sativa* RSY

Trvalé preparáty neoplodnených vajíčok boli pripravované za účelom pozorovania umiestnenia vaječnej a centrálnej bunky v embryonálnom vaku. Zároveň boli pripravené trvalé preparáty oplodnených vajíčok za účelom sledovania jednotlivých embryonálnych štádií. Tento protokol bol použitý pri analýze defektov v embryonálnom vývoji mutantných línií *ktn1-2* vďaka čomu bol preukázaný efekt na embryonálny vývoj rovnako bol preukázaný efekt na organizáciu vaječnej a centrálnej bunky v embryonálnom vaku. V recesívnych mutantných líniach MPK6 rovnako ako aj v nulovej mutantnej línii *mpk4* bola preukázaná znížená fertilita. Tento experiment bol pôvodne uskutočnený za účelom analýzy embryonálneho vývoja a umiestnenia vaječnej a centrálnej bunky v embryonálnom vaku mutantných línií GFP-SIMK a SIMKKi. Tento protokol bol testovaný na divokom type *A. thaliana* (Obr. 10), boli pripravené trvalé preparáty neoplodnených a oplodnených vajíčok. V prípade neoplodnených vajíčok bolo možné pozorovať embryonálny vak, pričom nebola viditeľná vaječná a centrálna bunka (Obr. 10A,B,C). V prípade oplodnených vajíčok bolo možné zachytiť niekoľko embryonálnych štádií, konkrétne proembryo (Obr. 10D), globulárne štádium (Obr. 10E, F, G), srdcovité štádium (Obr. 10H, I, J). Simultánne bol tento protokol testovaný na neoplodnených

vajíčkach *M. sativa* RSY, pričom vo väčšine analyzovaných vajíčok nebolo možné vizualizovať vnútro embryonálneho vaku (Obr. 11A, B, C, D) a vo väčšine prípadov nebolo možné dostať sa na kvalitu preparátov oplodnených a neoplodnených vajíčok. Napriek tomu v jednom prípade bolo možné zachytiť vnútro embryonálneho vaku (Obr.11E, F), pričom pri väčšom zväčšení bolo možné zachytiť bunky vo vnútri embryonálneho vaku (Obr.11F).



Obrázok 10: Trvalé fixované preparáty neoplodnených a oplodnených vajíčok s jednotlivými embryonálnymi štádiami *A. thaliana* Col-0, A, B, C, neoplodnené vajíčko s viditeľným embryonálnym vakom, objektív 10x10, mierka 500  $\mu\text{m}$ , D: oplodnené vajíčko s proembryom, objektív 10x10, mierka 500  $\mu\text{m}$ , E, F, G: globulárne štádium embrya, objektív 40x10, mierka 20  $\mu\text{m}$ , H: srdcovité štádium embrya, objektív 20x10, mierka 50  $\mu\text{m}$ , I, J: srdcovité štádium embrya, objektív 40x10, mierka 20  $\mu\text{m}$ , epifluorescenčný mikroskop (Zeiss) Axio Imager 2 DIC optika

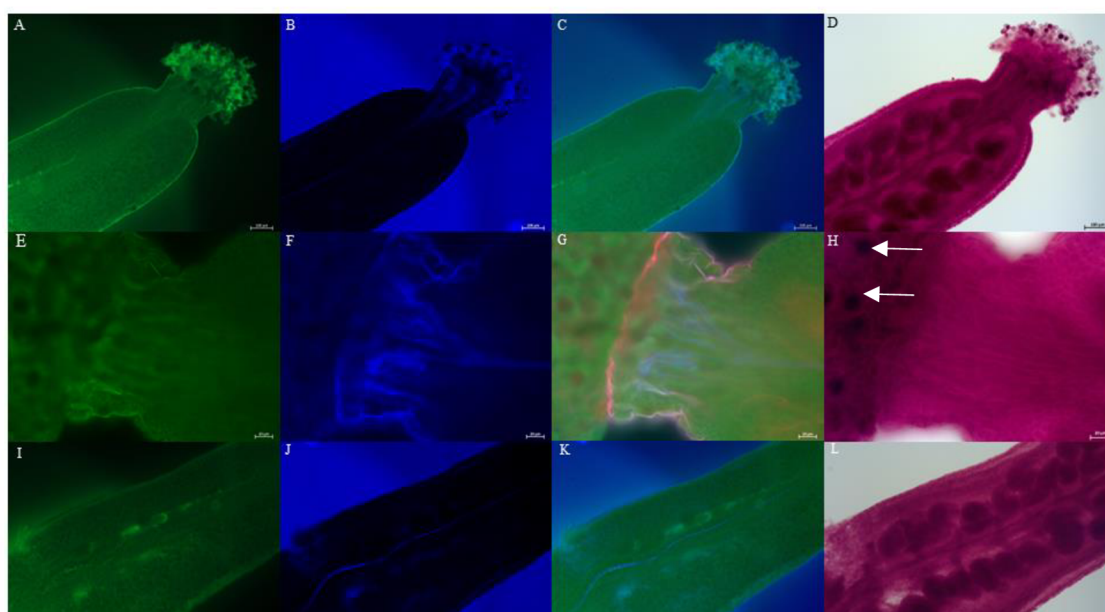


Obrázok 11: Trvalé fixované preparáty neoplozených vajíčok *M. sativa* RSY, A, C, E: objektív 20x10, B, D: objektív 40x10, F: viditeľné bunky vo vnútri embryonálneho vaku, objektív 63x10, epifluorescenčný mikroskop (Zeiss) Axio Imager 2 DIC optika

#### 4.4.2 Štvornásobné farbenie piestikov

V prípade fenotypových analýz bol následne otestovaný protokol na štvornásobné farbenie piestikov (Alexander *et al.*, 1987) s cieľom vizualizovať pohyb peľových vrecúšok v opelených piestikoch, pričom v prípade úspešného sfarbenia by bolo možné porovnávať mutantné línie *A. thaliana ktn1-2* v porovnaní s divokým typom. Na štvornásobné farbenie boli použité štyri rôzne farbivá a to malachitová zelená, anilínová modrá, kyslý fuchsín a oranž G. Malachitová zelená zafarbuje celulózu, ktorá je zložkou bunkových stien rastlinných buniek. Kyslý fuchsín zafarbuje cytoplazmu a jadro. Anilínová modrá zafarbuje kalózu v bunkových stenách rastlinných buniek a rovnako aj jadro. Oranž G zafarbuje celulózu v bunkových stenách a jadro. Anilínová modrá spolu s malachitovou zelenou farbí peľové zrná, peľové vrecúška a pletivo čnelky piestiku. Zafarbené piestiky boli fotené prostredníctvom mikroskopu Zeiss Axio Imager.M2 (Obr. 12). Diferenciálne farbenie piestikov nebolo úspešné, piestiky boli zafarbené prevažne kyslým fuchsínom a neboli viditeľné špecificky zafarbené peľové vrecúška vo vnútri piestiku. Peľové zrná na stigme boli viditeľné a boli tmavšie zafarbené do fialova (Obr.

12H). Zafarbené piestiky boli taktiež pozorované prostredníctvom fluorescenčných kanálov. Prostredníctvom DAPI kanálu mal viditeľný modrý signál xylému v stigme a taktiež pozdĺž celého piestiku. Protokol (Alexander *et al.*, 1987) bol modifikovaný, pričom bolo pripravené druhé zmäkčovacie a odfarbovacie médium bez prídania chloralhydrátu, keďže vzorky boli po inkubácii v pôvodnom zmäkčovacom a odfarbovacom médiu výrazne odfarbené od väčšiny použitých farbív okrem fuchsínu. V prípade vzoriek ktoré boli inkubované v novom zmäkčovacom a odfarbovacom médiu, bola viditeľná menšia zmena, vajíčka vo vnútri piestiku a peľové zrná na stigme boli zafarbené výraznejšie do fialova. Napriek tomu odstránením chloralhydrátu zo zmäkčovacieho a odfarbovacieho média nebolo možné vizualizovať zafarbené peľové vrecúška vo vnútri piestiku.

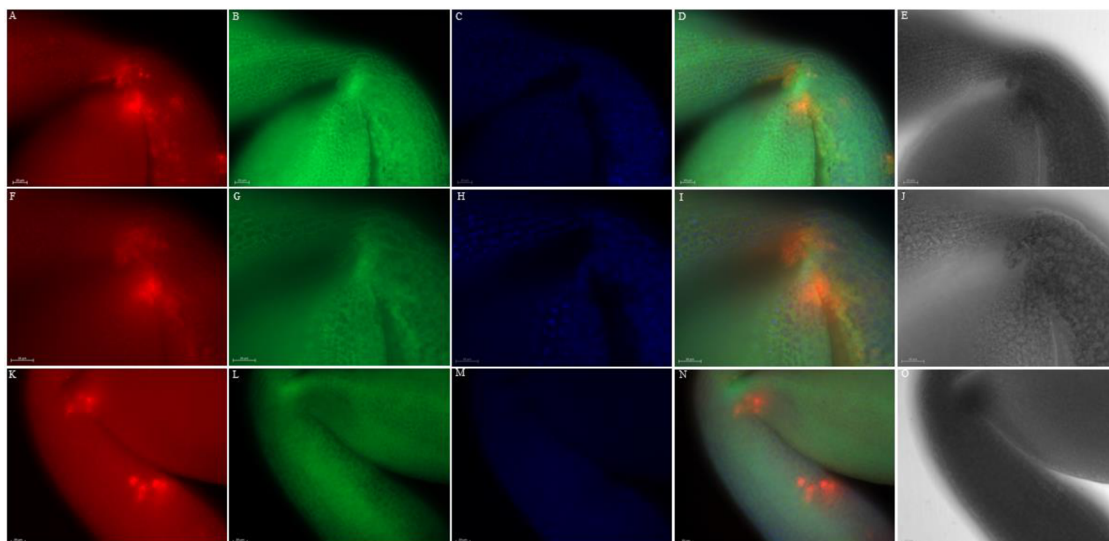


Obrázok 12: Piestiky zafarbené prostredníctvom metódy štvornásobného farbenia; H: šípky poukazujú na fialovo zafarbené peľové zrná na povrchu stigmy; A, E, I: GFP kanál; B, F, J: DAPI kanál; C, G, K: spojený kanál GFP a DAPI; D, H, L: farebná kamera, A, I: : objektív 40x10, E: objektív 10x10, epifluorescenčný mikroskop (Zeiss) Axio.Imager.M2

#### 4.4.3 *In vivo* mikroskopické pozorovanie embryí *A. thaliana* v Col-0 exprimujúcich GFP-KTN1 a mCherry-TUA5

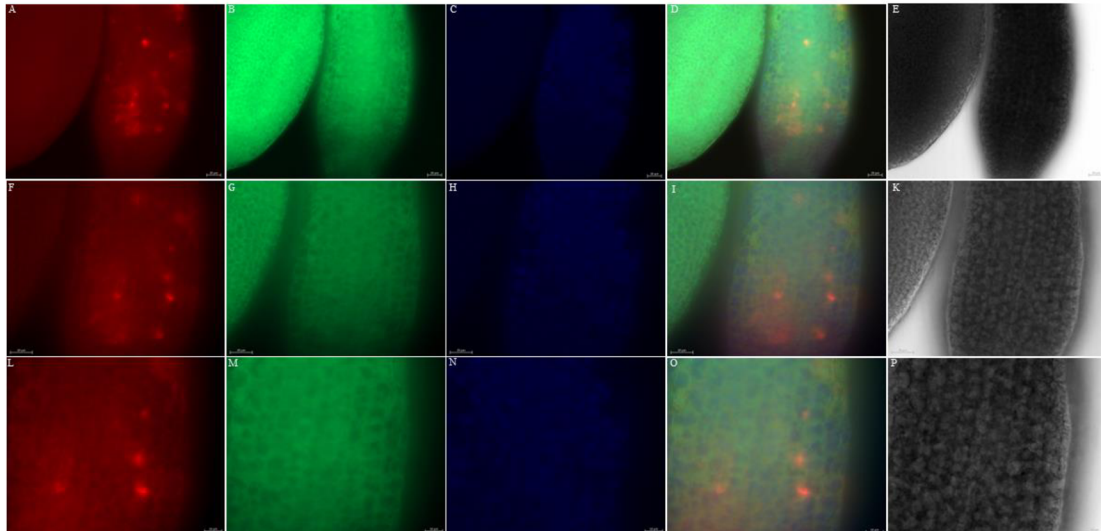
V rámci fenotypových analýz bolo zrealizované *in vivo* pozorovanie embryí línie *A. thaliana* Col-0 exprimujúca GFP-KTN1 a mCherry-TUA5. Cieľom tohto experimentu bolo analyzovať usporiadanie mikrotubulov v jednotlivých embryonálnych štádiách a porovnať zaznamenané výsledky s mutantnými líniami kataninu, ktoré taktiež exprimujú fluorescenčne značený cytoskeletálny marker. Keďže bol preukázaný vplyv

kataninu na embryogenézu a defekty v embryonálnom štádiu (Luptovčiak *et al.*, 2017b), bolo by možné v mutantných líniiach kataninu so značenými mikrotubulmi sledovať ich organizáciu v deliacich sa bunkách embrya a tým sledovať vplyv neexprimujúceho sa kataninu na vývoj embrya. Pripravené preparáty boli pozorované najprv prostredníctvom mikroskopu Zeiss Axio Imager.M2, prostredníctvom programu Zen blue light, boli nastavené fluorescenčné kanály, konkrétne GFP kanál, DsRed kanál, DAPI ako kontrolný kanál a prechádzajúce svetlo. Prostredníctvom epifluorescenčného mikroskopu Zeiss Axio Imager.M2 boli v rámci kotyledonárneho štádia zaznamenané zóny s fluorescenčným signálom a to konkrétne vo vrcholovom apikálnom meristéme (Obr. 13A, F, K) a vo vyvíjajúcom sa hypokotyle (Obr. 14A, F, K). Napriek použitiu olejového objektívu nebolo možné rozoznať štruktúru mikrotubulov (Obr. 14F, L), preto bol na ďalšie pozorovanie použitý konfokálny skenovací laserový mikroskop (Zeiss) LSM 710 Axio Imager 2. Embryá v kotyledonárnom štádiu boli pozorované pri menšom zväčšení a opäť boli viditeľné zóny vo vrcholovom apikálnom meristéme so silnejším signálom a taktiež vo vyvíjajúcom sa hypokotyle, preto boli následne dané zóny pozorované pri väčšom zväčšení a pričom bolo možné sa dostať na úroveň buniek a zachytiť štruktúru mikrotubulov buniek vyvíjajúceho sa hypokotylu (Obr. 15).

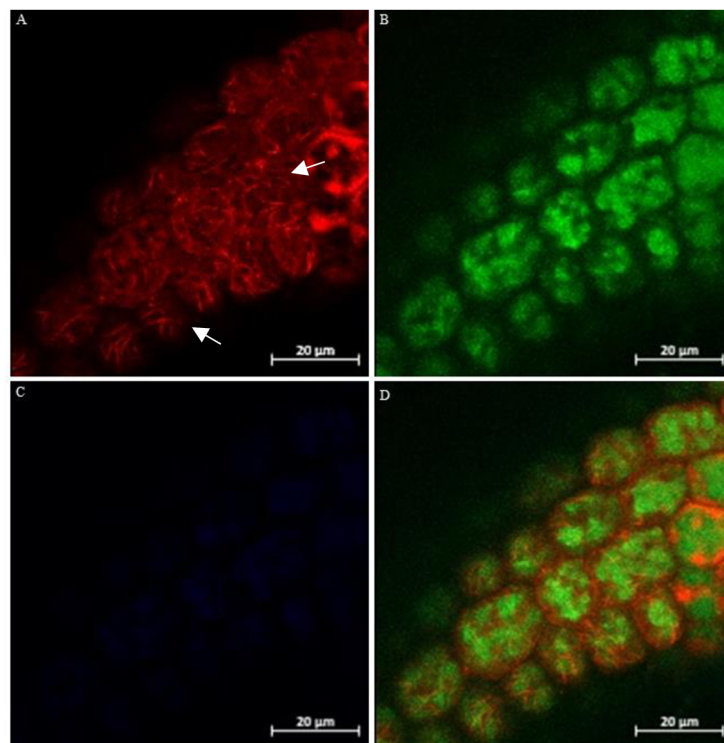


Obrázok 13: *in vivo* preparáty embryí v kotyledonárnom štádiu *A. thaliana* Col-0 exprimujúcich GFP-KTN1 a mCherry-TUA5, viditeľné výrazné fluorescenčné zóny v RFP kanále vo vrcholovom apikálnom meristéme a vo vyvíjajúcom sa hypokotyle, A,F, K: RFP kanál, B, C, G: GFP kanál, C, H, M: DAPI kanál, D, I, N: spojený kanál, E, J, O: prechádzajúce svetlo, objektiv 40x10, mierka=20  $\mu$ m, epifluorescenčný mikroskop Zeiss Axio Imager.M2





Obrázok 14: *in vivo* preparáty embryí v kotyledonárnom štádiu *A. thaliana* Col-0 exprimujúcich GFP-KTN1 a mCherry-TUA5, viditeľné výrazné fluorescenčné zóny v RFP kanále vo vyvíjajúcom sa hypokotyle, A, F, L: RFP kanál, B, G, M: GFP kanál, C, H, N: DAPI kanál, D, I, O: spojený kanál, E, K, P: prechádzajúce svetlo, A: objektív 40x10, mierka 20  $\mu\text{m}$ , F: objektív 63x10, mierka 20  $\mu\text{m}$ , L: objektív 100x10, mierka 10  $\mu\text{m}$ , mikroskop Zeiss Axio Imager.M2



Obrázok 15: Detailný obrázok buniek vyvíjajúceho sa hypokotylu embrya *A. thaliana* Col-0 exprimujúcich GFP-KTN1 a mCherry-TUA5 v kotyledonárnom štádiu s viditeľnými fluorescenčne značenými mikrotubulmi (šípky), objektív 20x10, mikroskop LSM 710 Axio Imager 2

## 5 DISKUSIA

V rámci praktickej časti bolo zrealizovaných niekoľko experimentov. V prvom rade bola analyzovaná organizácia mikrotubulov dvoch línií *A. thaliana* a to konkrétne línie Col-0 exprimujúcej mCherry-TUA5 a GFP-FABD2 a mutantnej línie *ktn1-2*, ktorá taktiež exprimuje mCherry-TUA5 a GFP-FABD2. Organizácia mikrotubulov bola pozorovaná v bunkách hypokotylu semenáčikov, následne boli mikroskopické fotky analyzované prostredníctvom programu Cytospectre. V mutantnej línií *ktn1-2* nie je exprimovaný katanin, čo zapríčiňuje náhodnú organizáciu mikrotubulov v bunkách, vďaka čomu dochádza k isotropickému rastu a tým k defektom pri elongácii buniek. Čo bolo viditeľné na bunkách hypokotylu, keďže narozdiel od buniek *A. thaliana* Col-0, ktoré mali predĺžený tvar, bunky mutantnej línie kataninu mali zaguľatený tvar. V mutantnej línií *ktn1-2* boli taktiež zaznamenané zväzky mikrotubulov. Tieto výsledky odpovedajú výsledkom zaznamenaných v štúdií (Komis *et al.*, 2017). Tento experiment bol uskutočnený za účelom otestovania protokolu a následných analýz pre ďalšie zrealizovaných experimentov a to konkrétne tranzientnej transformácie *N. benthamiana*.

V rámci experimentu tranzientnej transformácie *N. benthamiana* bola sledovaná interakcia dvoch proteínov a to KTN1 a MPK4, ktoré boli fuzované jedným z koncov s fluorescenčným proteínom YFP. Okrem otestovania interakcie daných proteínov, bola vizualizovaná aj ich kolokalizácia na fluorescenčne značených mikrotubuloch. V prípade expresie konštruktu *35S::tagRFP:TUA6* bola zaznamenaná znížený signál rovnako ako aj artefakty v bunkách vo forme spotov, čo mohlo byť na jednu stranu zapríčinené nadregulovanou aktivitou funkcie kataninu. Konštrukt *35S::tagRFP:TUA6* bol otestovaný pred samotným hlavným experimentom, mikroskopické pozorovanie infiltrovaných listov bolo zrealizované prostredníctvom epifluorescenčného mikroskopu (Zeiss) Axio Imager M2, pričom neboli zaznamenané spomínané artefakty. Na druhú stranu na tranzientnú transformáciu boli použité rastliny *N. benthamiana*, ktoré boli staré 7 týždňov, čo mohlo spôsobiť zníženú efektivitu infikovania rastlín prostredníctvom *A. tumefaciens*, keďže staršie rastliny majú vyvinuté lepšie obranné mechanizmy. Každopádne napriek zníženej expresii konštruktu *35S::tagRFP:TUA6* bolo možné zaznamenať kolokalizáciu interagujúcich proteínov MPK4 a KTN1 na mikrotubuloch. V rámci tohto experimentu bola vyvinutá metóda na vyhodnotenie počtu zelených a bielych spotov prostredníctvom programu ImageJ. Bolo uskutočnených niekoľko analýz, konkrétne bola vyhodnotená distribúcia početnosti zelených a bielych spotov

podľa veľkosti nameranej plochy jednotlivých spotov, následne bola prepočítaná relatívna veľkosť plochy. Z oboch grafov bola viditeľná rastúca tendencia početnosti plochy so znižujúcou sa veľkosťou plochy jednotlivých spotov. Následne bola analyzovaná percentuálna početnosť zelených a bielych spotov v rámci 10 intervalov. Najvyššia nameraná početnosť pre oba spoty bola zaznamenaná pri intervale 1.

V rámci praktickej časti bakalárskej práce bola taktiež uskutočnená metóda nepriamej somatickej embryogenézy, táto metóda bola rozpracovaná s cieľom následnej stabilnej transformácie. Z časových dôvodov rovnako ako aj nízkej úspešnosti nebola zrealizovaná stabilná transformácia línie *M. sativa 35S::tagRFP:TUA6*. Nízka úspešnosť bola na jednu stranu spôsobená kontamináciami explantátov. V druhom kole somatickej embryogenézy bola doba sterilizácie predĺžená z dôvodu použitia staršieho rastlinného materiálu. Predĺžená doba sterilizácie listov mohla spôsobiť usmrtenie buniek, vďaka čomu z explantátov umiestnených na B5H médium nevznikli kalusy, čo vo výsledku spôsobilo zníženú úspešnosť metódy nepriamej somatickej embryogenézy.

V prípade fenotypových analýz bolo otestovaných niekoľko protokolov zameraných primárne na vývojové štádia embryí. Najprv bol overený protokol na prípravu trvalých a fixovaných preparátov oplodnených vajíčok s rôznymi vývojovými štádiami. Pôvodne bol tento protokol využitý na oplodnené aj neoplodnené vajíčka *A. thaliana*. V tejto štúdií boli analyzované jednotlivé vývojové štádia embryí rovnako ako aj umiestnenie vaječnej a centrálnej buky v embryonálnom vaku mutantnej línie kataninu v porovnaní s divokým typom *A. thaliana*. Pričom boli zaznamenané defekty a aberantný vývoj embryí, navyše boli zaznamenané abnormality pri umiestnení centrálnej a vaječnej bunky (Luptovčíak *et al.*, 2017b). Tento protokol bol simultánne testovaný na vajíčkach *A. thaliana* Col-0 a *M. sativa* RSY. Cieľom tejto fenotypovej analýzy bolo po úspešnom otestovaní protokolu na piestikoch *M. sativa* RSY a následne sa presunúť na analýzu dvoch mutantných línií a to GFP-SIMK a SIMKi (Hrbáčková *et al.*, 2021). V prípade týchto dvoch línií mal by analyzovaný efekt nadexpresie SIMK a umlčanej SIMK a mal byť sledovaný vplyv na vývojové štádia embryí. Tento protokol alebo úspešne aplikovateľný na vajíčka *M. sativa*. Keďže oproti vajíčkam *A. thaliana* sú väčšie, vo väčšine prípadov nebolo možné zachytiť vnútro embryonálneho vaku a vyvíjajúce sa embryá.



V rámci fenotypových analýz bol taktiež testovaný protokol na štvornásobné farbenie (Alexander *et al.*, 1987). Tento protokol bol testovaný na vizualizáciu pohybu peľových vrecúšok vo vnútri piestiku prostredníctvom diferenciálneho farbenia opelených piestikov *A. thaliana* Col-0. Napriek tomu že boli uskutočnené dve opakovania protokolu, pričom nebolo možné vizualizovať pohyb peľových vrecúšok vo vnútri piestiku. Pri prvom opakovaní bolo postupované podľa publikovaného protokolu, pričom piestiky boli výrazne zafarbené len kyslým fuchsinom do ružova, čo mohlo byť spôsobené prídavkom chloral hydrátu do zmäkčovacieho a odfarbovacieho média. Z tohto dôvodu bol protokol následne modifikovaný (Hebbar *et al.*, 2021), bolo pripravené nové zmäkčovacie a odfarbovacie médium, do ktorého nebol pridaný chloral hydrát. Vo výsledku boli piestiky sfarbené viac do tmavšej rúžovej, peľové zrná boli sfarbené do fialovej. Napriek modifikovaniu protokolu diferenciálne farbenie nebolo úspešné a nebolo možné vizualizovať zafarbené peľové vrecúška vo vnútri piestiku.

V poslednej časti fenotypových analýz bolo skúšané *in vivo* pozorovanie vývojových štádií embryí *A. thaliana* Col-0 exprimujúcej GFP-KTN1 a mCherry-TUA5. Tento experiment bol zrealizovaný za účelom sledovania organizácie mikrotubulov v jednotlivých embryonálnych štádiách. Keďže bol preukázaný vplyv kataninu na embryogenézu okrem divokého typu boli vysadené aj mutantné línie kataninu *ktn1-2* exprimujúce fluorescenčne značene cytoskeletárne markre, vďaka čomu by bolo možné porovnať organizáciu mikrotubulov v týchto dvoch líniach a sledovať tak vplyv neprítomnosti kataninu na orientáciu bunkového delenia vedúc tak k defektom v počiatkových fázach vývoja embryí. Preparáty embryí *A. thaliana* Col-0 boli najprv pozorované prostredníctvom epifluorescenčného mikroskopu (Zeiss) Axio Imager.M2, nebolo možné zachytiť štruktúru mikrotubulov v bunkách, preto boli následne preparáty fotené prostredníctvom konfokálneho skenovacieho laserového mikroskopu, ktorým bolo možné vizualizovať mikrotubuly vo vnútri buniek embrya v kotyledonárnom štádiu. Z časových dôvodov nebolo možné pokračovať na experimente a sledovať organizáciu mikrotubulov v jednotlivých vývojových štádiách embryí.

## 6 ZÁVER

V rámci teoretickej časti bola vypracovaná rešerš zameraná na proteín katanin a mitogénom aktivované proteín kinázy. V rámci rešerše bola spísaná základná charakteristika cytoskeletu so zameraním na mikrotubuly, ich stavbu a funkcie v rámci bunky. Ďalej bol popísaný proteín katanin, jeho celulárne funkcie, jeho význam pri organizácii mikrotubulov, organizácii preprofázového pásu a delenia buniek, rovnako ako aj jeho význam pri vývojových procesoch. V rámci časti zameranej na mitogénom aktivované proteín kinázy, bola spísaná ich základná charakteristika, význam pri signalizácii na abiotické a biotické stresové faktory.

V experimentálnej časti bakalárskej práce bolo uskutočnených niekoľko experimentov a testovanie niekoľkých protokolov. V prvom rade bola uskutočnená analýza organizácie mikrotubulov buniek hypokotylu semenáčikov dvoch línií *A. thaliana* a to Col-0 v porovnaní s mutantnou líniou *ktn1-2*, analýza organizácie mikrotubulov bola zrealizované prostredníctvom programu Cytospectre. Tento experiment bol uskutočnený s cieľom otestovania práce s daným programom a vyhodnotenia analýz.

V rámci praktickej časti bola taktiež zrealizovaná tranzientná transformácia listov *N. benthamiana*, pričom bola testovaná interakcia proteínov MPK4 a KTN1. Následne boli uskutočnené analýzy zamerané na vyhodnotenie percentuálnej početnosti zelených a bielych spotov a distribúcie zelených a bielych spotov.

V rámci fenotypových analýz bolo uskutočnených niekoľko experimentov. Najprv bol testovaný protokol na prípravu fixovaných a odfarbených embryí na *M. sativa*, ktorý bol úspešne aplikovaný na embryá *A. thaliana*. Následne bol testovaný protokol štvornásobného farbenia na vizualizáciu pohybu peľových vrecúšok v piestikoch *A. thaliana* s cieľom sledovať rozdiely medzi divokým typom a mutantnou líniou kataninu *A. thaliana*. V poslednej časti fenotypových analýz boli pripravené *in vivo* preparáty embryí s cieľom vizualizovať organizáciu mikrotubulov v líniach *A. thaliana* Col-0 exprimujúcimi GFP-KTN1 a mCherry-TUA5, po úspešnej vizualizácii štruktúry mikrotubulov, bolo v pláne pokračovať na mutantných líniach *ktn1-2* a porovnávať organizáciu mikrotubulov v divokom type a mutantnej línií.

## 7 REFERENCIE

Akhmanova, Anna, a Michel O. Steinmetz. “Control of Microtubule Organization and Dynamics: Two Ends in the Limelight”. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 16, č. 12 (december 2015): 711–26. <https://doi.org/10.1038/nrm4084>.

Andreasson, Erik, Thomas Jenkins, Peter Brodersen, Stephan Thorgrimsen, Nikolaj H T Petersen, Shijiang Zhu, Jin-Long Qiu, et al. “The MAP kinase substrate MKS1 is a regulator of plant defense responses”. *The EMBO Journal* 24, č. 14 (20. júl 2005): 2579–89. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600737>.

Asai, Tsuneaki, Guillaume Tena, Joulia Plotnikova, Matthew R. Willmann, Wan-Ling Chiu, Lourdes Gomez-Gomez, Thomas Boller, Frederick M. Ausubel, a Jen Sheen. “MAP Kinase Signalling Cascade in Arabidopsis Innate Immunity”. *Nature* 415, č. 6875 (február 2002): 977–83. <https://doi.org/10.1038/415977a>.

Bar-Nun, Shoshana, a Michael H. Glickman. “Proteasomal AAA-ATPases: Structure and Function”. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1823, č. 1 (január 2012): 67–82. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.07.009>.

Beck, Martina, George Komis, Anja Ziemann, Diedrik Menzel, a Jozef Šamaj. “Mitogen-Activated Protein Kinase 4 Is Involved in the Regulation of Mitotic and Cytokinetic Microtubule Transitions in Arabidopsis Thaliana”. *New Phytologist* 189, č. 4 (2011): 1069–83. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03565.x>.

Beck, Martina, George Komis, Jens Müller, Diedrik Menzel, a Jozef Šamaj. “Arabidopsis Homologs of Nucleus- and Phragmoplast-Localized Kinase 2 and 3 and Mitogen-Activated Protein Kinase 4 Are Essential for Microtubule Organization[W]”. *The Plant Cell* 22, č. 3 (marec 2010): 755–71. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.071746>.

Berro, Julien, Alphée Michelot, Laurent Blanchoin, David R. Kovar, a Jean-Louis Martiel. “Attachment Conditions Control Actin Filament Buckling and the Production of Forces”. *Biophysical Journal* 92, č. 7 (apríl 2007): 2546–58. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.094672>.

Burk, David H., Bo Liu, Ruiqin Zhong, W. Herbert Morrison, a Zheng-Hua Ye. “A Katanin-Like Protein Regulates Normal Cell Wall Biosynthesis and Cell Elongation”. *The Plant Cell* 13, č. 4 (apríl 2001): 807. <https://doi.org/10.2307/3871342>.

- Bush, S. M., a P. J. Krysan. “Mutational Evidence That the Arabidopsis MAP Kinase MPK6 Is Involved in Anther, Inflorescence, and Embryo Development”. *Journal of Experimental Botany* 58, č. 8 (23. apríl 2007): 2181–91. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm092>.
- Cardinale, F., C. Jonak, W. Ligterink, K. Niehaus, T. Boller, a H. Hirt. “Differential Activation of Four Specific MAPK Pathways by Distinct Elicitors”. *The Journal of Biological Chemistry* 275, č. 47 (24. november 2000): 36734–40. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007418200>.
- Colcombet, Jean, a Heribert Hirt. “Arabidopsis MAPKs: A Complex Signalling Network Involved in Multiple Biological Processes”. *Biochemical Journal* 413, č. 2 (15. júl 2008): 217–26. <https://doi.org/10.1042/BJ20080625>.
- Conde, Cecilia, a Alfredo Cáceres. “Microtubule Assembly, Organization and Dynamics in Axons and Dendrites”. *Nature Reviews Neuroscience* 10, č. 5 (máj 2009): 319–32. <https://doi.org/10.1038/nrn2631>.
- Cristina, Maria, Morten Petersen, a John Mundy. “Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling in Plants”. *Annual Review of Plant Biology* 61, č. 1 (02. jún 2010): 621–49. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112252>.
- Deinum, Eva E., Simon H. Tindemans, Jelmer J. Lindeboom, a Bela M. Mulder. “How Selective Severing by Katanin Promotes Order in the Plant Cortical Microtubule Array”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114, č. 27 (03. júl 2017): 6942–47. <https://doi.org/10.1073/pnas.1702650114>.
- Dominguez, Roberto, a Kenneth C. Holmes. “Actin Structure and Function”. *Annual Review of Biophysics* 40, č. 1 (09. jún 2011): 169–86. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-042910-155359>.
- Gao, Minghui, Jinman Liu, Dongling Bi, Zhibin Zhang, Fang Cheng, Sanfeng Chen, a Yuelin Zhang. “MEKK1, MKK1/MKK2 and MPK4 Function Together in a Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade to Regulate Innate Immunity in Plants”. *Cell Research* 18, č. 12 (december 2008): 1190–98. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.300>.
- Garbett, Damien, a Anthony Bretscher. “The Surprising Dynamics of Scaffolding Proteins”. Zostavil Keith G. Kozminski. *Molecular Biology of the Cell* 25, č. 16 (15. august 2014): 2315–19. <https://doi.org/10.1091/mbc.e14-04-0878>.

Gardiner, J. “Movement disorders, 2nd Edn,” in *Use of Arabidopsis to Model Hereditary Spastic Paraplegia and Other Movement Disorders*, ed M. LeDoux (Amsterdam: Elsevier Publishers), (2014): 1136–1142.

Garrington, Timothy P, a Gary L Johnson. “Organization and Regulation of Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathways”, n.d., 8.

Girard, Chloe, Liudmila Chelysheva, Sandrine Choinard, Nicole Froger, Nicolas Macaisne, Afef Lehemdi, Julien Mazel, Wayne Crismani, a Raphael Mercier. “AAA-ATPase FIDGETIN-LIKE 1 and Helicase FANCM Antagonize Meiotic Crossovers by Distinct Mechanisms”. Zostavil Michael Lichten. *PLOS Genetics* 11, č. 7 (10. júl 2015): e1005369. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005369>.

Hamada, Takahiro. “Microtubule-Associated Proteins in Higher Plants”. *Journal of Plant Research* 120, č. 1 (01. január 2007): 79–98. <https://doi.org/10.1007/s10265-006-0057-9>.

Hashimoto, Takashi. “A Ring for All:  $\gamma$ -Tubulin-Containing Nucleation Complexes in Acentrosomal Plant Microtubule Arrays”. *Current Opinion in Plant Biology* 16, č. 6 (december 2013): 698–703. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2013.09.002>.

Hashimoto, Takashi. “Microtubules in Plants”. *The Arabidopsis Book* 13 (január 2015): e0179. <https://doi.org/10.1199/tab.0179>.

Hebbar, K. B., P. Neethu, P. Abhin Sukumar, M. Sujithra, Arya Santhosh, S. V. Ramesh, V. Niral, G. S. Hareesh, Paingamadathil Ommer Nameer, a P. V. V. Prasad. “Understanding Physiology and Impacts of High Temperature Stress on the Progamic Phase of Coconut (*Cocos Nucifera* L.)”. *Plants* 9, č. 12 (26. november 2020): 1651. <https://doi.org/10.3390/plants9121651>.

Hrbáčková, Miroslava, Ivan Luptovciak, Kateřina Hlaváčková, Petr Dvořák, Michaela Tichá, Olga Šamajová, Dominik Novák, et al. “Overexpression of Alfalfa SIMK Promotes Root Hair Growth, Nodule Clustering and Shoot Biomass Production”. *Plant Biotechnology Journal* 19, č. 4 (2021): 767–84. <https://doi.org/10.1111/pbi.13503>.

Ichimura, Kazuya, Catarina Casais, Scott C. Peck, Kazuo Shinozaki, a Ken Shirasu. “MEKK1 Is Required for MPK4 Activation and Regulates Tissue-Specific and Temperature-Dependent Cell Death in Arabidopsis\*<sup>†</sup>”. *Journal of Biological Chemistry* 281, č. 48 (01. december 2006): 36969–76. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605319200>.

Ivan Luptovčiak. The role of selected mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis*. UPOL Olomouc, 2017 [cit. 2023-05-08]

Jonak, Claudia, Hirofumi Nakagami, a Heribert Hirt. “Heavy Metal Stress. Activation of Distinct Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways by Copper and Cadmium”. *Plant Physiology* 136, č. 2 (01. október 2004): 3276–83.  
<https://doi.org/10.1104/pp.104.045724>.

Jonak, Claudia, Stefan Kiegerl, Heribert Hirt, Clive Lloyd, a Jordi Chan. “MMK2, a Novel Alfalfa MAP Kinase, Specifically Complements the Yeast MPK1 Function”. *Molecular and General Genetics MGG* 248, č. 6 (október 1995): 686–94.  
<https://doi.org/10.1007/BF02191708>.

Kent, Ian A., a Tanmay P. Lele. “Microtubule-based Force Generation”. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology* 9, č. 3 (máj 2017).  
<https://doi.org/10.1002/wnan.1428>.

Khokhlatchev, Andrei V, Bertram Canagarajah, Julie Wilsbacher, Megan Robinson, Mark Atkinson, Elizabeth Goldsmith, a Melanie H Cobb. “Phosphorylation of the MAP Kinase ERK2 Promotes Its Homodimerization and Nuclear Translocation”. *Cell* 93, č. 4 (máj 1998): 605–15. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81189-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81189-7).

Kiegerl, Stefan, Francesca Cardinale, Christine Siligan, Andrea Gross, Emmanuel Baudouin, Aneta Liwosz, Staffan Eklöf, et al. “SIMKK, a Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Kinase, Is a Specific Activator of the Salt Stress–Induced MAPK, SIMK”. *The Plant Cell* 12, č. 11 (november 2000): 2247–58.

Kollman, Justin M., Andreas Merdes, Lionel Mourey, a David A. Agard. “Nature Reviews Molecular Cell Biology Microtubule nucleation by  $\gamma$ -tubulin complexes”. *Nature reviews. Molecular cell biology* 12, č. 11 (12. október 2011): 709–21.  
<https://doi.org/10.1038/nrm3209>.

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, Yuh-Ru Julie, a Bo Liu. “Microtubule Nucleation for the Assembly of Acentrosomal Microtubule Arrays in Plant Cells”. *New Phytologist* 222, č. 4 (jún 2019): 1705–18. <https://doi.org/10.1111/nph.15705>.

Lindeboom, Jelmer J., Masayoshi Nakamura, Anneke Hibbel, Kostya Shundyak, Ryan Gutierrez, Tijs Ketelaar, Anne Mie C. Emons, Bela M. Mulder, Viktor Kirik, a David W. Ehrhardt. “A Mechanism for Reorientation of Cortical Microtubule Arrays Driven by Microtubule Severing”. *Science* 342, č. 6163 (06. december 2013): 1245533. <https://doi.org/10.1126/science.1245533>.

Liu, Yidong, a Shuqun Zhang. “Phosphorylation of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid Synthase by MPK6, a Stress-Responsive Mitogen-Activated Protein Kinase, Induces Ethylene Biosynthesis in Arabidopsis[W]”. *The Plant Cell* 16, č. 12 (03. december 2004): 3386–99. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.026609>.

Luptovčiak, Ivan, Despina Samakovli, George Komis, a Jozef Šamaj. “KATANIN 1 Is Essential for Embryogenesis and Seed Formation in Arabidopsis”. *Frontiers in Plant Science* 8 (05. máj 2017b): 728. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00728>.

Luptovčiak, Ivan, George Komis, Tomáš Takáč, Miroslav Ovečka, a Jozef Šamaj. “Katanin: A Sword Cutting Microtubules for Cellular, Developmental, and Physiological Purposes”. *Frontiers in Plant Science* 8 (21. november 2017a): 1982. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01982>.

McNally, Francis J., a Ronald D. Vale. “Identification of Katanin, an ATPase That Severs and Disassembles Stable Microtubules”. *Cell* 75, č. 3 (november 1993): 419–29. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90377-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90377-3).

Mészáros, Tamás, Anne Helfer, Elizabeth Hatzimasoura, Zoltán Magyar, Liliya Serazetdinova, Gabino Rios, Viola Bardóczy, et al. “The Arabidopsis MAP Kinase Kinase MKK1 Participates in Defence Responses to the Bacterial Elicitor Flagellin”. *The Plant Journal* 48, č. 4 (2006): 485–98. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02888.x>.

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>.

Murata, Takashi, Seiji Sonobe, Tobias I. Baskin, Susumu Hyodo, Seiichiro Hasezawa, Toshiyuki Nagata, Tetsuya Horio, a Mitsuyasu Hasebe. “Microtubule-Dependent

Microtubule Nucleation Based on Recruitment of  $\gamma$ -Tubulin in Higher Plants”. *Nature Cell Biology* 7, č. 10 (október 2005): 961–68. <https://doi.org/10.1038/ncb1306>.

Nakamura, Masayoshi, David W. Ehrhardt, a Takashi Hashimoto. “Microtubule and Katanin-Dependent Dynamics of Microtubule Nucleation Complexes in the Acentrosomal Arabidopsis Cortical Array”. *Nature Cell Biology* 12, č. 11 (november 2010): 1064–70. <https://doi.org/10.1038/ncb2110>.

Nakamura, Masayoshi. “Microtubule Nucleating and Severing Enzymes for Modifying Microtubule Array Organization and Cell Morphogenesis in Response to Environmental Cues”. *New Phytologist* 205, č. 3 (2015): 1022–27. <https://doi.org/10.1111/nph.12932>.

Onelli, Elisabetta, Aurora I. Idilli, a Alessandra Moscatelli. “Emerging Roles for Microtubules in Angiosperm Pollen Tube Growth Highlight New Research Cues”. *Frontiers in Plant Science* 6 (10. február 2015). <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00051>.

Ovečka, Miroslav, Tomáš Takáč, George Komis, Pavol Vadovič, Slávka Bekešová, Anna Doskočilová, Veronika Smékalová, et al. “Salt-induced subcellular kinase relocation and seedling susceptibility caused by overexpression of Medicago SIMKK in Arabidopsis”. *Journal of Experimental Botany* 65, č. 9 (01. jún 2014): 2335–50. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru115>.

Panteris, Emmanuel, a Ioannis-Dimosthenis S. Adamakis. “Aberrant Microtubule Organization in Dividing Root Cells of P60-Katanin Mutants”. *Plant Signaling & Behavior* 7, č. 1 (január 2012): 16–18. <https://doi.org/10.4161/psb.7.1.18358>.

Panteris, Emmanuel, Ioannis-Dimosthenis S. Adamakis, Georgia Voulgari, a Galini Papadopoulou. “A Role for Katanin in Plant Cell Division: Microtubule Organization in Dividing Root Cells of Fra2 and Lue1 Arabidopsis Thaliana Mutants”. *Cytoskeleton* 68, č. 7 (júl 2011): 401–13. <https://doi.org/10.1002/cm.20522>.

Petrášek, Jan, a Kateřina Schwarzerová. “Actin and Microtubule Cytoskeleton Interactions”. *Current Opinion in Plant Biology* 12, č. 6 (december 2009): 728–34. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.09.010>.

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 (01. január 2018): 61–80.

<https://doi.org/10.1074/mcp.RA117.000135>.

Ross, Jennifer L., Henry Shuman, Erika L.F. Holzbaur, a Yale E. Goldman. “Kinesin and Dynein-Dynactin at Intersecting Microtubules: Motor Density Affects Dynein Function”. *Biophysical Journal* 94, č. 8 (2008): 3115–25.

<https://doi.org/10.1529/biophysj.107.120014>.

Seguí-Simarro, José M., Pilar S. Testillano, Stefan Jouannic, Yves Henry, a Maria C. Risueño. “Mitogen-Activated Protein Kinases Are Developmentally Regulated during Stress-Induced Microspore Embryogenesis in *Brassica Napus L*”. *Histochemistry and Cell Biology* 123, č. 4–5 (jún 2005): 541–51. <https://doi.org/10.1007/s00418-004-0749-y>.

Shimmen, Teruo. “The Sliding Theory of Cytoplasmic Streaming: Fifty Years of Progress”. *Journal of Plant Research* 120, č. 1 (13. február 2007): 31–43.

<https://doi.org/10.1007/s10265-006-0061-0>.

Schaefer, Estelle, Katia Belcram, Magalie Uyttewaal, Yann Duroc, Magali Goussot, David Legland, Elise Laruelle, Marie-Ludivine de Tauzia-Moreau, Martine Pastuglia, a David Bouchez. “The Preprophase Band of Microtubules Controls the Robustness of Division Orientation in Plants”. *Science* 356, č. 6334 (14. apríl 2017): 186–89.

<https://doi.org/10.1126/science.aal3016>.

Slautterback, David B. “CYTOPLASMIC MICROTUBULES”. *Journal of Cell Biology* 18, č. 2 (01. august 1963): 367–88. <https://doi.org/10.1083/jcb.18.2.367>.

Soga, Kouichi, Aya Yamaguchi, Toshihisa Kotake, Kazuyuki Wakabayashi, a Takayuki Hoson. “1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid (ACC)-Induced Reorientation of Cortical Microtubules Is Accompanied by a Transient Increase in the Transcript Levels of  $\gamma$ -Tubulin Complex and Katanin Genes in Azuki Bean Epicotyls”. *Journal of Plant Physiology* 167, č. 14 (september 2010): 1165–71.

<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.04.001>.

Song, Yuguang, Jiao Lv, Zongqi Ma, a Wei Dong. “The Mechanism of Alfalfa (*Medicago Sativa L.*) Response to Abiotic Stress”. *Plant Growth Regulation* 89, č. 3 (01. december 2019): 239–49. <https://doi.org/10.1007/s10725-019-00530-1>.

Stoppin-Mellet, Virginie, Jérémie Gaillard, a Marilyn Vantard. “Katanin’s Severing Activity Favors Bundling of Cortical Microtubules in Plants”. *The Plant Journal* 46, č. 6 (jún 2006): 1009–17. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02761.x>.

Takáč, Tomáš, Pavol Vadovič, Tibor Pechan, Ivan Luptovčiak, Olga Šamajová, a Jozef Šamaj. “Comparative Proteomic Study of Arabidopsis Mutants Mpk4 and Mpk6”. *Scientific Reports* 6, č. 1 (21. jún 2016): 28306. <https://doi.org/10.1038/srep28306>.

Takahashi, Fuminori, Riichiro Yoshida, Kazuya Ichimura, Tsuyoshi Mizoguchi, Shigemi Seo, Masahiro Yonezawa, Kyonoshin Maruyama, Kazuko Yamaguchi-Shinozaki, a Kazuo Shinozaki. “The Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade MKK3–MPK6 Is an Important Part of the Jasmonate Signal Transduction Pathway in Arabidopsis”. *The Plant Cell* 19, č. 3 (30. apríl 2007): 805–18. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.046581>.

Tang, Elizabeth I, Dolores D Mruk, a C Yan Cheng. “MAP/Microtubule Affinity-Regulating Kinases, Microtubule Dynamics, and Spermatogenesis”. *Journal of Endocrinology* 217, č. 2 (máj 2013): R13–23. <https://doi.org/10.1530/JOE-12-0586>.

Teige, Markus, Elisabeth Scheikl, Thomas Eulgem, Róbert Dóczi, Kazuya Ichimura, Kazuo Shinozaki, Jeffery L. Dangl, a Heribert Hirt. “The MKK2 Pathway Mediates Cold and Salt Stress Signaling in Arabidopsis”. *Molecular Cell* 15, č. 1 (02. júl 2004): 141–52. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.06.023>.

Thulasi Devendrakumar, Karen, Xin Li, a Yuelin Zhang. “MAP Kinase Signalling: Interplays between Plant PAMP- and Effector-Triggered Immunity”. *Cellular and Molecular Life Sciences* 75, č. 16 (01. august 2018): 2981–89. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2839-3>.

Uyttewaal, Magalie, Agata Burian, Karen Alim, Benoît Landrein, Dorota Borowska-Wykręć, Annick Dedieu, Alexis Peaucelle, et al. “Mechanical Stress Acts via Katanin to Amplify Differences in Growth Rate between Adjacent Cells in Arabidopsis”. *Cell* 149, č. 2 (apríl 2012): 439–51. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.048>.

Vale, Ronald D. “Severing of Stable Microtubules by a Mitotically Activated Protein in Xenopus Egg Extracts”. *Cell* 64, č. 4 (február 1991): 827–39. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90511-V](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90511-V).

Vos, Jan W., Marileen Dogterom, a Anne Mie C. Emons. “Microtubules Become More Dynamic but Not Shorter during Preprophase Band Formation: A Possible ‘Search-and-Capture’ Mechanism for Microtubule Translocation”. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 57, č. 4 (april 2004): 246–58. <https://doi.org/10.1002/cm.10169>.

Wang, Bo, Xinghua Qin, Juan Wu, Hongying Deng, Yuan Li, Hailian Yang, Zhongzhou Chen, Guoqin Liu, a Dongtao Ren. “Analysis of Crystal Structure of Arabidopsis MPK6 and Generation of Its Mutants with Higher Activity”. *Scientific Reports* 6, č. 1 (10. máj 2016): 25646. <https://doi.org/10.1038/srep25646>.

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/emj.201796823>.

Wightman, Raymond, a Simon R. Turner. “Severing at Sites of Microtubule Crossover Contributes to Microtubule Alignment in Cortical Arrays: Microtubule Dynamics”. *The Plant Journal* 52, č. 4 (18. september 2007): 742–51. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03271.x>.

Zanke, Brent W, Kimberly Boudreau, Elizabeth Rubie, Elaine Winnett, Lee Anne Tibbles, Leonard Zon, John Kyriakis, Fei-Fei Liu, a James R Woodgett. “The Stress-Activated Protein Kinase Pathway Mediates Cell Death Following Injury Induced by Cis-Platinum, UV Irradiation or Heat”. *Current Biology* 6, č. 5 (máj 1996): 606–13. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00547-X](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00547-X).

Zhang, Yanwen, Michail Iakovidis, a Silvia Costa. “Control of Patterns of Symmetric Cell Division in the Epidermal and Cortical Tissues of the Arabidopsis Root”. *Development*, 01. január 2016, dev.129502. <https://doi.org/10.1242/dev.129502>.

## 8 ZOZNAM SKRATIEK

ABA	kyselina abscisová
AOS	z. angl. activated oxygen species
bZIP	z angl. basic leucine zipper
CLSM	konfokálny laserový skenovací mikroskop
DAPI	4,6-diamidino-2-fenylindol
DAT	z angl. Day After Transformation
dH <sub>2</sub> O	destilovaná voda
flg22	flagelin 22
FRK1	FLG22-INDUCED RECEPTOR KINASE1
GDP	Guanosindifosfát
GFP	z angl. Green Fluorescent Protein
GTP	Guanosintrifosfát
JA	kyselina jasmónová
KAN	kanamycin
LB médium	médium Luria-Bertani
MAPK	mitogénom aktivovaná proteín kináza
MAPKK	mitogénom aktivovaná proteín kináza kináza
MAPKKK	mitogénom aktivovaná proteín kináza kináza kináza
MAPKKKK	mitogénom aktivovaná proteín kináza kináza kináza kináza
MEKK	mitogénom aktivovaná proteín kináza kináza kináza
MES	kyselina 2-(N-morfolino)ethansulfonová
MMK2	z angl. medicago mitogen activated protein kinase 2
MPK	mitogénom aktivovaná proteín kináza
MPK3	mitogénom aktivovaná proteín kináza kináza kináza

MS médium	Murashige and Skoog médium
MT	mikrotubuly
MTOCs	z angl. microtubule organizing centres
OD <sub>600</sub>	optická hustota pri vlnovej dĺžke 600 nm
PAMP	z angl. pathogen-associated molecular patterns
PR1	z angl. PATHOGEN-RELATED 1
RAF	z angl. Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
RIF	rifampicin
RLK Kinases)	receptorom podobné kinázy (z angl. Receptor-Like Kinases)
ROS	reaktívne formy kyslíku (z angl. Reactive Oxygen Species)
RSY	lína <i>Medicago sativa</i> Regen SY
SAMK	z angl. Stress-Activated MAPK
SIMK	z angl. Stress-Induced MAPK
SPE	spektinomycin
TEY	motív treonín-kyselina glutamová-tyrozín
TF	transkripčný faktor
VIP1	z angl. VirE1-INTERACTING PROTEIN1
WRKY	transkripčné faktory (názov odvodený od sekvencie heptapeptidu WRKYGQK N-terminálneho konca TF)

## 9 ZOZNAM OBRÁZKOV

Obrázok 1: Schéma vzniku mikrotubulu.....	3
Obrázok 2: Hlavné procesy dynamickej nestability mikrotubulov.....	5
Obrázok 3: Schéma vzniku komplexu kataninu.....	8
Obrázok 4: Všeobecná schéma MAPK kaskády.....	14
Obrázok 5: Organizácia mikrotubulov v bunkách hypokotylu <i>A. thaliana</i> Col-0 exprimujúce tagRFP-TUA6 a GFP-FABD2.....	37
Obrázok 6: Organizácia mikrotubulov v bunách hypokotylu <i>A. thaliana ktn1-2</i> exprimujúca mCherry-TUA5 a GFP-FABD2.....	38
Obrázok 7: Epidermálne bunky <i>N. benthamiana</i> tranzientne transformované prostredníctvom štyroch konštruktov <i>35S::MPK4:YFPn</i> , <i>35S::KTN1:YFPc</i> , <i>35S::tagRFP:TUA6</i> , <i>P19</i> (3DAT).....	39
Obrázok 8: Detailný obrázok s viditeľnými bielymi spotmi na mikrotubuloch (šípky) epidermálnej bunky <i>N. benthamiana</i> tranzientne transformovanej.....	40
Obrázok 9: Somatické embryá línie <i>M. sativa</i> tagRFP-TUA6.....	43
Obrázok 10: Trvalé fixované preparáty neoplozených a oplodnených vajíčok s jednotlivými embryonálnymi štádiami <i>A. thaliana</i> Col-0.....	44
Obrázok 11: Trvalé fixované preparáty neoplozených vajíčok <i>M. sativa</i> RSY.....	45
Obrázok 12: Piestiky zafarbené prostredníctvom metódy štvornásobného farbenia2....	46
Obrázok 13: <i>in vivo</i> preparáty embryí v kotyledonárnom štádiu <i>A. thaliana</i> Col-0 exprimujúcich GFP-KTN1 a mCherry-TUA5.....	47
Obrázok 15: Detailný obrázok buniek vyvíjajúceho sa hypokotylu embrya <i>A. thaliana</i> Col-0 exprimujúcich GFP-KTN1 a mCherry-TUA5.....	48
Obrázok 14: <i>in vivo</i> preparáty embryí v kotyledonárnom štádiu <i>A. thaliana</i> Col-0 exprimujúcich GFP-KTN1 a mCherry-TUA5.....	48

## 10 ZOZNAM TABULIEK

Tabuľka 1: Výpočet riedenia pre selekčné antibiotiká pridávané do LB média .....	23
Tabuľka 2: Príprava zásobných roztokov pre infiltračné médium .....	23
Tabuľka 3: Výpočet riedenia zásobných roztokov na požadované koncentrácie na prípravu infiltračného média .....	24
Tabuľka 4: Konštrukty použité na tranzientnú transformáciu s ich selekčnými antibiotikami (KAN-kanamycin, RIF-rifampicin) .....	27
Tabuľka 5: Kombinácie jednotlivých konštruktov, ktoré boli použité na tranzientnú transformáciu .....	31