

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2016

Bc. Durdáková Magdalena

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Charakterizace TPX2-*like* proteinů
Arabidopsis thaliana

Diplomová práce

Bc. Durd'áková Magdalena

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Forma studia: Prezenční

Olomouc 2016

Vedoucí práce: Ing. Beáta Petrovská, Ph.D.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto práci na téma Charakterizace TPX2-like proteinů *Arabidopsis thaliana* zpracovala samostatně s použitím uvedených literárních zdrojů a pod vedením Ing. Beáty Petrovské, Ph.D..

V Olomouci dne:

Poděkování:

Ráda bych poděkovala své vedoucí diplomové práce paní Ing. Beátě Petrovské, Ph.D. a paní Mgr. Evě Dvořák Tomašíkové, Ph.D. za věnovaný čas a trpělivost v průběhu psaní diplomové práce. Rovněž bych ráda poděkovala svému příteli a rodičům, kteří mě ve studiu podporovali.

SOUHRN

Během mitózy dochází k formování mitotického vřeténka a tedy k nukleaci mikrotubulů. Této organizace mikrotubulů se mimo jiné účastní i TPX2 protein (Targeting protein for Xklp2) (Vos *et al.*, 2008). V případě *Arabidopsis thaliana* existuje celá rodina genů homologních ke kanonickému TPX2 proteinu. Tyto proteiny jsou nazývány proteiny TPX2-like a dosud ještě nebyly blíže charakterizovány.

Předmětem práce bylo lokalizovat GFP a RFP fúzní varianty TPX2-like proteinu 1, TPX2-like proteinu 5 a TPX2-like proteinu 6 v buněčných kulturách a rostlinách *Arabidopsis thaliana* v průběhu buněčného cyklu.

Metodou GATEWAY[®] klonování byly připraveny GFP a RFP značené konstrukty zájmových genů. Dále byly odvozeny buněčné suspenzní kultury *Arabidopsis thaliana* ekotyp *Landsberg erecta* stabilně exprimující tyto konstrukty. V těchto suspenzích byla fluorescenční mikroskopii analyzována GFP a RFP exprese a lokalizace TPX2-like proteinu 1, TPX2-like proteinu 5 a TPX2-like proteinu 6. Nepřímým imunofluorescenčním barvením exprimovaných proteinů byl v těchto suspenzích charakterizován vztah TPX2-like proteinu 5 a jaderné DNA v průběhu buněčného cyklu. Dále byla exprese TPX2-like proteinu 5 ověřena *in vivo* přímo v rostlinách *Arabidopsis*.

TPX2-like proteiny byly během interfáze lokalizovány v jádře. V průběhu mitózy pak byla zjištěna lokalizace na strukturách dělicího vřeténka rostlinné buňky. Během cytokineze byly proteiny koncentrovány v oblasti fragmoplastu. Výsledky tedy naznačily, že TPX2-like protein 1, TPX2-like protein 5 a TPX2-like protein 6 se podílí na organizaci mitotických mikrotubulů v acentrozomálních buňkách rostlin, podobně jako TPX2 protein.

SUMMARY

During mitosis, a mitotic spindle forms and microtubules nucleate. A TPX2 (Targeting protein for Xklp2) protein participates in this organization of microtubules (Vos *et al.*, 2008). In *Arabidopsis thaliana*, there is a family of genes, which are homologs of canonic TPX2 protein. These proteins are called TPX2-like proteins and they were not described yet.

The aim of this work was to localize GFP and RFP fusion variants of TPX2-like protein 1, TPX2-like protein 5 and TPX2-like protein 6 in cell suspensions and plants of *Arabidopsis thaliana* during cell cycle.

GATEWAY strategy of cloning was used to clone GFP and RFP fusion variants of particular genes. The suspension cultures of *Arabidopsis thaliana* ecotype *Landsberg erecta* expressing these genes were derived and a localization of expressed proteins was studied during cell cycle. In addition, an immunofluorescence labelling of TPX2-like protein 5 was performed to study its localization, too. The expression of TPX2-like protein 5 was verified also in *Arabidopsis thaliana* plants.

Our data showed that these proteins were localized in nucleus during interphase. During mitosis, proteins were localized with microtubules of mitotic spindle and at the end of cell division in the region of phragmoplast. These results indicate that TPX2-like protein 1, TPX2-like protein 5 and TPX2-like protein 6 participate in organization of mitotic microtubules in acentrosomal plant cells like TPX2 protein.

OBSAH

1	ÚVOD	9
2	CÍLE PRÁCE	10
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	11
3.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	11
3.2	Jaderný proteom	12
3.3	Jaderné proteiny asociované s mikrotubuly (Microtubule-associated proteins, MAPs)	13
3.3.1	Cytoskelet rostlin.....	13
3.3.2	Proteiny asociované s mikrotubuly.....	15
3.3.3	TPX2 protein	17
3.3.4	TPX2-like protein 1	23
3.3.5	TPX2-like protein 5	24
3.3.6	TPX2-like protein 6	25
4	MATERIÁL A METODY	27
4.1	Laboratorní přístroje a pomůcky	27
4.2	Biologický materiál	28
4.2.1	Bakterie	28
4.2.2	Rostlinný materiál.....	28
4.3	GATEWAY® klonování	29
4.3.1	Navržení primerů s <i>attB</i> místy	30
4.3.2	Příprava <i>attB</i> PCR produktů	31
4.3.3	Izolace a purifikace <i>attB</i> PCR produktů z gelu.....	32
4.3.4	BP reakce	32
4.3.5	Transformace chemicky kompetentních bakterií <i>Escherichia coli</i> Top10	33
4.3.6	Izolace BP konstruktů.....	34

4.3.7	LR reakce	34
4.4	Transformace bakterií <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	35
4.5	Transformace buněčných suspenzí <i>Arabidopsis thaliana</i>	36
4.6	Imunofluorescenční barvení suspenzních kultur	36
4.7	Transformace rostlin <i>Arabidopsis thaliana</i>	37
5	VÝSLEDKY	38
5.1	GATEWAY klonování	38
5.1.1	Návrh sekvence primerů	38
5.1.2	Příprava <i>attB</i> PCR produktů	40
5.1.3	BP reakce	41
5.1.4	LR reakce	43
5.2	Transformace bakterií <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	45
5.3	Exprese v buněčných kulturách <i>Arabidopsis thaliana</i>	46
5.4	Imunofluorescenční barvení suspenzních kultur <i>Arabidopsis thaliana</i>	50
5.5	Transformace rostlin <i>Arabidopsis thaliana</i>	52
6	DISKUZE.....	54
7	ZÁVĚR	56
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	57
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	65

1 ÚVOD

V dnešní době je rostlinný genom na úrovni DNA dobře prozkoumán, avšak dosud není známo mnoho informací o proteinech v jádře rostlinné buňky. Z tohoto důvodu nemůžeme dobře porozumět tomu, jak je rostlinný genom v jádře uspořádán a jaká je jeho funkce v rostlině (Petrovská *et al.*, 2015). Studium struktury, funkce a chování jaderného proteomu v organizaci rostlinného genomu nám pomůže odhalit a lépe pochopit i funkci jaderného genomu.

Tato diplomová práce se soustředí na studium vybraných TPX2-*like* proteinů (Targeting protein for Xklp2-like, TPX2-like). Jedná se o proteiny, které jsou homologní ke kanonickému TPX2 proteinu, jenž byl poprvé popsán u *Xenopus laevis* (Witmann *et al.*, 1998). Všeobecně je známo, že TPX2 protein je asociovaný s mikrotubuly (Vos *et al.*, 2008; Petrovská *et al.*, 2012) a je nezbytný pro vznik mitotického vřeténka, a tedy segregaci chromozomů během mitózy a meiózy (Vos *et al.*, 2008).

V případě modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* existuje celá genová rodina TPX2 proteinů. Tato rodina obsahuje 9 členů, jenž byly identifikovány *in silico* (Tomašíková *et al.*, 2015) a pouze gen pro kanonický TPX2 protein byl dosud charakterizován (Vos *et al.*, 2008; Petrovská *et al.*, 2012; Petrovská *et al.*, 2013). Dosud však není znám důvod přítomnosti tak velkého množství proteinů s podobnou strukturou. Cílem této práce je charakterizace TPX2-*like* proteinu 1, TPX2-*like* proteinu 5 a TPX2-*like* proteinu 6, která přispěje k objasnění funkcí této doposud nepopsané genové rodiny.

2 CÍLE PRÁCE

- Příprava GFP a RFP fúzních variant genů pro TPX2-like protein 1, TPX2-like protein 5 a TPX2-like protein 6 ze skupiny TPX2-like proteinů.
- Ověření funkčnosti vektorů v buněčných suspenzích *Arabidopsis thaliana*.
- Studium lokalizace fúzních variant v buněčných kulturách a rostlinách *Arabidopsis thaliana* v průběhu buněčného cyklu.

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1 *Arabidopsis thaliana*

Huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) je malá kvetoucí rostlina, která je široce používaná jako modelový organismus v rostlinné biologii. Johannes Thal, který tuto rostlinu objevil v 16. století v německém pohoří Harz, ji původně nazval *Pilosella siliquosa*. Huseníček náleží do čeledi brukvovité (*Brassicaceae*). Ačkoli není ekonomicky významnou rostlinou, je úzce příbuzná zemědělsky významným plodinám - např. brokolici květákové (*Brassica oleracea* var. *botrytis italica*) a zelí hlávkovému (*Brassica oleracea* var. *capitata*) (Lamesch *et al.*, 2012).

Huseníček se vyznačuje krátkou generační dobou, je samosprašný a nenáročný na pěstování v laboratorních podmínkách. S velikostí genomu 125 Mpb, z kterého je 115,4 Mpb osekvenováno, se řadí k organismům s malým genomem. Genom je tvořen 5 chromozomy a čítá 25 498 genů (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Dalším důvodem pro využívání této rostliny v molekulární a buněčné biologii je její snadná transformovatelnost pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens*. Genové manipulace prostřednictvím genového inženýrství jsou v případě huseníčku v porovnání s ostatními rostlinami velmi rychlé a snadné. Mezi nejvíce využívané ekotypy *Arabidopsis thaliana* patří *Landsberg erecta* (LER) (Obr. 1), *Columbia* a *Wassilewskija* (Lamesch *et al.*, 2012).



Obr. 1: Dospělá rostlina *Arabidopsis thaliana* ekotyp *Landsberg erecta*.

3.2 Jaderný proteom

Eukaryotické jádro je komplex multifunkčních komponent buňky. Jedním z nich jsou i jaderné proteiny, které jsou nezbytné pro průběh klíčových procesů během replikace DNA, exprese genetické informace, dělení buňky apod. Zúčastňují se ale také reparace genetické informace či prostorové organizace jádra. Představují nejpočetnější složku jádra buňky u všech eukaryot (Petrovská *et al.*, 2015).

Zatímco u zvířat je studium jaderného proteomu již v pokročilé fázi, u rostlin se bohužel výzkum proteomu nachází pouze v začátcích. Nedostatek informací ohledně rostlinných jaderných proteinů souvisí s nejasností funkce a organizace jaderného genomu.

Existují dva možné přístupy pro charakterizaci rostlinného jaderného proteomu:

1) *Odvozování neznámých proteinů z již charakterizovaných proteinů jiných druhů*, kdy například subcelulární lokalizace proteinu může být předpovídána pomocí sekvence primárního proteinu prostřednictvím bioinformatických zdrojů. Tento způsob je běžně používán v laboratořích, avšak je velmi zdlouhavý a je možno získat pouze malé množství proteinů (Petrovská *et al.*, 2015).

2) Dalším možným způsobem je *přímá extrakce a identifikace neznámých proteinů z purifikovaných jader rostlinných buněk*. U tohoto způsobu lze naopak identifikovat stovky až tisíce nových proteinů v relativně krátkém čase (Petrovská *et al.*, 2015). V současnosti je studium proteomu založeno na kombinaci vysoko-rezolučních separačních metod, jako například dvou-dimenzionální gelové elektroforézy, kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (Thiede *et al.*, 2013).

Příkladem obou přístupů je právě studium *TPX2-like* proteinů, které byly charakterizovány jako proteiny asociované s mikrotubuly za použití prvního přístupu (Vos *et al.*, 2008; Petrovská *et al.*, 2012; Petrovská *et al.*, 2013) a současně nalezeny v jadrovém proteomu rostlin (Petrovská *et al.*, 2014; Tomašítková *et al.*, 2015).

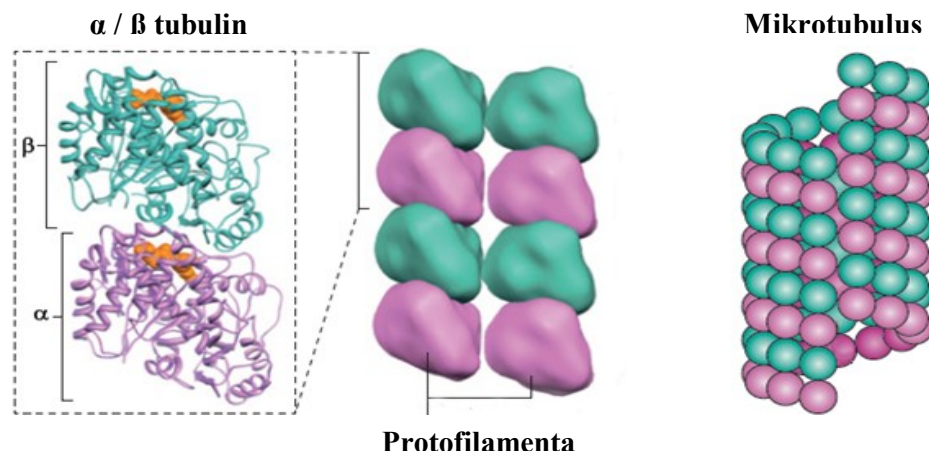
3.3 Jaderné proteiny asociované s mikrotubuly (Microtubule-associated proteins, MAPs)

3.3.1 Cytoskelet rostlin

Mezi buňkami rostlin a živočichů existuje mnoho rozdílů. Jedním z nich je i mobilita buňky. Živočišné buňky se pohybují nezávisle a během embryogeneze zaujímají specifickou pozici. Naproti tomu rostlinné buňky zůstávají během embryogeneze na jednom místě a dotýkají se prostřednictvím buněčné stěny. Rostliny během vývoje a morfogeneze v podstatě kontrolují směr dělení buněk. Pozice buněk po dělení se tedy relativně nemění. Diferenciace závisí na buněčném autonomním programu a signálech přenášených mezi buňkami. Paralelně rostlinné buňky zvětšují svoji velikost a tvar. Buněčné dělení a expanze buněk je regulována rostlinnými mikrotubuly (Obr. 2) a s mikrotubuly asociovanými jadernými proteiny (Microtubule associated proteins, MAPs) (Hamada, 2014).

K zachování morfogeneze mají rostliny vyvinutý unikátní rostlinně-specifický mikrotubulární systém: kortikální mikrotubuly, preprofázový svazek, mitotické vřetenko a fragmoplast. Kortikální mikrotubuly regulují směr expanze buněk, zatímco preprofázový svazek, mitotické vřetenko a fragmoplast regulují buněčné dělení (Hamada, 2014).

Nukleace neboli růst mikrotubulů se odehrává v tzv. γ tubulin komplexech. Tyto komplexy jsou u rostlin rozptýleny po celé buňce, kdežto u živočichů jsou soustředěny do tzv. mikrotubul-organizujících center, jako jsou například centrozomy (Hamada, 2014). Mikrotubuly sestávají z protofilament, které jsou tvořeny heterodimery α a β tubulinu (Obr. 2). 13 protofilament skládá jeden 25nm mikrotubul. Projevují se dynamickou nestabilitou, to znamená, že neustále dochází k jejich polymerizaci (růstu) a depolymerizaci (rozkladu). Konec mikrotubulů, jenž přirůstá rychleji, se nazývá plus konec, kdežto část mikrotubulů, jenž přirůstá pomaleji, se nazývá mínus konec (Dixit *et* Cyr, 2004). Polymerizace a depolymerizace se neustále opakuje, dokud mikrotubuly nenarazí na určitý cíl, kde jsou využity (Hamada, 2014).



Obr. 2: Struktura mikrotubulu (upraveno dle Kollman *et al.*, 2011).

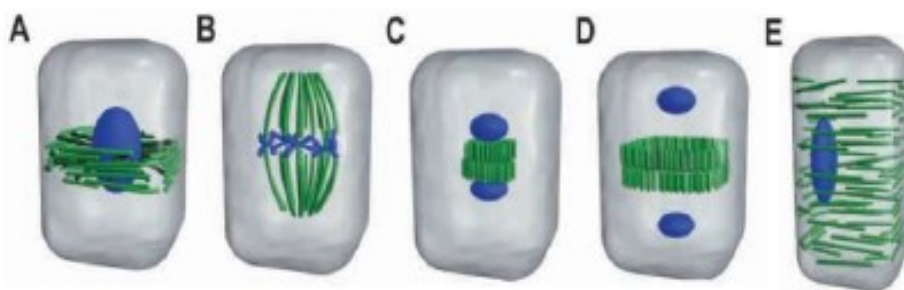
Preprofázový svazek (Obr. 3A) je klíčová vnitrobuněčná struktura určující místo rozdělení buňky (Pickett-Heaps *et* Northcote, 1966). Formuje se v G2 fázi buněčného cyklu jako široký svazek mikrotubulů a přetrvává až do profáze. Je klíčový pro správnou lokalizaci dělicího vřeténka a fragmoplastu (Rasmussen *et al.*, 2011; Van Damme, 2009).

I když rostliny, na rozdíl od živočichů, postrádají struktury analogické centrozomu, tvoří se v profázi buněčného dělení struktura zvaná mitotické vřeténko (Obr. 3B, 3C). Tato struktura vzniká v jaderné membráně obsahující prstencové struktury γ tubulinu (Dryková *et al.*, 2003). Organizace vřeténka závisí na kinetochorech - jako organizujících centrech. Mitotické vřeténko slouží k rozdělení duplikovaných chromozomů během metafáze

a anafáze. V případě rostlinného mitotického vřeténka nejsou přítomny astrální mikrotubuly. U rostlin je sestavování mitotického vřeténka regulováno TPX2 proteinem (Vos *et al.*, 2008).

Fragmoplast (Obr. 3D) je struktura, která je potřebná pro vznik buněčné stěny mezi dvěma dceřinými buňkami. Tvoří se na konci anafáze ze zbylých mikrotubulů mitotického vřeténka. Pomocí těchto mikrotubulů jsou do místa budoucí membrány a buněčné stěny dopravovány komponenty a vezikuly nezbytné pro její syntézu (Müller *et al.*, 2009).

V periferní cytoplazmě dospělé rostlinné buňky se nachází dynamické mikrotubuly, jenž jsou přilehlé k cytoplazmatické membráně. Tyto mikrotubuly se nazývají kortikální mikrotubuly (Obr. 3E). Jelikož ovlivňují osu prodlužování buňky a předurčují umístění roviny dělení buňky, jsou důležité pro správný vývoj rostliny (Hardham *et Gunning*, 1978).



Obr. 3: Mikrotubulové struktury v rostlinné buňce během buněčného cyklu (upraveno dle Wasteneys, 2002). **A)** preprofázový prstenec **B)** mitotické (metafázní) vřeténko **C)** mitotické vřeténko během anafáze **D)** fragmoplast **E)** kortikální mikrotubuly během interfáze.

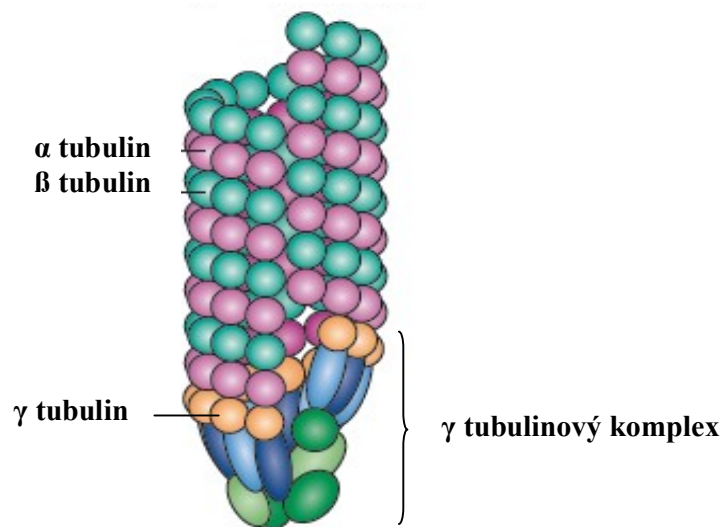
3.3.2 Proteiny asociované s mikrotubuly

Ačkoli mikrotubuly samy o sobě mají nukleační schopnost, jsou regulovány proteiny asociovanými s mikrotubuly (MAPs). Jaderné proteiny asociované s mikrotubuly představují skupinu proteinů, které jsou jakýmkoli způsobem lokalizovány s mikrotubuly, ať už pouze dočasně nebo po celou dobu své existence (Sedbrook, 2014).

γ Tubulin

γ Tubulin je potřebný pro nukleaci mikrotubulů v tzv. mikrotubul-organizujících centrech (Zheng *et al.*, 1995; Binarová *et al.*, 2006). Ve vytvořených prstencových strukturách γ tubulinu (Obr. 4) dochází k nukleaci mikrotubulů. Nukleace se v buňkách zúčastňují i různé MAPs, které využívají tubulin pro formaci mikrotubulů. Ovlivňováním nukleační aktivity umožňují MAPs buňce kontrolovat pohyb mikrotubulů.

γ Tubulin komplex je nejznámější MAP s nukleační aktivitou. Skládá se z 6 - 7 malých γ tubulinových komplexů a několika větších podjednotek (Kollman *et al.*, 2011).



Obr. 4: Schématická struktura mikrotubulů a mikrotubul-organizujícího centra (upraveno dle Kollman *et al.*, 2011).

Katanin

Katanin je oligomerní komplex s adenzinotrifosfatázovou (ATPáza) aktivitou, který slouží mikrotubulům k připevnění na požadované místo (McNally *et Vale*, 1993).

Kinezin

Kinezin patří do skupiny tzv. motorových proteinů, jenž se pohybují podél mikrotubulů za hydrolyzy adenosintrifosfátu (ATP). Každý kinezin má tzv. motorovou doménu, která přetváří uvolněnou energii z hydrolyzy ATP na mechanickou práci (Verhey *et* Hammond, 2009). Kinezin transportuje různé vezikuly nebo částice po buňce.

Konec vázající protein 1 (EB1)

Konec vázající protein 1 (End-binding protein 1, EB1) se váže na plus konec mikrotubulu (Vaughan, 2005). Plus konec mikrotubulu je místo mikrotubulové dynamiky, které interaguje s ostatními komponenty. EB1 protein reguluje nukleaci a elongaci mikrotubulů (Kumar *et* Wittmann, 2012).

Příklady dalších jaderných proteinů asociovaných s mikrotubuly jsou například: **Augmin komplex, Cytoplasmic linker associated protein 1 (CLASP1), MAP65, rodina Forminů, G-protein-coupled receptors-interacting proteins (GIPs)**, atd.

3.3.3 TPX2 protein

TPX2 (Targeting protein for *Xenopus* kinesin-like protein 2 - Xklp2) protein byl původně identifikován jako protein, který je nezbytný pro cílení Xklp2 proteinu (*Xenopus* kinesin-like protein 2) do místa dělicího vřeténka. Poprvé byl popsán ve vajíčkách *Xenopus laevis* (Wittmann *et al.*, 1998). Protein Xklp2 je protein podobný kinezinu. Je během interfáze lokalizován na centrozomech a na dělicím vřeténku během metafáze. Slouží jako motorový protein, který se váže na mínus konec mikrotubulů během mitózy (Wittmann *et al.*, 1998).

TPX2 protein je multifunkční MAP. Jedná se o hlavní regulátor formování mitotického vřeténka u obratlovců. Dle studií je TPX2 protein v případě *Xenopus laevis* převážně jaderný protein, jelikož se během interfáze nachází v jádře, avšak po fosforylaci je během mitózy transportován do pólů mitotického vřeténka a během anafáze se nachází v tzv. středovém tělísku (Wittmann *et al.*, 2000). Gen pro lidský TPX2 je přepisován v protein, jehož nejdelší varianta obsahuje 783 aminokyselin, avšak tento gen se vyznačuje nejméně 18 variantami alternativního *splicingu* (Thierry-Mieg *et* Thierry-Mieg, 2006). Homology tohoto proteinu jsou přítomny i u rostlin a živočichů.

Funkce TPX2 proteinu

Většina dosud známých funkcí TPX2 proteinu byla zjištěna právě u *Xenopus laevis* nebo u lidí. U *Xenopus* bylo prokázáno, že TPX2 protein je důležitý pro oddělení centrozomů a zachování tzv. bipolarity dělicího vřeténka (Boleti *et al.*, 1996; Wittmann *et al.*, 2000). Dále je TPX2 protein důležitý i pro chromatinem ovlivněnou nukleaci mikrotubulů, jež je kontrolována malými Ran guanozintrifosfatázami (Ran GTPáza) (Gruss *et al.*, 2001; Nachury *et al.*, 2001). TPX2 protein slouží i jako aktivátor Aurora A kinázy, jež hraje důležitou roli v regulaci mitózy (Eyers *et Maller*, 2003; Tsai *et al.*, 2003). Na významnost tohoto proteinu ukazuje i fakt, že myš, která byla deficiční na tento protein, vykazovala několik vývojových vad, jež byly tak vážné, že později nebyla schopná života (Aguirre-Portoles *et al.*, 2012).

Proteiny Ran

Proteiny Ran jsou GTPázy, které mají důležitou roli při formování dělicího vřeténka. Řadí se k nadrodině Ras GTPáz (Wennerberg *et al.*, 2005). Jedná se o hydrolytické enzymy, jež vážou a hydrolyzují guanozintrifosfát (GTP) na guanozindifosfát (GDP). Tyto malé GTPázy jsou nějakým podmětem aktivovány, poté dochází k hydrolyze GTP na GDP a následně je signál přenesen - například aktivováním dalšího proteinu. Ran GTPázy jsou regulovány Ran GTPázovým aktivačním proteinem 1 (Ran GTPase activation protein 1, RanGAP1), jež stimuluje hydrolyzu GTP na GDP, a guanin měnicím faktorem tzv. Regulátorem kondenzace chromozomů 1 (Regulator of chromosome condensation 1, RCC1), který naopak stimuluje výměnu GDP za GTP (Klebe *et al.*, 1995).

V případě *Xenopus laevis* způsobuje vysoká koncentrace malých Ran GTPáz ve stavu s navázaným GTP nukleaci mikrotubulů a následně formaci vřeténka (Kalab *et al.*, 1999; Carazo-Salas *et al.*, 2001).

V případě *Arabidopsis thaliana* existují 4 geny pro RanGTPázy - *AtRan 1*, *AtRan 2*, *AtRan 3*, *AtRan 4*. *AtRan 1*, *AtRan 2* a *AtRan 3* jsou z 95 % identické, zatímco *AtRan 4* je z velké části odlišný, a tudíž má zřejmě jinou funkci. *AtRan 1*, *AtRan 2* a *AtRan 3* jsou lokalizovány v jádře a v cytoplazmě a jejich exprese je nejvyšší v meristematických tkáních (Haizel *et al.*, 1997).

Aurora kinázy

Aurora kinázy jsou rodina serin/threonin kináz, jež jsou hlavními regulátory mitotické progresu a cytokineze, přesněji, účastní se segregace chromozomů a vzniku mitotického vřeténka. Aurora kinázy fosforylují různé regulační proteiny mitózy, a proto je jejich vysoká koncentrace často spojována se vznikem rakoviny (Carmena *et Earnshaw*, 2003).

U živočichů existují 3 druhy Aurora kináz: A, B a C, jež se liší lokalizací v buňce. Aurora A kináza, která je aktivována TPX2 proteinem, se nachází v centrozomech a podél mikrotubulů mitotického vřeténka, kde hraje hlavní roli při dozrávání centrozomů a organizaci vřeténka (Glover *et al.*, 1995). Interakcí Aurora A kinázy a TPX2 proteinu se určuje délka vřeténka prostřednictvím nukleace mikrotubulů (Bird *et Hyman*, 2008).

V případě *Arabidopsis* jsou přítomny 2 typy rodin Aurora kináz a to: alfa (Aurora 1 a 2) a beta (Aurora 3) (Demidov *et al.*, 2005; Kawabe *et al.*, 2005). Během interfáze jsou Aurora kinázy skupiny alfa lokalizovány v jádře. Po vstoupení buňky do mitózy tyto proteiny asociují s mikrotubuly dělicího vřeténka, podobně jako Aurora A kináza u savců. Aurora 3 kináza je lokalizována v průběhu interfáze v oblasti chromocenter, během mitózy lokalizuje na chromozomech a v oblasti centromer (Demidov *et al.*, 2005; Petrovská *et al.*, 2012). Bylo zjištěno, že v případě *Arabidopsis thaliana*, TPX2 protein aktivuje Aurora kinázu 1 *in vitro*, ale neaktivuje Aurora kinázu 3 (Tomašíková *et al.*, 2015).

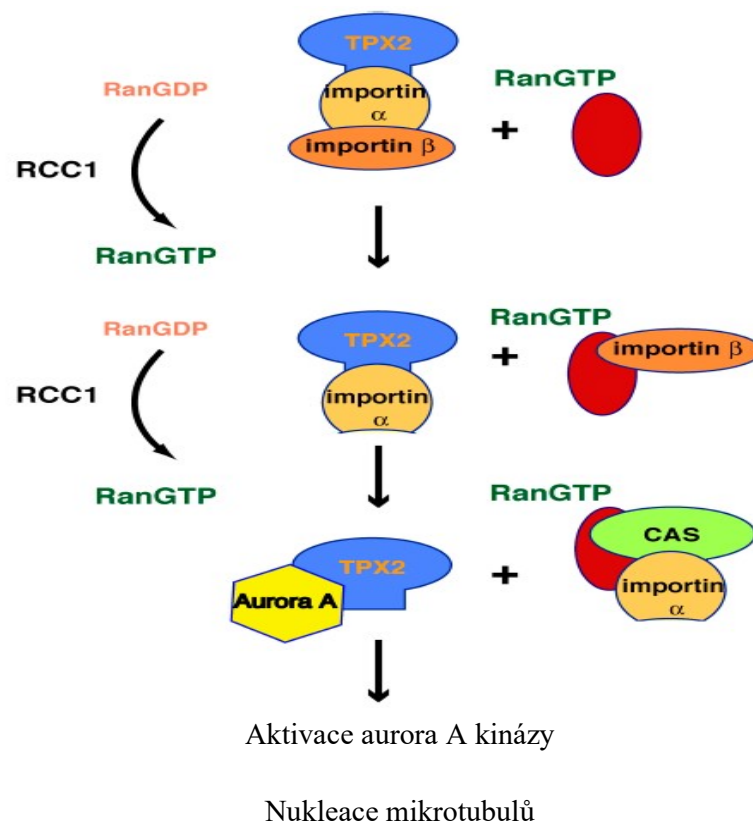
Mechanismus účinku TPX2 proteinu

Přechod buňky z interfáze do fáze mitózy nebo meiózy je doprovázen rozsáhlými změnami cytoskeletu buňky. Dochází k nukleaci nových mikrotubulů, které jsou organizovány do symetrické bipolární struktury vřeténka (Hyman *et Karsenti*, 1998; Andersen, 2000). Hlavním úkolem vřeténka je rovnoměrně rozdělit chromozomy do dvou vznikajících dceřiných buněk.

V interfázním jádře buňky obratlovců se TPX2 protein nachází ve vazbě s importinem α a importinem β , jež blokují jeho aktivitu (Gruss *et al.*, 2001; Wiese *et al.*, 2001). Dále pak je tento komplex v interakci s proteinem Ran. Tato formace zabraňuje TPX2 proteinu interakci s mikrotubuly v cytoplazmě, dokud se nerozpadne jaderná membrána (Kahana *et Cleveland*, 2001). Rozdílná koncentrace Ran GTPáz/GDPáz v cytoplazmě a v jádře je udržována díky jaderné membráně.

V případě rostlinného TPX2 je proces obdobný s tím rozdílem, že protein je transportován z nukleoplazmy do cytoplazmy ještě před rozpadem jaderné membrány, čímž se liší od živočišného TPX2 (Vos *et al.*, 2008).

U živočišných buněk jsou v počáteční fázi mitózy, kdy se rozpadá jaderná membrána, Ran GDP za pomoci RCC1 konvertovány do Ran GTP. TPX2 protein je ve vazbě s importinem α a β . Ran GTP se následně váže na importin β , který oddisociuje z importinu α a TPX2. Za působení dalších Ran GTP dojde k oddisociování také importinu α z TPX2 proteinu. TPX2 protein je tak připraven vázat a aktivovat Aurora A kinázu a tím spustit nukleaci mikrotubulů v kinetochorech a v okolí chromozomů (Obr. 5) (Gruss *et Vernos*, 2004). Importin-RanGTPázový komplex se váže s tzv. s CRISPR asociovaným proteinem (CRISPR-associated protein, CAS), který tento komplex exportuje do cytoplazmy. Aurora kináza A pak indukuje formaci bipolárního vřeténka fosforylací dalších proteinů (Tsai *et Zheng*, 2005).

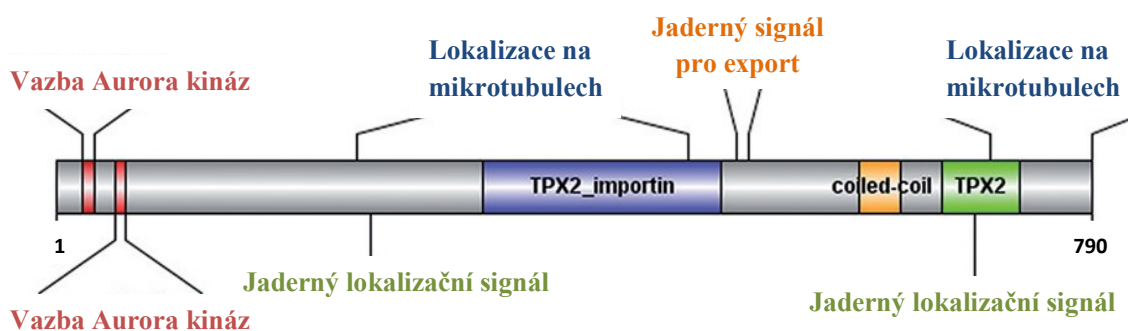


Obr. 5: Mechanismus účinku TPX2 proteinu (upraveno dle Gruss *et Vernos*, 2004).

TPX2 protein u *Arabidopsis thaliana*

Rostlinný homolog TPX2 proteinu byl popsán u *Arabidopsis thaliana* už v roce 2008. Sekvence genu pro TPX2 je lokalizována na 1. chromozomu *Arabidopsis thaliana*. TPX2 je jaderný protein o velikosti 82,4 kDa, jenž čítá 790 aminokyselin (Lamesch *et al.*, 2012).

TPX2 protein se skládá z TPX2/importinové domény, jenž slouží k vazbě importinů, a TPX2 domény, jenž je potřebná pro vazbu Xklp2 proteinu (Finn *et al.*, 2014). Dále se zde nachází dva jaderné lokalizační signály (Nuclear localization signal, NLS) a signál pro export (Nuclear export signal, NES), jenž jsou využity pro vstup do jádra buňky nebo naopak pro jeho výstup. Pak jsou zde přítomny dvě domény ovlivňující jeho lokalizaci na mikrotubulech (Vos *et al.*, 2008; Petrovská *et al.*, 2013) a v oblasti 588 - 619 aminokyselin krátké oblasti tzv. *coiled coil formation*, které ovlivňují oligomerizaci, pevnost a schopnost proteinu rozpoznávat jiné molekuly (Burkhard *et al.*, 2001). Nachází se zde i několik míst pro vazbu Aurora kináz (Obr. 6).



Obr. 6: Domény, interakční místa a vazebné motivy v aminokyselinové sekvenci TPX2 proteinu *Arabidopsis thaliana* (upraveno dle Petrovská *et al.*, 2013).

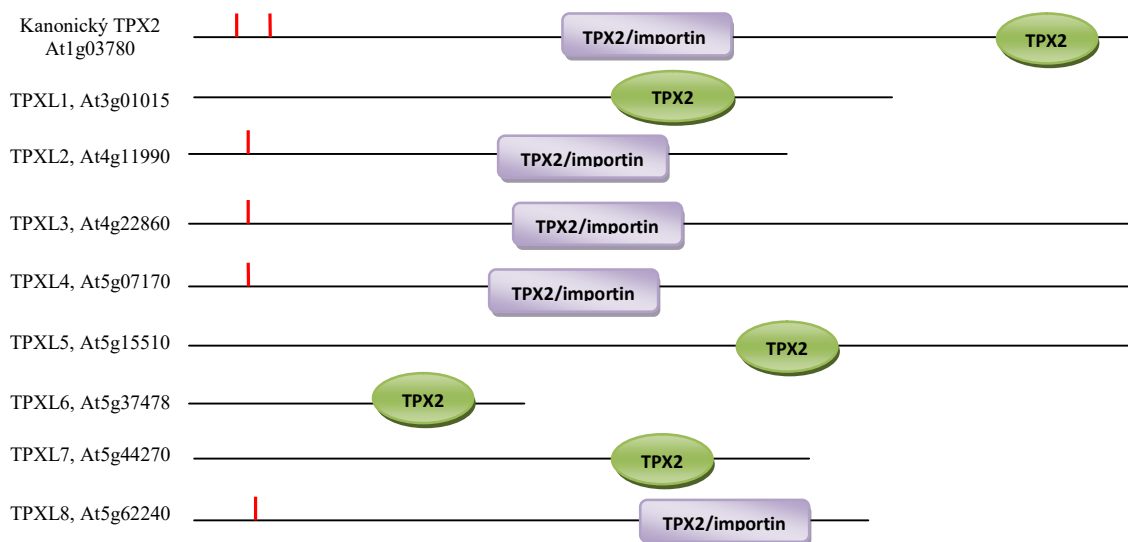
TPX2 protein izolovaný z *Arabidopsis thaliana* je vysoce homologní živočišnému proteinu TPX2. Také bylo zjištěno, že tento protein plně nahrazuje funkci inaktivovaného TPX2 v extraktu z vajíček *Xenopus laevis* (Vos *et al.*, 2008). V případě knockoutování genu pro TPX2 jsou homozygotní mutanti *Arabidopsis thaliana* letální, což ukazuje na významnost tohoto genu (Vos *et al.*, 2008). Dále bylo zjištěno, že inhibicí nebo absencí tohoto proteinu dochází u rostlin k zabránění formování vřeténka (Vos *et al.*, 2008).

Další zajímavostí je, že aplikací protilátek proti TPX2 došlo v buňkách Poděanky virginské (*Tradescantia virginiana*) ke zpomalení rozpadu jaderné membrány. Z tohoto

důvodu je TPX2 u rostlin spojován i s účinkem na rozpad jaderné membrány (Vos *et al.*, 2008).

TPX2-like proteiny u *Arabidopsis thaliana*

Většina dosud zjištěných funkcí TPX2 proteinu byla zkoumána u *Xenopus laevis* nebo u obratlovců. Homology tohoto genu se však vyskytují jak u rostlin, tak u živočichů. V případě *Arabidopsis thaliana* je zde přítomna celá rodina genů pro proteiny podobné kanonickému TPX2 - proteiny TPX2-like (TPXL) (Obr. 7). Tato rodina genů zahrnuje 9 členů, jenž byly identifikovány na základě sekvenční podobnosti s proteinem TPX2 *in silico* (Tomašíková *et al.*, 2015). Funkce těchto genů však nebyla doposud studována. Tato diplomová práce se zabývá třemi variantami a to: TPX2-like proteinem 1, TPX2-like proteinem 5 a TPX2-like proteinem 6.



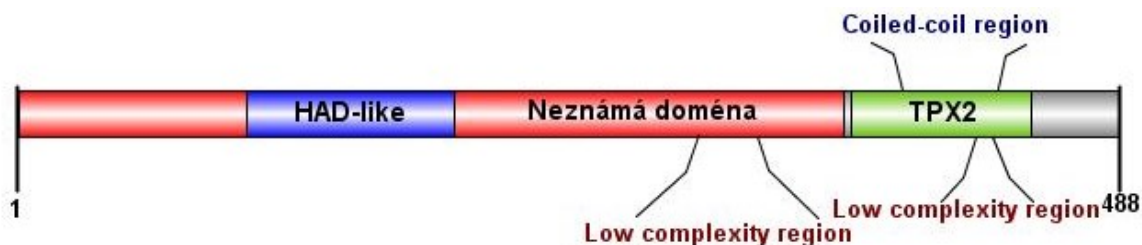
Obr. 7: Schématické znázornění genové rodiny TPX2 proteinu a jejich proteinových domén v *Arabidopsis thaliana* (upraveno dle Tomašíková, 2015). Červeně jsou vyznačena místa pro vazbu Aurora kináz. Fialově je znázorněna TPX2/importinová doména jenž slouží k vazbě importinů. Zeleně je znázorněna TPX2 doména, jenž je potřebná pro vazbu proteinu Xklp2.

3.3.4 TPX2-like protein 1

Prvním ze studovaných proteinů z TPX2 genové rodiny je protein s označením TPX2-like protein 1 (TPXL1). Gen pro TPXL1 (At3g01015) čítá 2507 pb. Následně vzniká protein o velikosti 5,6 kDa (Lamesch *et al.*, 2012).

Sekvence pro TPXL1 protein je lokalizována na chromozomu 3 *Arabidopsis thaliana* a to v oblasti 1653 - 4159 pb a čítá celkem 2507 pb. Gen zahrnuje 8 exonů a 7 intronů. Vzniklý TPXL1 protein sestává ze 488 aminokyselin (Lamesch *et al.*, 2012). Dle databází se předpokládá, že TPXL1 protein se nachází v jádře buňky (Lamesch *et al.*, 2012).

Gen pro TPXL1 obsahuje neznámou doménu v oblasti 1 - 370 aminokyselin podle databáze *superfam*, dále pak TPX2 C-koncovou doménu a to v oblasti 376 - 432 aminokyselin dle databáze *pfam* (Finn *et al.*, 2014). Dále dle jiného zdroje se zde v oblasti 133 - 198 aminokyselin vyskytuje další doména a to tzv. *haloacid dehalogenase-like hydrolases (HAD)-like domain*. Proteiny s touto doménou katalyzují nukleofilní substituce (Thierry-Mieg *et Thierry-Mieg*, 2006). Taktéž je zde zřejmě přítomen i *coiled coil region* a to v oblasti 390 - 424 aminokyselin. Dále se zde nachází 2 *low complexity regions* a to v oblasti 263 - 291 a 411 - 424 aminokyselin (Obr. 8) (Letunic *et al.*, 2015). Tyto oblasti jsou obvykle bohaté na jednu nebo několik aminokyselin. V závislosti na převaze určité aminokyseliny mají tyto oblasti vliv na funkci a lokalizaci proteinu (Radó-Trilla *et Albà*, 2012).



Obr. 8: Domény a motivy v aminokyselinové sekvenci TPX2-like proteinu 1 *Arabidopsis thaliana* (Obrázek byl vytvořen s použitím IBS databáze (Liu *et al.*, 2015)).

Funkce TPXL1 proteinu není zatím objasněna. Na základě elektronických anotací jsou mu přisuzovány funkce jako ostatním z rodiny proteinů TPX2 - tedy účast v mitotickém

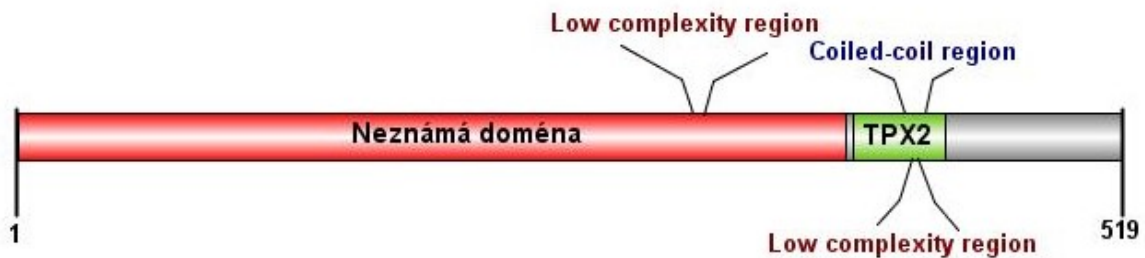
jaderném dělení, kde je asociován s mikrotubuly dělicího aparátu. Dále pak aktivace protein kináz a regulace organizace mitotického vřetenka (Mitchell *et al.*, 2015).

3.3.5 TPX2-like protein 5

Dalším ze studovaných proteinů z TPX2 genové rodiny je TPX2-like protein 5 (TPXL5). Gen pro TPXL5 (At5g15510) se vyznačuje 2 *splicing* variantami o velikosti 519 a 497 aminokyselin (Lamesch *et al.*, 2012). Tato práce se soustředí na delší variantu u rostliny *Arabidopsis thaliana*, tedy, jejíž následně vzniklý protein obsahuje 519 aminokyselin.

Sekvence genu TPXL5 je lokalizována na chromozomu 5 *Arabidopsis thaliana* a čítá celkem 2791 pb, skládá se z 16 exonů a 14 intronů. Vzniklý TPXL5 protein má molekulovou hmotnost přibližně 58,7 kDa (Lamesch *et al.*, 2012).

Na základě podobnosti s jinými sekvencemi bylo dle databází zjištěno, že gen pro TPXL5 obsahuje neznámou doménu v oblasti 1 - 380 aminokyselin (Lamesch *et al.*, 2012), dále pak TPX2 C-koncovou doménu a to v oblasti 386 - 442 (Mitchell *et al.*, 2015). C-koncová doména je přibližně 60 aminokyselin dlouhá a slouží k vazbě Xklp2 proteinu, stejně jako v případě TPX2 proteinu (Mitchell *et al.*, 2015). Další oblastí nacházející se v TPXL5 proteinu je *coiled-coil region* a to v oblasti 409 - 436 aminokyselin. V oblasti 285 - 298 a 422 - 435 se nachází tzv. *low complexity regions* (Obr. 9) (Letunic *et al.*, 2015).



Obr. 9: Domény a motivy v aminokyselinové sekvenci TPX2-like proteinu 5 *Arabidopsis thaliana* (Obrázek byl vytvořen pomocí IBS databáze (Liu *et al.*, 2015)).

Funkce TPXL5 proteinu není v současnosti objasněna. Na základě podobnosti domén TPXL5 proteinu s doménami TPX2 proteinu je tento protein označován jako nedílná součást mitotického jaderného dělení, přesněji součást mitotického vřetenka a mikrotubulů (Lamesch *et al.*, 2012). Mezi další možné funkce TPXL5 proteinu, jenž byly zjištěny

na základě koexprese s jinými geny, patří účast při formaci dělicí přepážky mezi dvěma nově vzniklými buňkami, dále pak role při replikaci DNA, umlčování genů, regulaci růstu rostliny a organizaci cytoskeletu (Heyndrickx *et* Vandepoele, 2012).

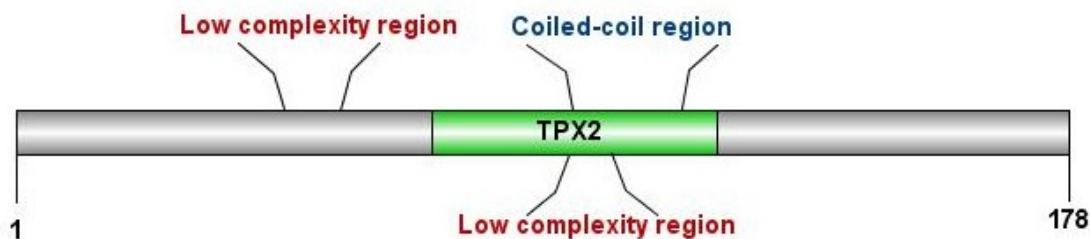
Expresi proteinu, dle databáze, ovlivňuje i působení hormonů. Po působení hormonů zeatinu, kyseliny indolyl-3-octové, kyseliny abscisové, methyl jasmonátu, kyseliny gibberelové nebo brassinolidů byla zjištěna zvýšená exprese TPXL5 proteinu v 7-denních výhoncích rostlin (Patel *et al.*, 2012).

3.3.6 TPX2-like protein 6

Třetím ze studovaných proteinů z genové rodiny pro TPX2 protein je TPX2-like protein 6 (TPXL6). TPXL6 protein (At5g37478) čítá 178 aminokyselin. Expresi genu pro TPXL6 protein byla zaznamenána pouze v malé míře (Thierry-Mieg *et* Thierry-Mieg, 2006).

Sekvence pro TPXL6 protein je lokalizována na chromozomu 5 *Arabidopsis thaliana* (Lamesch *et al.*, 2012) a čítá celkem 2 430 pb (Krishnakumar *et al.*, 2014). Skládá se ze 7 exonů a 3 intronů (Thierry-Mieg *et* Thierry-Mieg, 2006). Vzniklý protein TPXL6 má molekulovou hmotnost přibližně 20,4 kDa (Lamesch *et al.*, 2012).

Gen pro TPXL6 obsahuje dle databáze *pfam* v oblasti 72 - 128 aminokyselin TPX2 C-koncovou doménu (Bateman *et al.*, 2015). Dále obsahuje v oblasti 47 - 62 a 95 - 107 aminokyselin *low complexity regions* a v oblasti 95 - 122 aminokyselin *coiled-coil region* (Obr. 10) (Letunic *et al.*, 2015).



Obr. 10: Domény a motivy v aminokyselinové sekvenci TPX2-like proteinu 6 *Arabidopsis thaliana* (Obrázek byl vytvořen s použitím IBS databáze (Liu *et al.*, 2015)).

Funkce TPXL6 proteinu, podobně jako u ostatních příslušníků rodiny TPX2 proteinů, zatím nejsou prozkoumány. Avšak dle softwarové databáze *InterPro* je tomuto proteinu přisuzována účast v biologických procesech jako je mitotické dělení jádra, kde je lokalizován s mikrotubuly, přesněji v mitotickém vřeténku (Lamesch *et al.*, 2012). Mezi další předpokládané funkce TPXL6 proteinu patří regulace organizace mitotického vřeténka a aktivace protein kináz (Bolser *et al.*, 2016).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Laboratorní přístroje a pomůcky

- Analytické váhy (Sartorius)
- Centrifuga Biofuge 13 (Heraeus)
- Centrifuga Jouan BR4I (Trigon-plus)
- Digitální váha Scout SC 4 010 (Ohaus)
- Elektroforetická komora Easycast B1A (Thermo Scientific)
- Fytotron Weiss Gallenkamp (Fitotron)
- Laboratorní digestoř 1800 (Merci)
- Laminární box (Gelaire)
- Laminární box Biohazard thermo Scientific MSC12 (Trigon-plus)
- Magnetická míchačka AREX Digital (P-Lab a.s)
- Mikrozkuřavky 1,5 ml (Eppendorf)
- Mikrozkuřavky pro PCR 0,6 ml (Eppendorf)
- Minicentrifuga 5 415D (Eppendorf)
- Orbitální třepačka IKA-VIBRA_VXR (Janke &Kunkel)
- Orbitální třepačka VKS-75 control (Bühler)
- pH metr InoLAB (WTW)
- Spektrofotometr Ultrospec 10 (Amersham Biosciences)
- Termocyklér T-gradient (Biometra)
- Termostat 200 (Mettler)
- Thermo Shaker (VWR)
- Transluminátor EA-40 UV (Ultra.Lum)
- Vodní lázeň TW8 (Julabo)
- Vortex mixer (VWR)
- Zdroj elektrického proudu Power Pack P25 (Biometra)

4.2 Biologický materiál

4.2.1 Bakterie

Pracovalo se s bakteriemi *Escherichia coli*, kmen Top10 (Invitrogen). Tyto bakterie byly kultivovány v Luria-Bertani (LB) médiu [1% (w/v) pepton; 0,5% (w/v) kvasinkový autolyzát; 1,5% (w/v) NaCl; 1,5% (w/v) agar; pH 7,0] s přidavkem selekčního antibiotika podle typu vektoru, kterým byly bakterie transformovány (50 µg/ml kanamycin nebo 100 µg/ml spectinomycin). Kultura bakterií *Escherichia coli* byla inkubována při teplotě 37 °C na orbitální třepačce (180 rpm) nebo v termostatu přes noc.

Dále se pracovalo s chemicky kompetentními bakteriemi *Agrobacterium tumefaciens*, kmen GV3101, obsahující selekční gen pro rezistenci na antibiotikum rifampicin a gentamicin. Tyto bakterie byly kultivovány v *Yeast Extract Broth* (YEB) médiu [0,05% (w/v) MgSO₄·7H₂O; 0,5% (w/v) hovězí extrakt; 0,5% (w/v) pepton; 0,5% (w/v) sacharóza; 0,1% (w/v) kvasinkový autolyzát; 1,5% (w/v) agar; pH 7,2] s antibiotiky rifampicinem (25 µg/ml), gentamicinem (50 µg/ml) a třetím antibiotikem podle typu vneseného vektoru (50 µg/ml kanamycin nebo 100 µg/ml spectinomycin). Kultury bakterií *Agrobacterium tumefaciens* byly kultivovány ve 28 °C na orbitální třepačce (225 rpm) přes noc nebo na tuhém médiu v termostatu 3 dny.

4.2.2 Rostlinný materiál

Při práci byly použity rostliny *Arabidopsis thaliana* ekotyp *Landsberg erecta* (LER) (Arabidopsis Biological Resource Center). Byla použita také buněčná suspenzní kultura odvozená od kalusů rostliny *Arabidopsis thaliana* LER.

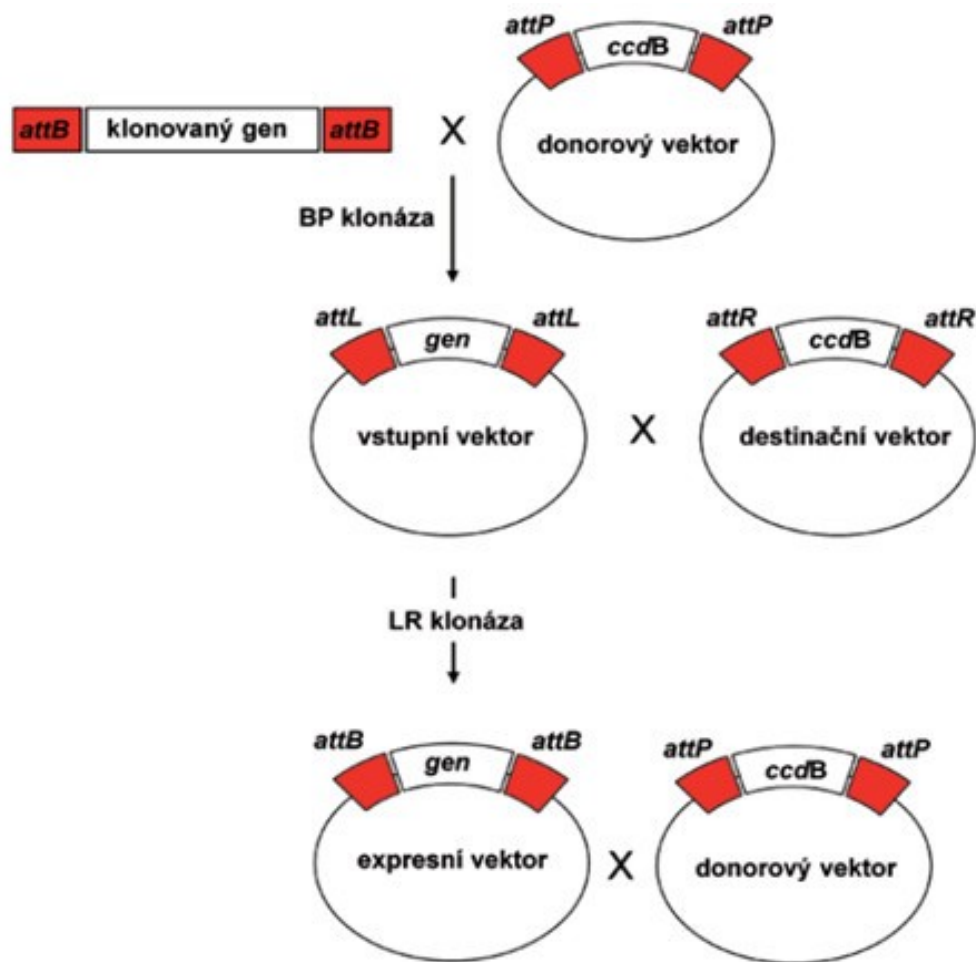
4.3 GATEWAY[®] klonování

GATEWAY[®] (Invitrogen) technologie je univerzální klonovací metoda, která je založena na místně specifickém rekombinačním systému bakteriofága Lambda. Jedná se o rychlou a vysoce účinnou metodu pro přesun požadované sekvence DNA do různých vektorových systémů pro studium funkční analýzy a exprese proteinu.

Principem této metody je syntéza požadované sekvence s rekombinačními tzv. *att* místy a její následné klonování přes vstupní (entry) klon do destinačního expresního vektoru. Rekombinace probíhá mezi specifickými *att* místy přítomnými v interagujících DNA sekvencích. Na tyto místa se vážou příslušné rekombinační proteiny. Existují 4 druhy *att* míst: *attB*, *attP*, *attL* a *attR*. Specifita rekombinace je dána unikátní 7 pb dlouhou klíčovou sekvencí, která umožní rekombinaci mezi *att* místy.

GATEWAY klonování zahrnuje 2 rekombinační reakce: BP a LR:

- BP reakce: Jedná se o rekombinaci substrátu s *attB* místy (např. PCR produkt) s donorovým vektorem s *attP* místy za vzniku vstupního klonu s *attL* místy a vedlejšího produktu s *attR* místy. Tato reakce je katalyzována enzymy Integrázou a Integrujícím hostujícím faktorem (IHF) (Obr. 11).
- LR reakce: Jedná se o rekombinaci vstupního klonu s *attL* místy s destinačním vektorem s *attR* místy za vzniku expresního klonu s *attB* místy a vedlejšího produktu s *attP* místy. Tato reakce je katalyzována enzymy Integrázou, proteinem IHF a Excisionázou (Obr. 11).



Obr. 11: Schématické znázornění principu klonovacího systému GATEWAY (upraveno dle Růčková *et al.*, 2014).

4.3.1 Navržení primerů s *attB* místy

Jak již bylo zmíněno výše, rekombinace probíhá mezi specifickými *att* místy přítomnými v interagujících DNA sekvencích. Pro vytvoření vstupního klonu obsahující požadovaný gen existuje několik možností. V mém případě byl jako substrát pro reakci BP zvolen PCR produkt. Místa *attB* byly do PCR produktu inkorporovány pomocí primerů.

Primery pro PCR reakci byly navrženy na základě kódující nukleotidové sekvence proteinů TPXL1, TPXL5 a TPXL6 *Arabidopsis thaliana* a ověřeny pomocí softwaru *OligoAnalyzer* (Integrated DNA technologies). Sekvence primerů byly dále upraveny dle požadavků GATEWAY® technologie (Obr. 12).

***attB1* Vedoucí (Forward) primer**

attB1 místo

5' - GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TNN + 18-25 genově specifických nukleotidů - 3'

***attB2* Zpětný (Reverse) primer**

attB2 místo

5' - GGGG AC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTN + 18-25 genově specifických nukleotidů - 3'

Obr. 12: Část sekvence primerů použitých pro GATEWAY klonování (upraveno dle Invitrogen). Forward primer (F) musí na 5' konci obsahovat 4 guaniny následované *attB1* místem o velikosti 25 pb a dále musí obsahovat nejméně 18 - 25 pb templátu. Pro zachování správného čtecího rámce pro N-terminální fúzi je nutné k *attB1* místu přidat ještě 2 libovolné nukleotidy (N), avšak v takové kombinaci, aby nedošlo ke vzniku stop kodonu. Reverse primer (R) musí vypadat obdobně, avšak *attB1* místo je nahrazeno *attB2* místem. Pro fúzi produktu PCR s C-koncovým přívěskem musí primer obsahovat jeden přídatný nukleotid pro zachování správného čtecího rámce.

4.3.2 Příprava *attB* PCR produktů

attB PCR produkty byly získány pomocí polymerázové řetězové reakce (Polymerase Chain Reaction, PCR), jejíž součástí byla *Pfx* DNA polymeráza, která se vyznačuje opravňovanou 3' - 5' exonukleázovou aktivitou (proof-reading aktivitou). Součástí PCR mixu byl 1x *Pfx* amplifikační pufr; směs 0,3 mmol/l dNTP; 50 mmol/l MgSO₄; 0,2 μmol/l *attB* PCR primery; 10 pg - 200 ng templátová DNA; Platinum[®] *Pfx* DNA polymeráza (1 U) a sterilní redistilovaná voda. Ke zvýšení účinnosti amplifikace byl použit 10x PCRx *Enhancer Solution* (Invitrogen).

Reakce zahrnovala 35 cyklů: denaturaci při 94 °C 15 s, hybridizaci při 55 °C 30 s a syntézu při 68 °C 1 min. Vzhledem k proof-readingové aktivitě použité polymerázy byl poslední krok syntézy prodloužen na 15 min.

Následně byly produkty amplifikace PCR separovány gelovou elektroforézou. Gel byl připraven z 1% (w/v) agarózy; 1x TAE pufru [40 mmol/l Tris-acetát; 2 mmol/l EDTA; pH 8,5] a ethidium bromidu (0,5 μg/ml). Elektroforéza probíhala při laboratorní teplotě pod napětím max. 80 V/cm. Pro stanovení velikosti fragmentu byl použit marker *GeneRulerTM 1 kb Plus DNA Ladder* (Fermentas) nebo marker *GeneRulerTM Low Range DNA*

Ladder (Fermentas). Fragmenty byly zviditelněny pomocí UV světla o vlnové délce 360 nm a vzhled gelu byl zdokumentován.

4.3.3 Izolace a purifikace *attB* PCR produktů z gelu

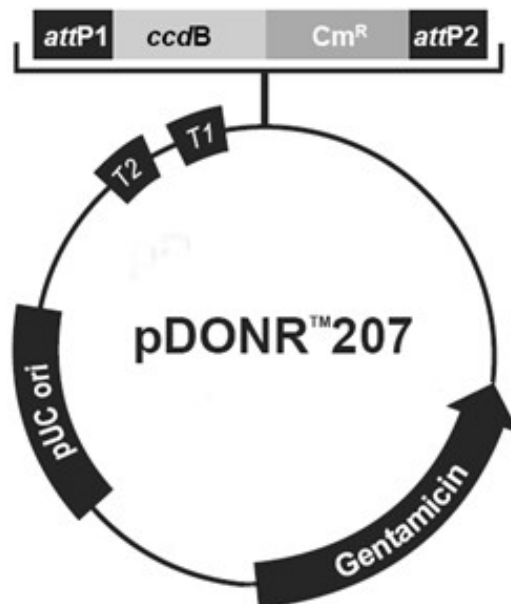
K izolaci a purifikaci *attB* PCR produktů byl použit *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) a postupovalo se dle návodu od výrobce.

Fragmenty byly sterilním skalpelem vyřezány z gelu, zváženy a byl přidán tlumivý QG pufr (300 µl/100 mg). Směs byla inkubována 10 min při 50 °C do úplného rozpuštění gelu. Směs byla nanesena na kolonu *QIAquick spin* a centrifugována při laboratorní teplotě 1 min/13 000 rpm. Kolona byla promyta v QG pufru a v PE pufru. Fragmenty byly z membrány eluovány centrifugací v EB pufru [10 mmol/l Tris-HCl; pH 8,5].

4.3.4 BP reakce

BP reakce byla provedena dle návodu od výrobce (Invitrogen) s použitím *GATEWAY[®] BP clonase[™] II Enzyme Mix*.

BP reakce spočívá v rekombinaci substrátu s *attB* místy (PCR produkt) s donorovým vektorem s *attP* místy za vzniku vstupního klonu s *attL* místy a vedlejšího produktu s *attR* místy. Byl použit donorový vektor pDONR207 (Invitrogen) (Obr. 13), jenž obsahuje mimo jiné *attP* místa. Velikost tohoto donorového vektoru je 5 585 pb. Vektor obsahuje gen rezistence vůči gentamicinu a to v oblasti 3 528 - 4 061 pb. Dále je zde přítomen gen *ccdB*, jenž slouží pro pozitivní selekci bakterií. Po BP reakci tento gen je přítomen pouze u nezrekombinovaných plazmidů a u vedlejšího produktu reakce, obsahujícího *attR* místa. Exprese genu *ccdB* je pro bakterie toxická. Gen *ccdB* se nachází v oblasti 959 - 1 264 pb.



Obr. 13: Mapa vektoru pDONR207 (upraveno dle Invitrogen). **pUC ori** - replikační počátek; **T2, T1** - transkripční terminační sekvence; **attP1, attP2** - rekombinační místa; **ccdB** - gen pro pozitivní selekci bakterií; **Cm^R** - gen rezistence na chloramphenicol; **Gentamicin** - gen rezistence na gentamicin.

Reakční mix BP reakce obsahoval *attB* PCR produkty (≥ 10 ng/ μ l), donorový vektor pDONR207 (150 ng/ μ l), TE pufr [10 mmol/l Tris-HCl; 1 mmol/l EDTA; pH 8,0] a 1x *BP Clonase™ II enzym mix* (Invitrogen). Reakce probíhala přes noc při pokojové teplotě a poté byla zastavena přidáním proteinázy K (2 μ g/ μ l) po dobu 10 min při 37 °C.

4.3.5 Transformace chemicky kompetentních bakterií *Escherichia coli* Top10

Chemicky kompetentní buňky *E. coli* Top10 o objemu 100 μ l byly smíchány s 10 μ l BP reakčního mixu. Po 30 minutách inkubace na ledu byly buňky vystaveny teplotnímu šoku 42 °C po dobu 45 s a ihned přemístěny na led. Následně bylo ke směsi přidáno LB médium a následovala kultivace 1 hodinu při 37 °C. Bakteriální suspenze byla vyseta na plotny s pevným LB médiem a selekčním antibiotikem (gentamicin). Kultivace ploten probíhala při 37 °C přes noc.

Bakterie, které narostly na miskách, byly poté inokulovány do 5 ml tekutého LB média s příslušným antibiotikem a kultivovány přes noc na třepačce ve 37 °C při 220 rpm. Následující den byla v narostlých koloniích ověřena účinnost BP reakce a následně

transformace bakterií pomocí PCR za použití specifických primerů *attL1* (5' - TCGCGTTAACGCTAGCATGGATCTC - 3') a *attL2* (5' - GTAACATCAGAGATTTT GAGACAC - 3').

4.3.6 Izolace BP konstruktů

Z ověřených pozitivních kolonií *E. coli* byla provedena izolace plazmidové DNA s použitím kitu *QIAprepSpin Miniprep Kit* (Qiagen) dle instrukcí výrobce.

Získaný pelet bakteriálních buněk z noční kultury byl resuspendován v P1 pufru. Následně byl přidán lyzační P2 pufr a neutralizační N3 pufr a vše bylo promícháno. Supernatant byl nanesen na QIAprep spin kolonu. Kolona byla centrifugována 10 min při 13 000 rpm a následně byla promyta PE pufrem. K eluci plazmidové DNA z kolony došlo za použití EB pufru [10 mmol/l Tris-HCl; pH 8,5]. Čistota a koncentrace DNA byla změřena spektrofotometrem NanoDrop™ 1 000 (Spectrophotometer). Čtecí rámec BP-konstruktů byl ověřen sekvenováním za použití specifických *attL* primerů.

4.3.7 LR reakce

Při LR reakci dochází k rekombinaci mezi vstupním klonem s *attL* místy a destinačním vektorem s *attR* místy. LR reakce byla provedena dle návodu od výrobce (Invitrogen) s použitím *Gateway® LR Clonase™ Plus Enzyme Mix*. V práci byly použity tyto typy destinačních vektorů: pB7RWG2,0; pB7WGR2,0; pK7WGF2,0 a pMDC43 (Tab. 1).

Reakční mix zahrnující BP-konstrukt (50 - 150 ng), destinační vektor (150 ng/μl; dle Tab. 1), TE pufr [10 mmol/l Tris-HCl; 1 mmol/l EDTA; pH 8,0] a 1x *LR Clonase™ II Enzyme Mix* byl vortexován, krátce centrifugován a inkubován přes noc ve 25 °C. Reakce byla zastavena přidáním proteinázy K (2 μg/μl) a následnou inkubací při 37 °C 10 min.

Po LR reakci byla opět provedena transformace chemicky kompetentních bakterií *E. coli* a úspěšnost LR reakce a transformace byla podobně jako u BP reakce ověřena metodou PCR za použití specifických primerů bez *attB* míst.

Tab. 1: Destinační vektory použité v diplomové práci.

Název	Promotor	Popis	Rezistence		Zdroj
			Bakterie	Rostliny	
pB7RWG2,0	35S	C-term RFP	Spectinomycin	Phosphinotricin	VIB Ghent
pB7WGR2,0	35S	N-term RFP	Spectinomycin	Phosphinotricin	VIB Ghent
pK7WGF2,0	35S	N-term GFP	Spectinomycin	Kanamycin	VIB Ghent
pMDC43	2x 35S	C-term GFP	Kanamycin	Hygromycin	ABRC

4.4 Transformace bakterií *Agrobacterium tumefaciens*

Transformace bakterií vyizolovaným produktem LR reakce byla provedena pomocí *Freeze-thaw* metody, kdy ke kompetentním buňkám *A. tumefaciens* kmen GV3101 byl přidán 1 µg plazmidu. Směs byla inkubována 5 min při 37 °C. Poté byl přidán 1 ml YEB média a směs byla opět inkubována 4 hodiny při 28 °C za mírného třepání. Suspenze byla centrifugována 30 s při 13 000 rpm a pelet byl resuspendován ve 100 µl YEB média. Bakterie byly vysety na misky s YEB médiem a příslušnými antibiotiky v závislosti na typu vektoru v plazmidu. Misky byly inkubovány 3 dny při 28 °C.

Bakterie, které narostly na miskách, byly poté inokulovány do 5 ml tekutého YEB média s příslušnými antibiotiky a kultivovány přes noc na třepačce ve 28 °C při 220 rpm.

Transformace bakterií *A. tumefaciens* plazmidem byla ověřena pomocí amplifikace PCR obdobně jako v případě transformace bakterií *E. coli*. Byly použity specifické primery bez *attB* míst.

4.5 Transformace buněčných suspenzí *Arabidopsis thaliana*

Na transformaci buněčných suspenzí byly použity čerstvě narostlé kolonie bakterií *A. tumefaciens* s příslušným binárním vektorem. Do dvoudenní buněčné suspenze *Arabidopsis thaliana* LER byl přidán Acetosyringone (do výsledné koncentrace 100 µmol/l) a několik narostlých kolonií *A. tumefaciens*. Takto připravená buněčná suspenze byla kultivována ve tmě při 110 rpm a teplotě 24 °C. Úspěšnost transformace byla kontrolována na fluorescenčním mikroskopu CellR (Olympus) a dle potřeby promývána po 2 - 3 dnech kultivačním médiem. Při detekci transformovaných buněk byl postupně do suspenzí přidáván Cefotaxim sodný (Claforan) a příslušné selekční antibiotika dle typu vneseného vektoru.

4.6 Imunofluorescenční barvení suspenzních kultur

Imunofluorescenční barvení buněk *Arabidopsis thaliana* bylo provedeno dle upraveného protokolu Binarová *et al.* (1993).

Po hodinové fixáži v paraformaldehydu [3,7% (w/v) v MTSB (Microtubule-stabilizing buffer, mikrotubuly stabilizující pufr)], byly buňky dvakrát promyty v MTSB pufru [0,1 mol/l Pipes; pH 6,8; 2 mmol/l EGTA; 2 mmol/l MgSO₄; 2 mmol/l DTT; 50 mmol/l NaCl; 10 % (w/v) glycerol] a inkubovány s enzymovou směsí (Binarová *et al.*, 1993). Po nanesení suspenze na poly-L-lysinová skla byly buňky inkubovány v metanolu 10 min při -20 °C. Po promytí v PBS pufru [10 mmol/l Na₂HPO₄; 150 mmol/l NaCl; 2 mmol/l KCl; 2 mmol/l KH₂PO₄; pH 7,4] byly buňky blokovány 10 min v 3% (w/v) BSA v PBS a inkubovány s primární protilátkou při 4 °C přes noc. Po vymytí primární protilátky PBS puftrem byly buňky inkubovány se sekundární protilátkou 1 hodinu. Po odmytí sekundární protilátky byl na podložní skla aplikován VectaShield s DAPI (4',6-diamidino-2-fenylyndol) a skla byla uchovávána v ledničce ve tmě.

Jako primární protilátky byly použity *Anti GFP Rabbit* (Roche) nebo *Anti GFP Mouse* (Roche) proti GFP a *Anti RFP Rat* (Roche) proti RFP. Jako sekundární protilátky byly použity protilátky *Alexa Fluor 488 Goat Anti-Rabbit* (Invitrogen), *Alexa Fluor 488 Goat Anti-Mouse* (Invitrogen) a *Alexa Fluor 546 Goat Anti-Rat* (Invitrogen). Fluorescenční analýza byla provedena na fluorescenčním mikroskopu CellR (Olympus).

4.7 Transformace rostlin *Arabidopsis thaliana*

Rostliny *A. thaliana* byly transformovány dle upraveného protokolu *Floral Dip* (Clough *et Bent*, 1998) následovně:

Do 100 ml čerstvého YEB média s antibiotiky byl přidán 1 ml noční bakteriální suspenze. Směs byla inkubována přes noc při 28 °C při 225 rpm. Poté byly narostlé bakterie centrifugovány 20 min při 4 500 rpm při teplotě 4 °C. Pelet bakterií byl rosuspendován v 5% sacharóze tak, aby hodnota OD při 600 nm byla 0,8. Dále byl přidán Acetosyringone do výsledné koncentrace 200 µmol/l a Silwet L-77 do výsledné koncentrace 0,05 %. Poupata *Arabidopsis thaliana* byla ponořena do připravené suspenze na 2 - 3 s a zakryta do dalšího dne. Následně byly rostliny kultivovány za standardních podmínek ve skleníku.

Získaná semena transformovaných rostlin *A. thaliana* byla povrchově sterilizována v 1 ml 70% etanolu a 0,5 µl 0,05% Tritonu X-100 po dobu 10 min na vortexu. Následně byla semena promyta 5 min v 1 ml 100% etanolu. Poté byla semena vysušena ve sterilním boxu a vyseta na Petriho misky s 1/2 MS médiem s příslušnými antibiotiky. Podmínky pro růst semen byly stanoveny dle protokolu Harrison *et al.* (2006) a to: 2 dny při teplotě 4 °C ve tmě, dále 6 hodin při teplotě 24 °C ve světle, 2 dny ve 24 °C ve tmě a dva dny při světle.

Zhruba po 14 dnech růstu byl signál ve vyselektované rostlině kontrolován pomocí fluorescenčního mikroskopu.

5 VÝSLEDKY

5.1 GATEWAY klonování

5.1.1 Návrh sekvence primerů

Primery pro GATEWAY[®] klonování byly navrženy na základě sekvence studovaných proteinů TPXL1, TPXL5 a TPXL6 tak, aby splňovaly standardní požadavky na primery a požadavky GATEWAY[®] technologie.

Pro vizualizaci exprimovaného proteinu v rostlinných buňkách byly připraveny GFP a RFP fúzní varianty. Fúze byla provedena na N- i C-konci proteinu (Obr. 14).

TPXL1

Forward primer (F1) - N- i C-koncová fúze:

attB1 místo start kodon
5' - GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TTC **ATG** GAG TCG ACG AAT TTG AAG - 3'

Reverse primer (R1) - N-koncová fúze:

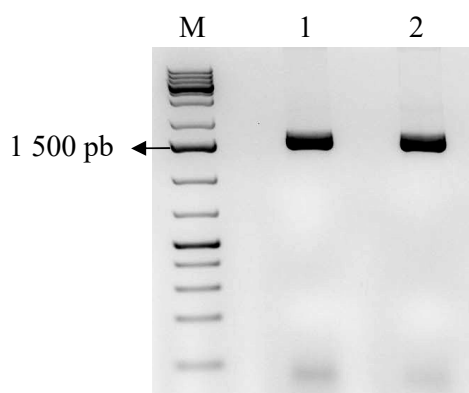
attB2 místo stop kodon
5' - GGGG AC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC **TTA** GAG GTC TTG TTG GTA TAA GAG G - 3'

Reverse primer (R2) - C-koncová fúze:

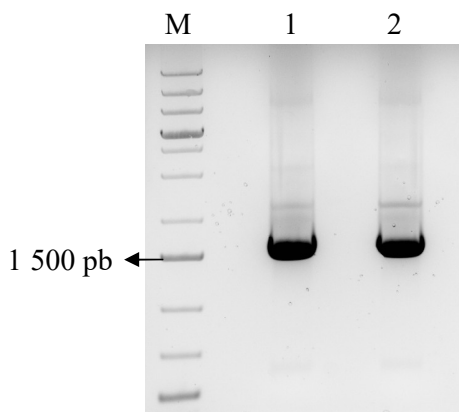
attB2 místo
5' - GGGG AC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC GAG GTC TTG TTG GTA TAA GAG G - 3'

5.1.2 Příprava *attB* PCR produktů

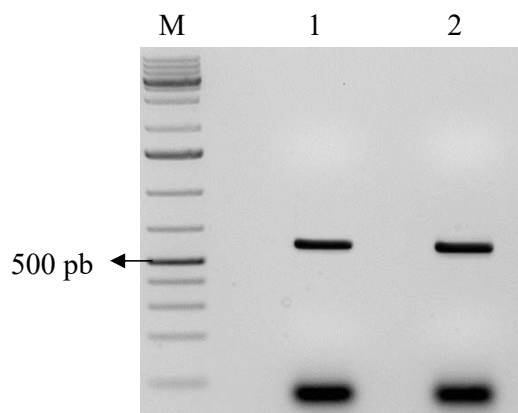
Produkty TPXL1*attB*, TPXL5*attB* a TPXL6*attB* byly připraveny polymerázovou řetězovou reakcí na cDNA *A. thaliana*. Pro *attB* PCR produkty byly vždy použity primery v kombinaci F1 + R1 pro N-terminální fúzi a F1 + R2 pro C-terminální fúzi příslušného genu. V případě TPXL1*attB*-C a TPXL1*attB*-N měl získaný produkt velikost 1 467 pb + *attB* místa (25 pb + 25 pb) (Obr. 15), v případě TPXL5*attB*-C a TPXL5*attB*-N 1 494 pb + *attB* místa (Obr. 16) a v případě TPXL6*attB*-C a TPXL6*attB*-N měl získaný produkt velikost 537 pb + *attB* místa (Obr. 17). Získané *attB* PCR produkty byly následně separovány pomocí 1% agarózové gelové elektroforézy.



Obr. 15: Elektroforetogram TPXL1*attB* PCR produktů separovaných v 1% agarózovém gelu. M - standard molekulové hmotnosti (GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder, ready-to-use; Fermentas); 1 - TPXL1*attB*-N (1 467 pb + *attB* místa); 2 - TPXL1*attB*-C (1 467 pb + *attB* místa).



Obr. 16: Elektroforetogram TPXL5*attB* PCR produktů separovaných v 1% agarózovém gelu. M - standard molekulové hmotnosti (GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder, ready-to-use; Fermentas); 1 - TPXL5*attB*-N (1 494 pb + *attB* místa); 2 - TPXL5*attB*-C (1 494 pb + *attB* místa).



Obr. 17: Elektroforetogram TPXL6attB PCR produktů separovaných v 1% agarózovém gelu. M - standard molekulové hmotnosti (GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder, ready-to-use; Fermentas); 1 - TPXL6attB-N (537 pb + attB místa); 2 - TPXL6attB-C (537 pb + attB místa).

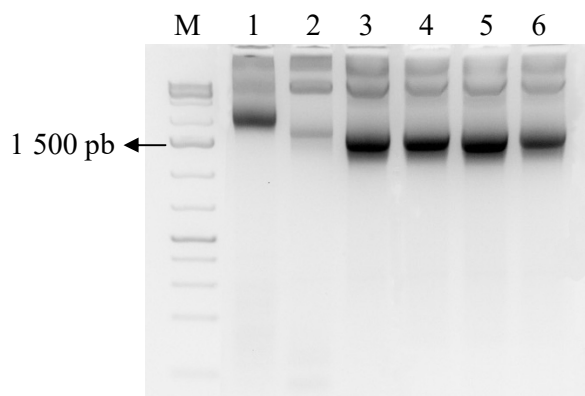
5.1.3 BP reakce

Po separaci produktů PCR v předchozím kroku následovalo vyřezání proužků (bandů) z gelu, jejich izolace a purifikace.

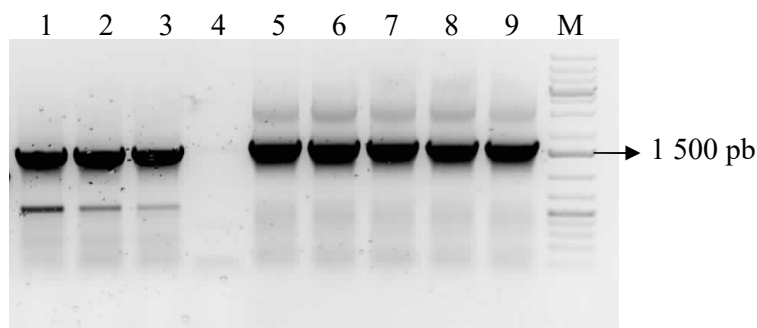
Při BP reakci došlo k rekombinaci mezi attB PCR produktem (TPXL1attB PCR; TPXL5attB PCR a TPXL6attB PCR) a donorovým vektorem pDONR207 za vzniku vstupního klonu s attL místy (TPXL1attL; TPXL5attL a TPXL6attL).

Pro TPXL1 protein byly připraveny konstrukty pDONR207::TPXL1-F1+R1-N (pro N-koncovou fúzi) a pDONR207::TPXL1-F1+R2-C (pro C-koncovou fúzi). Obdobně pro TPXL5 protein byly připraveny konstrukty pDONR207::TPXL5-F1+R1-N a pDONR207::TPXL5-F1+R2-C, a pro TPXL6 protein pDONR207::TPXL6-F1+R1-N a pDONR207::TPXL6-F1+R2-C.

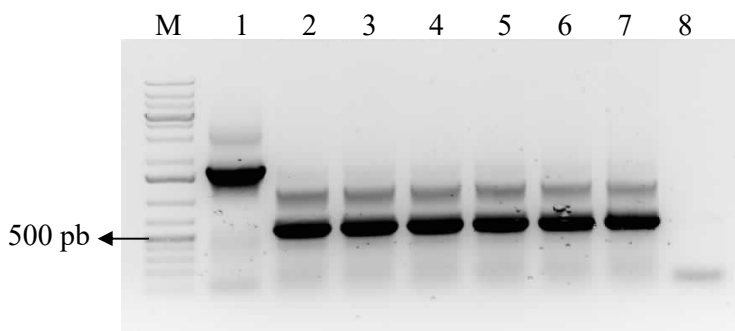
Po transformaci bakterií *E. coli* - Top10 BP reakční směsí byla úspěšnost transformace ověřena pomocí reakce PCR za použití primerů specifických pro attL místa (Obr. 18, 19, 20).



Obr. 18: Elektroforetogram TPXL1attL PCR produktů separovaných v 1% agarózovém gelu. Ověření přítomnosti inzertu po BP reakci a transformaci bakterií *E. coli*. M - standard molekulové hmotnosti (GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder, ready-to-use; Fermentas); 1,2,3 - pDONR207::TPXL1-F1+R2-C; 4,5,6 - pDONR207::TPXL1-F1+R1-N; 3,4,5,6 - pozitivní kolonie (1 467 pb + attL místa).



Obr. 19: Elektroforetogram TPXL5attL PCR produktů separovaných v 1% agarózovém gelu. Ověření přítomnosti inzertu po BP reakci a transformaci bakterií *E. coli*. M - standard molekulové hmotnosti (GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder, ready-to-use; Fermentas); 1,2,3,4,5 - pDONR207::TPXL5-F1+R2-C; 6,7,8,9 - pDONR207::TPXL5-F1+R1-N; 1,2,3,5,6,7,8,9 - pozitivní kolonie (1 494 pb + attL místa).



Obr. 20: Elektroforetogram TPXL6attL PCR produktů separovaných v 1% agarózovém gelu. Ověření přítomnosti inzertu po BP reakci a transformaci bakterií *E. coli*. M - standard molekulové hmotnosti (GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder, ready-to-use; Fermentas); 1,2,3,4 - pDONR207::TPXL6-F1+R2-C; 5,6,7,8 - pDONR207::TPXL6-F1+R1-N; 2,3,4,5,6,7 - pozitivní kolonie (537 pb + attL místa).

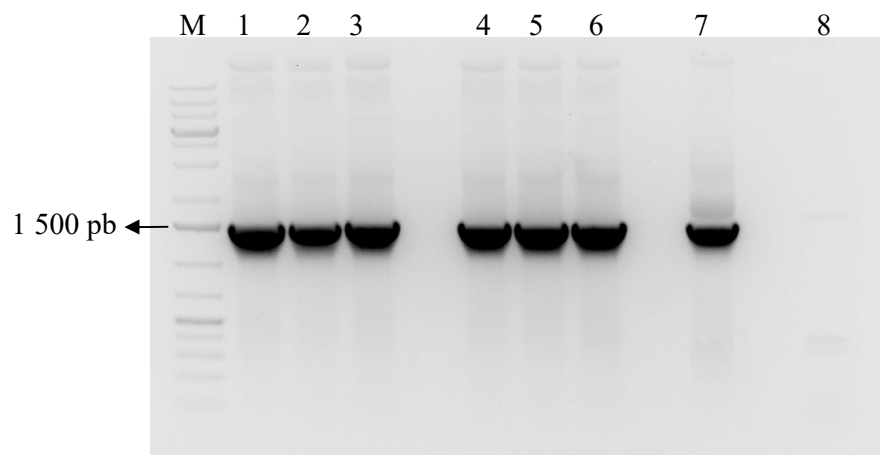
Ověřené pozitivní *attL* produkty o příslušné velikosti byly dále podrobeny sekvenování. Sekvenování konstruktů a analýza programem BLAST a DNA Baser prokázala úspěšnost BP reakce. Pro následnou LR reakci byl v případě TPXL1*attL* PCR produktu vybrán vzorek č. 4 (Obr. 18) - tedy N-koncová fúze, jelikož po analýze programem DNA Baser bylo zjištěno, že právě tento vzorek neobsahuje v sekvenci chyby. V případě TPXL5 a TPXL6 konstruktů byly vybrány vždy dva vzorky - jeden s C-koncovou fúzí a druhý s N-koncovou fúzí.

5.1.4 LR reakce

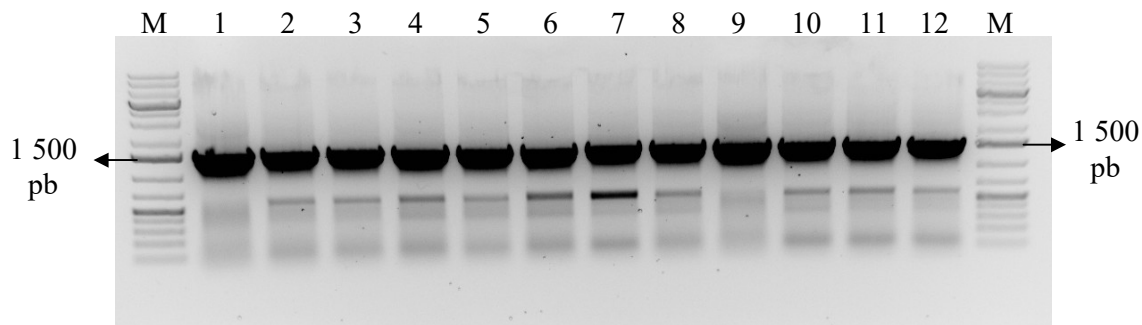
Při LR reakci dochází k rekombinaci mezi vstupním klonem s *attL* místy (TPXL1*attL*; TPXL5*attL* a TPXL6*attL*) a destinačním vektorem s *attR* místy. Byly použity tyto typy destinačních vektorů: pB7RWG2,0; pB7WGR2,0; pK7WGF2,0 a pMDC43. Výsledkem LR reakce je expresní klon s *attB* místy.

Byly připraveny různé varianty konečných konstruktů. Pro TPXL1 protein byly připraveny konstrukty pK7WGF2,0::TPXL1-N-GFP a pB7RWG2,0::TPXL1-N-RFP. Velikost obou izertů byla 1 467 pb. Pro TPXL5 protein byly připraveny konstrukty pK7WGF2,0::TPXL5-N-GFP; pB7WGR2,0::TPXL5-N-RFP; pMDC43::TPXL5-C-GFP; pB7RWG2,0::TPXL5-C-RFP. Velikost všech izertů byla 1 494 pb. Pro TPXL6 protein byly připraveny tyto konstrukty pK7WGF2,0::TPXL6-N-GFP; pB7WGR2,0::TPXL6-N-RFP; pMDC43::TPXL6-C-GFP; pB7RWG2,0::TPXL6-C-RFP. Velikost všech inzertů byla 537 pb.

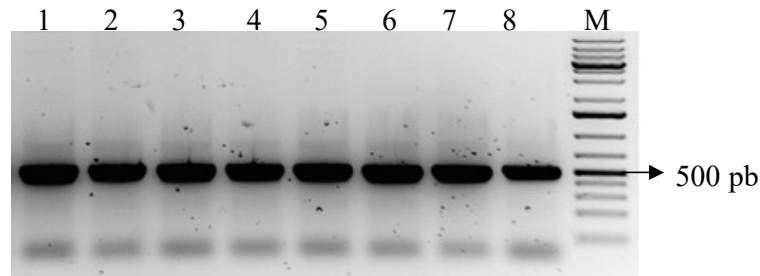
Ověření LR reakce pomocí PCR za použití specifických primerů bez *attB* míst prokázalo, že LR reakce i transformace bakterií proběhly úspěšně. Všechny testované kolonie obsahovaly inzert s příslušnou požadovanou velikostí (Obr. 21, 22, 23).



Obr. 21: Elektroforetogram TPXL1-N PCR produktů po LR reakci a transformaci bakterií *E. coli* separovaných pomocí 1% agaróзовé gelové elektroforézy. M - standard molekulové hmotnosti (GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder, ready-to-use; Fermentas); 1,2,3 - pK7WGF2,0::TPXL1-N-GFP; 4,5,6 - pB7RWG2,0::TPXL1-N-RFP; 7 - pozitivní kontrola (pK7WGF2,0::TPXL5-N-GFP, velikost 1494 pb + attB místa); 8 - negativní kontrola (H₂O); 1,2,3,4,5,6 - pozitivní kolonie (1 467 pb + attB místa).



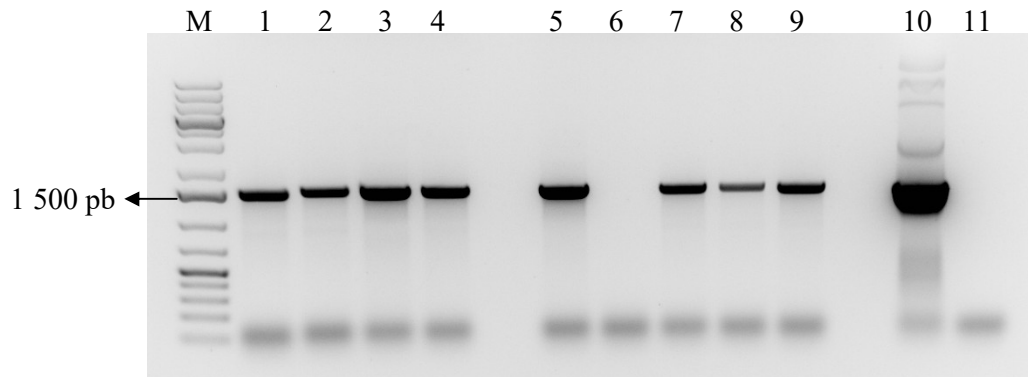
Obr. 22: Elektroforetogram TPXL5 PCR produktů po LR reakci a transformaci bakterií *E. coli* separovaných pomocí 1% agaróзовé gelové elektroforézy. M - standard molekulové hmotnosti (GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder, ready-to-use; Fermentas); 1,2,3 - pK7WGF2,0::TPXL5-N-GFP; 4,5,6 - pB7RWG2,0::TPXL5-N-RFP; 7,8,9 - pB7RWG2,0::TPXL5-C-RFP; 10,11,12 - pMDC43::TPXL5-C-GFP; 1 - 12 - pozitivní kolonie (1 494 pb + attB místa).



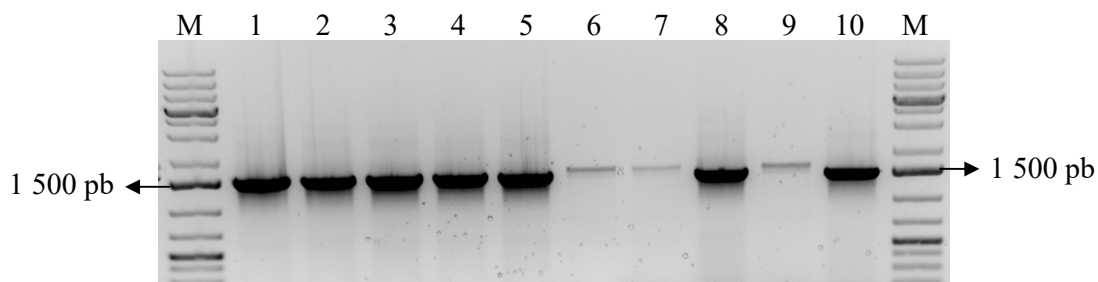
Obr. 23: Elektroforetogram TPXL6 PCR produktů po LR reakci a transformaci bakterií *E. coli* separovaných pomocí 1% agaróзовé gelové elektroforézy. M - standard molekulové hmotnosti (GeneRuler™ Low Range DNA Ladder, ready-to-use; Fermentas); 1,2 - pB7WGR2,0::TPXL6-N-RFP; 3,4 - pMDC43::TPXL6-C-GFP; 5,6 - pB7RWG2,0::TPXL6-C-RFP; 7,8 - pK7WGF2,0::TPXL6-N-GFP; 1,2,3,4,5,6,7,8 - pozitivní kolonie (537 pb + *attB* místa).

5.2 Transformace bakterií *Agrobacterium tumefaciens*

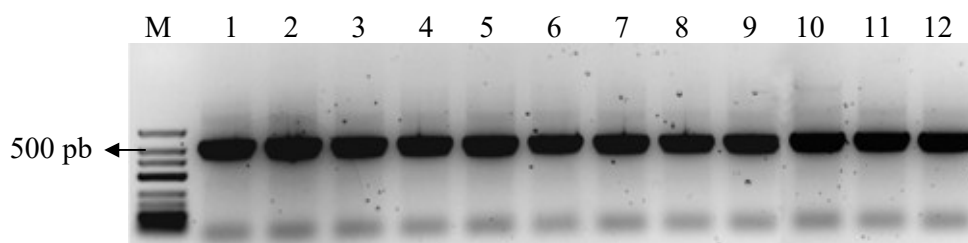
Po transformaci kompetentních buněk *A. tumefaciens* GV301 byla opět ověřena přítomnost plasmidu pomocí PCR reakce. Na obr. 24, 25 a 26 je vyobrazen elektroforetogram TPXL PCR produktů po transformaci *Agrobacterium tumefaciens*.



Obr. 24: Elektroforetogram TPXL1-N PCR produktů po transformaci *Agrobacterium tumefaciens* separovaných pomocí 1% agaróзовé gelové elektroforézy. M - standard molekulové hmotnosti (GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder, ready-to-use; Fermentas); 1,2,3,4 - pK7WGF2,0::TPXL1-N-GFP; 5,6,7,8,9 - pB7RWG2,0::TPXL1-N-RFP; 10 - pozitivní kontrola (pB7RWG2,0::TPXL5-C-RFP, velikost 1494 pb + *attB* místa); 11 - negativní kontrola (H₂O); 1,2,3,4,5,7,8,9 - pozitivní kolonie (1 467 pb + *attB* místa).



Obr. 25: Elektroforetogram TPXL5 PCR produktů po transformaci *Agrobacterium tumefaciens* separovaných pomocí 1% agaróзовé gelové elektroforézy. M - standard molekulové hmotnosti (GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder, ready-to-use; Fermentas); 1,2,3 - pK7WGF2,0::TPXL5-N-GFP; 4,5,6 - pB7WGR2,0::TPXL5-N-RFP; 7,8,9 - pB7RWG2,0::TPXL5-C-RFP; 10 - pMDC43::TPXL5-C-GFP; 1,2,3,4,5,8,10 - pozitivní kolonie (1 494 pb + *attB* místa).



Obr. 26: Elektroforetogram TPXL6 PCR produktů po transformaci *Agrobacterium tumefaciens* separovaných pomocí 1% agaróзовé gelové elektroforézy. M - standard molekulové hmotnosti (GeneRuler™ Low Range DNA Ladder, ready-to-use; Fermentas); 1,2,3 - pB7WGR2,0::TPXL6-N-RFP; 4,5,6 - pMDC43::TPXL6-C-GFP; 7,8,9 - pB7RWG2,0::TPXL6-C-RFP; 10,11,12 - pK7WGF2,0::TPXL6-N-GFP; 1 - 12 - pozitivní kolonie (537 pb + *attB* místa).

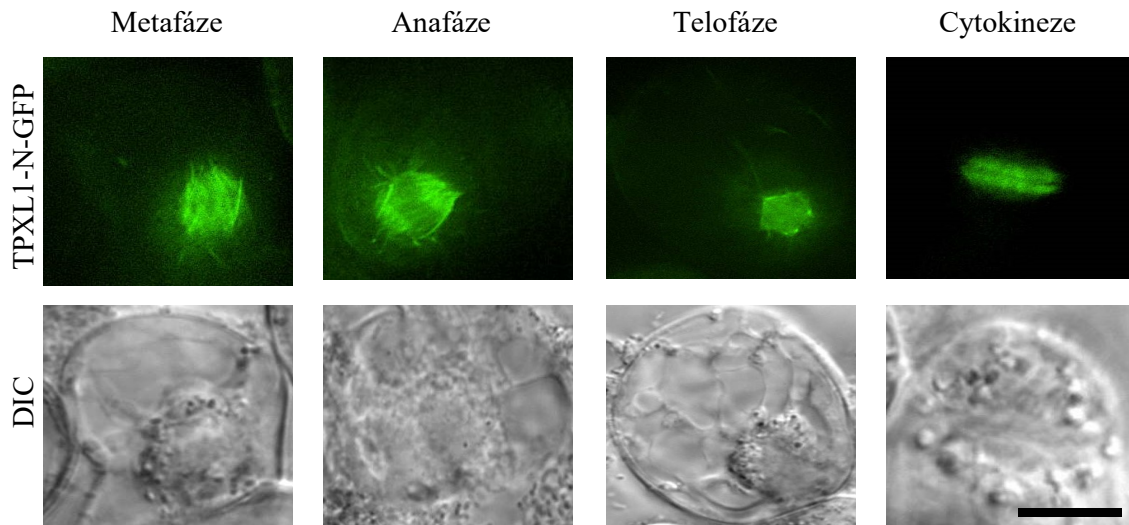
5.3 Expres v buněčných kulturách *Arabidopsis thaliana*

Rozcyklované dvoudenní buněčné suspenze *A. thaliana* LER byly transformovány bakteriemi *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 nesoucím tyto konstrukty: TPXL1-N-GFP; TPXL1-N-RFP; TPXL5-N-GFP; TPXL5-N-RFP; TPXL5-C-GFP; TPXL5-C-RFP; TPXL6-N-GFP; TPXL6-N-RFP; TPXL6-C-GFP a TPXL6-C-RFP. V případě, že byla transformace úspěšná, byla aplikována selekce na příslušném antibiotiku. *Agrobacterium* bylo odstraněno aplikací Cefotaximu po dobu několika pasáží.

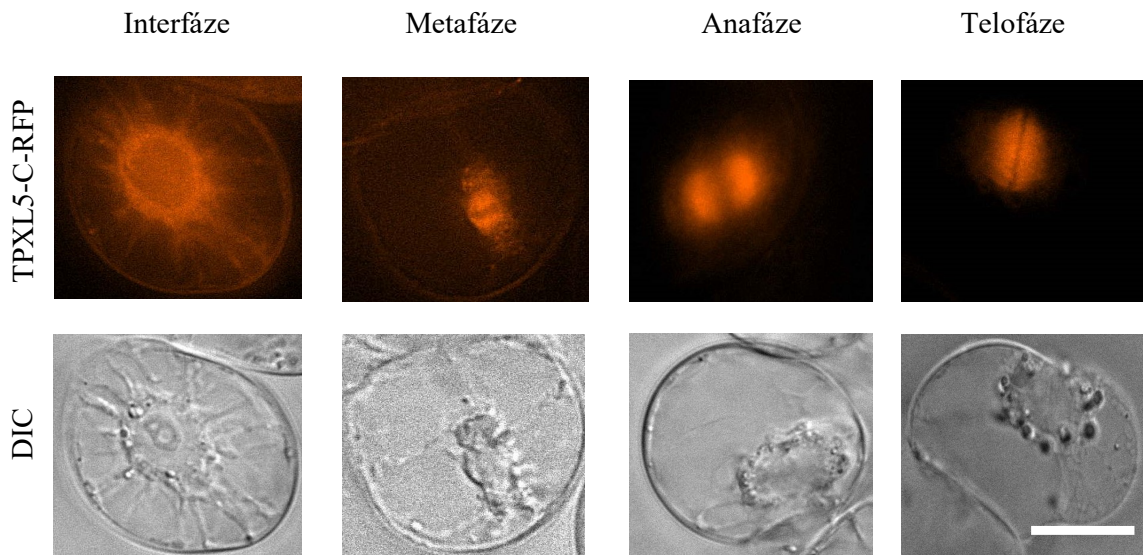
V případě konstruktů TPXL1-N-GFP; TPXL1-N-RFP; TPXL5-N-RFP; TPXL5-C-RFP a TPXL5-C-GFP se podařilo úspěšně transformovat a odvodit stabilní expresi

těchto proteinů v buněčné suspenzi. V případě ostatních konstruktů byl zpočátku v suspenzích pozorován signál, avšak stabilní exprese TPXL6 proteinu se zatím odvodit nepodařilo.

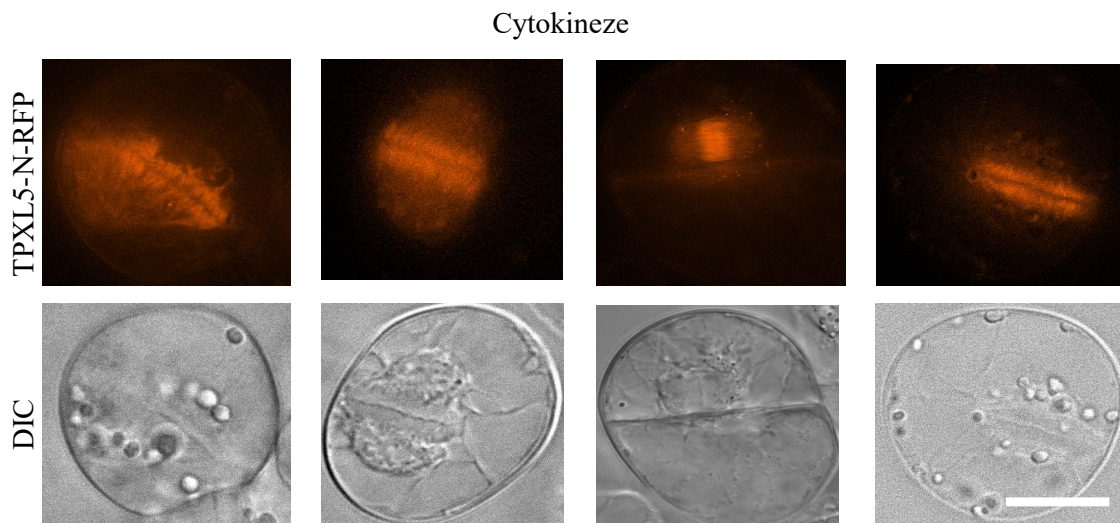
Expres příslušných proteinů byla pozorována v interfázních i mitotických buňkách (Obr. 27, 28, 29, 30, 31).



Obr. 27: Lokalizace TPXL1-N-GFP konstruktů během mitotického dělení buňky v buněčných suspenzích *Arabidopsis thaliana* ekotyp *Landsberg erecta*. Protein TPXL1-N-GFP je během mitotického dělení lokalizován v oblasti mikrotubulů mitotického vřeténka. Během telofáze je pak lokalizován ve střední části dělicího aparátu. Během cytokineze je tento protein koncentrován v oblasti mikrotubulů fragmoplastu. Bar = 10 μ m.

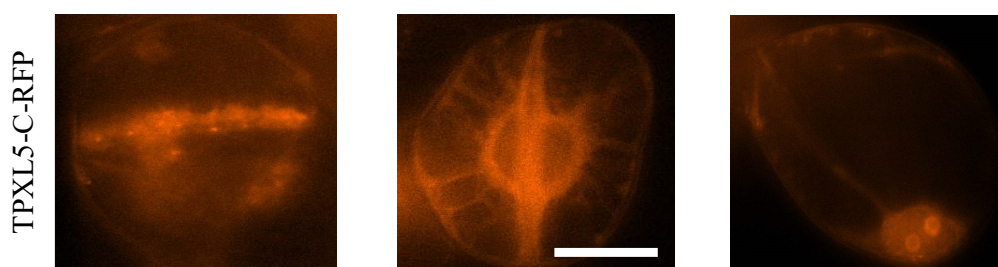


Obr. 28: Lokalizace TPXL5-C-RFP konstruktů v interfázních a dělicích se buňkách suspenzí *Arabidopsis thaliana* ekotyp *Landsberg erecta*. Protein TPXL5-C-RFP je během interfáze lokalizován v jádře, nejvíce však v jaderné membráně. Během mitotického dělení je tento protein lokalizován v oblasti mikrotubulů mitotického vřeténka. Během telofáze je lokalizován v oblasti ekvatoriální roviny buňky. Bar = 10 μm .



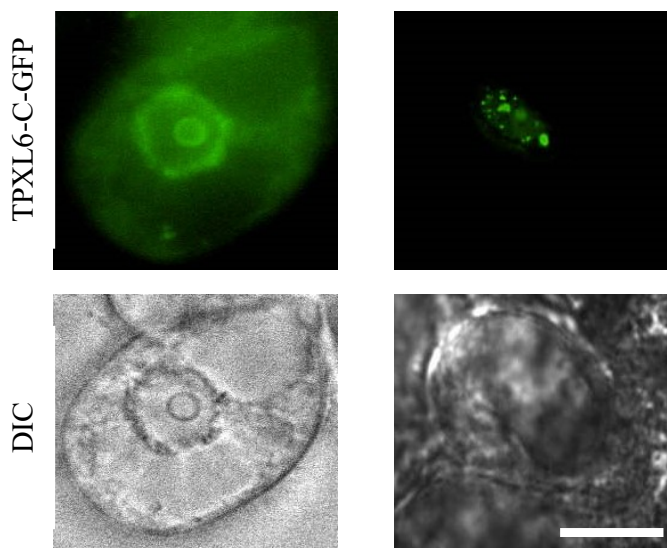
Obr. 29: Lokalizace TPXL5-N-RFP konstruktů během cytokineze v buněčných suspenzích *Arabidopsis thaliana* ekotyp *Landsberg erecta*. Během cytokineze je protein TPXL5-N-RFP lokalizován nejvíce v oblasti mikrotubulů fragmoplastu. Bar = 10 μm .

Pozdní cytokineze, interfáze



Obr. 30: Lokalizace TPXL5-C-RFP konstruktů během pozdní cytokineze a interfáze v buněčných suspenzích *Arabidopsis thaliana* ekotyp *Landsberg erecta*. Během pozdní cytokineze je protein TPXL5-C-RFP lokalizován v oblasti buněčné přepážky a v jádře - nejvíce v oblasti jaderné membrány. Vpravo na obrázku je protein lokalizován v interfázní buňce i v jadérku. Bar = 10 μ m.

Interfáze



Obr. 31: Lokalizace TPXL6-C-GFP konstruktů během interfáze v buněčných suspenzích *Arabidopsis thaliana* ekotyp *Landsberg erecta*. Během interfáze je protein TPXL6-C-GFP lokalizován v oblasti jaderné membrány a v jadérku. Vpravo na obrázku je protein koncentrován v bodech v nukleoplazmě. Bar = 10 μ m.

V interfázních buňkách suspenzí byl v případě proteinů TPXL1, TPXL5 a TPXL6 přítomen signál v jádře a v jaderné membráně. Výjimečně byl tento signál pozorován i v jadérku. Během metafáze a anafáze se signál nacházel v oblasti mikrotubulů mitotického vřeténka. Během telofáze se signál vyskytoval ve střední části dělicího aparátu. Během cytokineze byl signál lokalizován v oblasti mikrotubulů fragmoplastu. V pokročilejší fázi

cytokineze byly proteiny lokalizovány v oblasti buněčné přepážky a v jádře - nejvíce v oblasti jaderné membrány (Obr. 27, 28, 29, 30, 31).

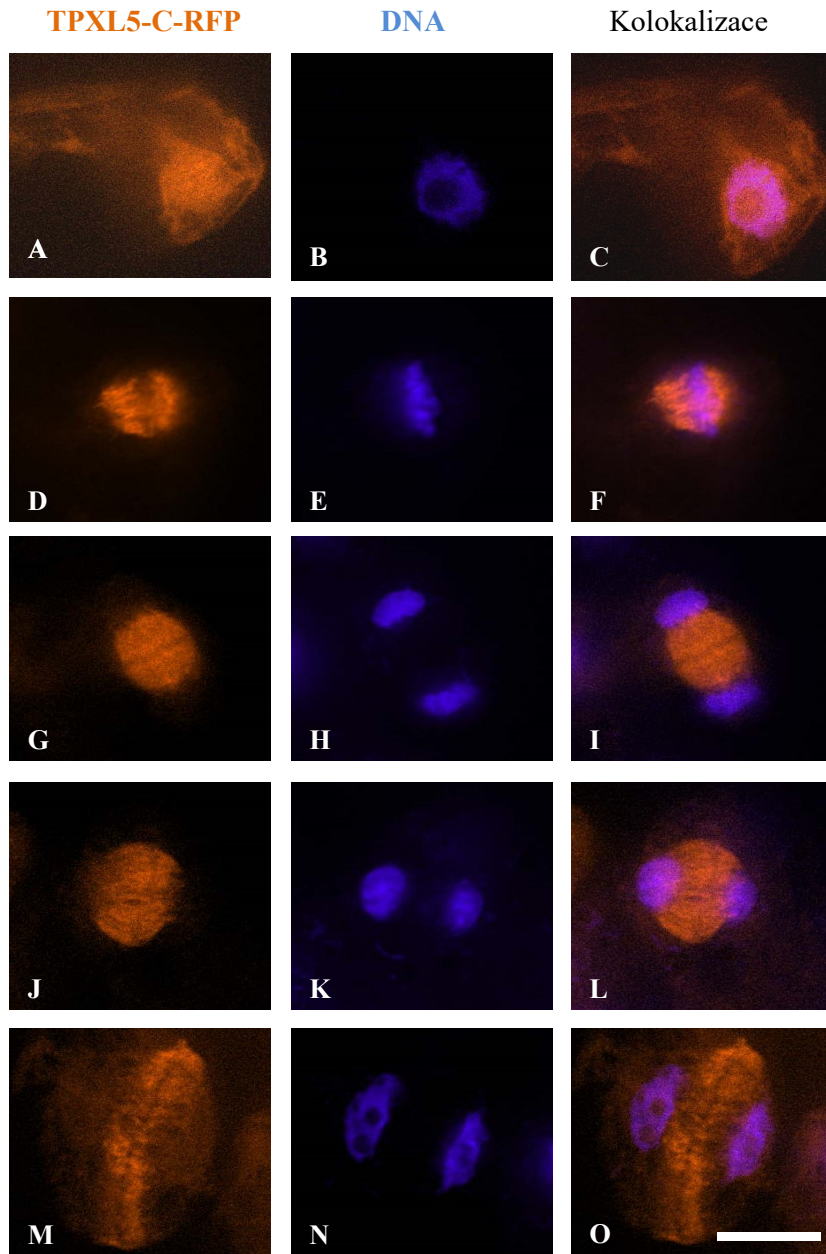
5.4 Imunofluorescenční barvení suspenzních kultur *Arabidopsis thaliana*

Pro bližší stanovení lokalizace a funkce proteinů bylo provedeno imunofluorescenční barvení suspenzních kultur *Arabidopsis thaliana* transformovaných konstrukty TPXL5-C-RFP, TPXL5-N-RFP a TPXL5-C-GFP.

Buňky byly značeny těmito primárními protilátkami: *Anti GFP Rabbit* nebo *Anti GFP Mouse* proti GFP a *Anti RFP Rat* proti RFP. Sekundární protilátky *Alexa Fluor 488 Goat Anti-Rabbit*, *Alexa Fluor 488 Goat Anti-Mouse* a *Alexa Fluor 546 Goat Anti-Rat* byly použity v následujících kombinacích: *Anti GFP Rabbit + Alexa Fluor 488 Goat Anti-Rabbit*, *Anti GFP Mouse + Alexa Fluor 488 Goat Anti-Mouse* a *Anti RFP Rat + Alexa Fluor 546 Goat Anti-Rat*. DNA byla barvena DAPI. Na obr. 32 jsou znázorněny jednotlivé lokalizace proteinu TPXL5-C-RFP, DNA a jejich vzájemná lokalizace.

Analýza imunofluorescenčního barvení suspenzních kultur *Arabidopsis thaliana* byla provedena pomocí fluorescenčního mikroskopu CellR (Olympus). Byly hodnoceny jednotlivé fáze mitózy a také interfáze. Během interfáze byl protein TPXL5 přítomen v jádře a v jaderné membráně. V metafázi a anafázi, byl studovaný protein lokalizován v oblasti mitotického vřeténka. V průběhu telofáze byla zjevná lokalizace v oblasti pólů mitotického vřeténka a v oblasti ekvatoriální roviny buňky. Během cytokineze se protein vyskytoval v oblasti fragmoplastu.

Pomocí techniky nepřímé imunofluorescence byla tedy potvrzena jaderná lokalizace proteinu TPXL5 v interfázních buňkách a v oblasti mikrotubulárního uspořádání během mitózy. Výsledky imunolokalizace potvrdily stejná pozorování jako v případě exprese proteinů TPXL5 v živých transformovaných suspenzních kulturách *Arabidopsis thaliana*.



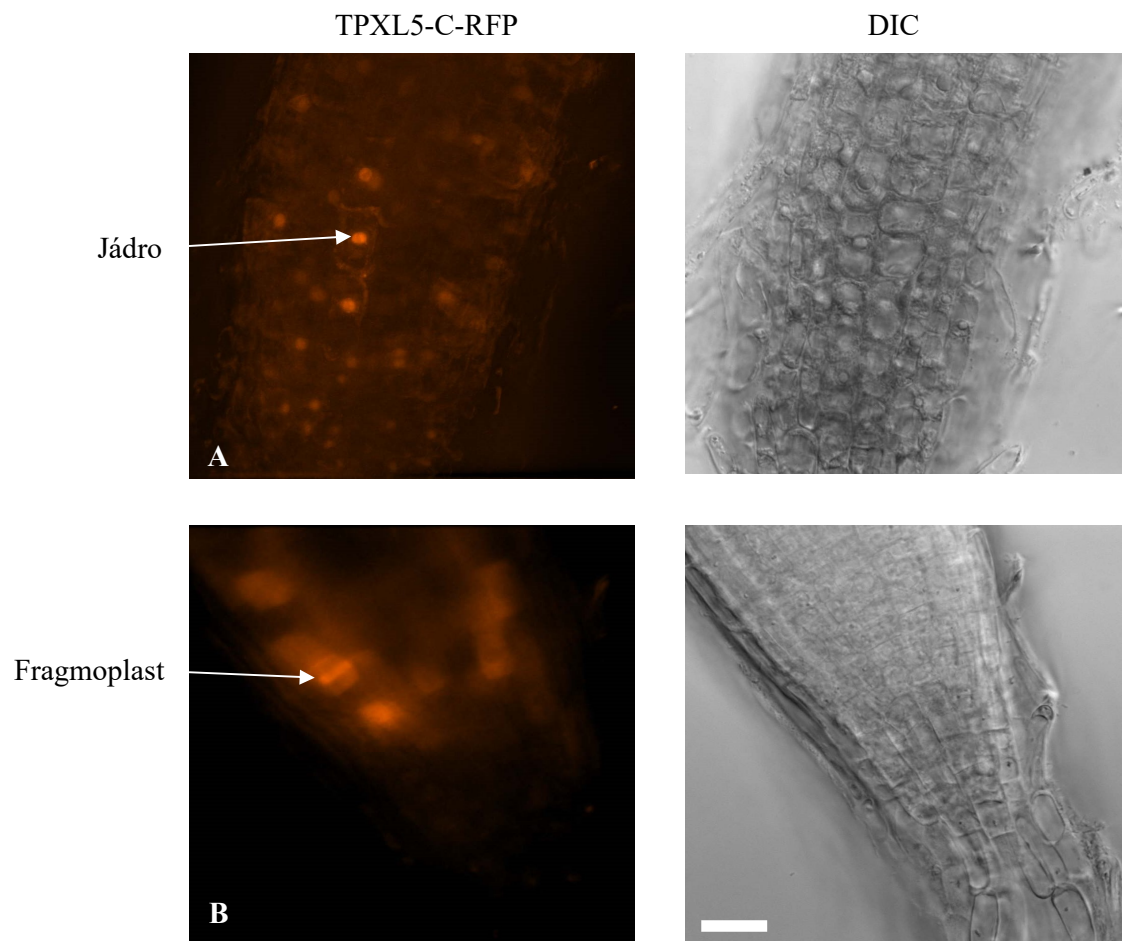
Obr. 32: Imunofluorescenční značení proteinu TPXL5-C-RFP protilátkami (Anti RFP Rat + Alexa Fluor 546 Goat Anti-Rat). DNA byla nabarvena DAPI. A, B, C - znázorněna interfáze. A) Protein TPXL5 v jádře B) DNA C) Kolokalizace proteinu TPXL5 a DNA. D, E, F - znázorněna metafáze. D) Protein TPXL5 v oblasti mitotického vřeténka E) Chromozomy v ekvatoriální rovině F) Kolokalizace proteinu TPXL5 a DNA. G, H, I - znázorněna pozdní anafáze. G) Protein TPXL5 v oblasti ekvatoriální roviny a pólů mitotického vřeténka H) Chromozomy jsou taženy k opačným pólům buňky I) Kolokalizace proteinu TPXL5 a DNA. J, K, L - znázorněna telofáze. J) Protein TPXL5 v oblasti ekvatoriální roviny buňky K) Chromozomy L) Kolokalizace proteinu TPXL5 a DNA. M, N, O - znázorněna cytokineze - fragmoplast. M) Protein TPXL5 tvoří fragmoplast N) Vznik dvou dceřiných jader O) Kolokalizace proteinu TPXL5 a DNA. Bar = 10 μ m.

5.5 Transformace rostlin *Arabidopsis thaliana*

Rostliny *A. thaliana* LER byly transformovány bakteriemi *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 nesoucí konstrukty TPXL5-N-GFP, TPXL5-N-RFP, TPXL5-C-GFP, TPXL5-C-RFP, TPXL6-N-GFP, TPXL6-N-RFP, TPXL6-C-GFP a TPXL6-C-RFP.

Po selekci T1 generace semen na médiu s antibiotiky byly asi 14-denní semenáčky rostlin pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem pro ověření, zda se v rostlině nachází příslušný signál. V případě pozitivního nálezu byly rostliny dále pěstovány pro další generace.

Zatím se pouze v případě konstruktů TPXL5-C-RFP podařilo získat transformované rostliny (Obr. 33). Signál byl nejčastěji viditelný v kořenových meristémech. Na obr. 33A je zachycen RFP-signál, který se nacházel v jádrech interfázních buněk, kdežto na obr. 33B je zachycen signál v dělicí se buňce. Jedná se o konec mitózy - tedy vytvoření struktury zvané fragmoplast. Z obr. 33B je zřejmé, že protein TPXL5 se rovněž nachází v oblasti mikrotubulů fragmoplastu.



Obr. 33: Lokalizace proteinu TPXL5-C-RFP v kořenových meristémech *Arabidopsis thaliana* ekotyp *Landsberg erecta*. A) Interfázní jádro B) Buněčné dělení - fragmoplast. Bar = 25 μ m.

6 DISKUZE

V provedených experimentech jsem pro zjištění lokalizace proteinů TPXL1, TPXL5 a TPXL6 využila transientní a stabilní transformaci buněčných suspenzí a také rostlin *Arabidopsis thaliana*. Transientní neboli dočasná exprese způsobí silnější expresi, ale pouze po krátkou dobu - záleží na počtu kopií vneseného plazmidu. Kdežto u stálé exprese je příslušný gen integrován do chromozomu a protein je exprimován sice v menší míře, ale stabilně a tato situace přibližně odpovídá endogennímu proteinu.

Předchozí studie ukázaly, že TPX2 protein u *Arabidopsis thaliana* je protein asociovaný s mikrotubuly (Vos *et al.*, 2008; Petrovská *et al.*, 2012). Tato lokalizace se potvrdila i u proteinů TPXL1, TPXL5 a TPXL6 za použití metody transformace buněčných suspenzí *Arabidopsis thaliana* a následným pozorováním fluorescenčním mikroskopem (Obr. 28, 29, 30, 31). Signál byl přítomen v jádře a v jaderné membráně během interfáze, dále pak během metafáze v oblasti mitotického vřeténka a v oblasti mikrotubulů fragmoplastu v případě cytokineze. U *Xenopus laevis* se během telofáze TPX2 protein exprimuje výhradně ve středovém tělísku (Wittmann *et al.*, 2000), kdežto v rostlinách se TPX2 protein exprimuje výhradně v okolí dekonduzujících chromozomů a signál nebyl na mikrotubulech fragmoplastu detekován (Vos *et al.*, 2008). Dle Vos *et al.* (2008) je dokonce TPX2 protein degradován v průběhu pozdní anafáze. Avšak proteiny TPXL1, TPXL5 a TPXL6 byly v průběhu telofáze a samotné cytokineze detekovány a to ve střední části dělicího aparátu a později v oblasti mikrotubulů fragmoplastu buňky. Naproti tomu v oblasti dekonduzujících chromozomů tyto proteiny detekovány nebyly. Vos *et al.* (2008) ve své práci popsali u TPX2 proteinu přítomnost sekvence pro jaderný lokalizační signál (NLS), jenž je zodpovědná za transport proteinu do dceřiných jader. Proto proteiny, které tuto sekvenci neobsahují, v průběhu telofáze dále asociují s mikrotubuly a nekoncentrují se do oblastí dceřiných jader. V proteinech TPXL1, TPXL5 a TPXL6 se podobná sekvence ale nevyskytuje. Dále zde nejsou přítomny Aurora A vazebné domény. Do jaké míry souvisí tato rozdílná lokalizace v případě TPXL proteinů a TPX2 u *Arabidopsis* s rozdílnou přítomností domén a funkčních motivů je třeba v dalších experimentech ještě objasnit.

V některých suspenzních buňkách se signál nacházel i v jadérku (Obr. 31). Avšak ve většině pozorovaných buněk byl signál přítomen v jádře mimo jadérko. Přítomnost signálu v jadérku mohla být způsobena například stresem a poškozením buněk. Výskyt TPX2

proteinu v jadérku nebyl zaznamenán ani v jiných studiích (Vos *et al.*, 2008; Petrovská *et al.*, 2012; Petrovská *et al.*, 2013).

V transformovaných buněčných suspenzích byly v počátku pozorovány výrazné signály koncentrované v bodech v jaderné membráně a v nukleoplazmě (Obr. 31). Z těchto míst zřejmě rostou a organizují se mikrotubuly (Petrovská *et al.*, 2013). V buněčných suspenzích se dokonce podařilo odvodit stabilní expresi proteinů TPXL1 a TPXL5. V případě TPXL6 proteinu však po nějaké době signál z buněčných suspenzí vymizel. Vzhledem k tomu, že metoda transformace buněčných suspenzí byla provedena dle standartního protokolu, není zatím příčina nezdarů jasná. Z tohoto důvodu bude nutné ještě transformaci buněčných suspenzí těmito vektory pro protein TPXL6 zopakovat.

Imunofluorescenční barvení suspenzních kultur bylo studováno pouze v případě TPXL5 proteinu (Obr. 32). Výsledky imunobarvení byly obdobné jako v případě pozorování signálu v buněčných suspenzích. Pomocí protilátek byla zjištěna lokalizace tohoto proteinu TPXL5 opět v jádře v interfázních buňkách, v oblasti mikrotubulů mitotického vřetenka a v oblasti mikrotubulů fragmoplastu v dělících se buňkách.

Lokalizace TPXL5 proteinu byla obdobná i v případě transformace rostlin (Obr. 33). Exprese proteinu přímo v rostlinách představuje nejpřirozenější podmínky pro studování funkcí proteinů.

Lokalizace proteinů TPXL1, TPXL5 a TPXL6 v oblasti mitotického vřetenka, dále pak při organizaci mikrotubulů fragmoplastu a buněčné přepážky poukazuje na roli těchto proteinů při organizaci mikrotubulů mitotického aparátu. Další experimenty, které budou detailně analyzovat lokalizace těchto TPXL proteinů, jejich proteinové interakce, a které budou navazovat na experimenty prezentované v této diplomové práci, pomohou objasnit a více přiblížit funkce nově charakterizovaných proteinů TPXL1, TPXL5 a TPXL6. Dále ještě bude nutné zopakovat několik experimentů v případě proteinů TPXL1 a TPXL6. Následně taky bude probíhat analýza dalších zbylých proteinů genové rodiny TPX2 u *Arabidopsis thaliana*, aby se ověřilo, zda má tato genová rodina proteinů TPX2 proteinu u *Arabidopsis thaliana* opravdu obdobnou lokalizaci a funkci.

7 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo studium rostlinných proteinů *Arabidopsis thaliana* TPX2-like proteinu 1, TPX2-like proteinu 5 a TPX2-like proteinu 6. Jedná se o proteiny, které patří do genové rodiny proteinů homologních ke kanonickému TPX2 proteinu. TPX2 protein je s mikrotubuly asociovaný protein, který je mimo jiné nezbytný pro vznik mitotického vřeténka a nukleaci mikrotubulů v rostlinných buňkách. TPX2-like proteiny (TPXL) však nebyly dosud více charakterizovány. Předmětem této práce bylo studium lokalizace těchto proteinů v buněčných kulturách a rostlinách *Arabidopsis thaliana* v průběhu buněčného cyklu.

Pomocí GATEWAY[®] techniky klonování byly připraveny GFP a RFP fúzní variaty genů pro proteiny TPXL1, TPXL5 a TPXL6. Následně byla funkčnost těchto vektorů ověřena pomocí transientní a stabilní exprese v buněčných suspenzích *Arabidopsis thaliana* ekotyp *Landsberg erecta*. Fluorescenční mikroskopii pak byla analyzována lokalizace těchto GFP a RFP fúzních proteinů v buňkách *in vivo* i ve fixovaných buňkách pomocí nepřímé imunofluorescence. Následně pak byla studována lokalizace těchto proteinů přímo v rostlinách *Arabidopsis thaliana*.

Analýza lokalizace TPXL proteinů ukázala, že během interfáze jsou tyto proteiny lokalizovány především v jádře buňky. V průběhu mitózy jsou tyto proteiny koncentrovány do oblasti mikrotubulů mitotického vřeténka, obdobně jako kanonický TPX2 protein. Avšak ve fázi cytokineze se tyto proteiny nacházely v oblasti mikrotubulů fragmoplastu, čímž se odlišují od kanonického TPX2. U všech výsledků použitých technik byly výsledky obdobné a naznačují úlohu proteinů TPXL1, TPXL5 a TPXL6 v organizaci mikrotubulů v průběhu buněčného dělení. V budoucnu bude probíhat analýza dalších zbylých proteinů genové rodiny TPX2 u *Arabidopsis thaliana*.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Aguirre-Portoles, C., Bird, A. W., Hyman, A., Cañamero, M., Pérez de Castro, I., Malumbres, M. (2012): TPX2 controls spindle integrity, genome stability, and tumor development. *Cancer Research*. 72: 1518 - 1528.

Andersen, S. S. L. (2000): Spindle assembly and the art of regulating microtubule dynamics by MAPs and Stathmin/Op18. *Trends in Cell Biology*. 10: 261 - 267.

Bateman, A., Martin, M. J., O'Donovan, C., Magrane, M., Apweiler, R., Alpi, E., Antunes, R., Arganiska, J., Bely, B., Bingley, M., Bonilla, C., Britto, R., Bursteinas, B., Chavali, G., Cibrian-Uhalte, E., Silva, A. D., De Giorgi, M., Dogan, T., Fazzini, F., Gane, P., Castro, L. G., Garmiri, P., Hatton-Ellis, E., Hieta, R., Huntley, R., Legge, D., Liu, W., Luo, J., MacDougall, A., Mutowo, P., Nightingale, A., Orchard, S., Pichler, K., Poggioli, D., Pundir, S., Pureza, L., Qi, G., Rosanoff, S., Saidi, R., Sawford, T., Shypitsyna, A., Turner, E., Volynkin, V., Wardell, T., Watkins, X., Zellner, H., Cowley, A., Figueira, L., Li, W., McWilliam, H., Lopez, R., Xenarios, I., Bougueleret, L., Bridge, A., Poux, S., Redaschi, N., Aimo, L., Argoud-Puy, G., Auchincloss, A., Axelsen, K., Bansal, P., Baratin, D., Blatter, M. C., Boeckmann, B., Bolleman, J., Boutet, E., Breuza, L., Casal-Casas, C., De Castro, E., Coudert, E., Cucho, B., Doche, M., Dornevil, D., Duvaud, S., Estreicher, A., Famiglietti, L., Feuermann, M., Gasteiger, E., Gehant, S., Gerritsen, V., Gos, A., Gruaz-Gumowski, N., Hinz, U., Hulo, C., Jungo, F., Keller, G., Lara, V., Lemercier, P., Lieberherr, D., Lombardot, T., Martin, X., Masson, P., Morgat, A., Neto, T., Noupikel, N., Paesano, S., Pedruzzi, I., Pilbout, S., Pozzato, M., Pruess, M., Rivoire, C., Roechert, B., Schneider, M., Sigrist, C., Sonesson, K., Staehli, S., Stutz, A., Sundaram, S., Tognolli, M., Verbregue, L., Veuthey, A. L., Wu, C. H., Arighi, C. N., Arminski, L., Chen, C., Chen, Y., Garavelli, J. S., Huang, H., Laiho, K., McGarvey, P., Natale, D. A., Suzek, B. E., Vinayaka, C., Wang, Q., Wang, Y., Yeh, L. S., Yerramalla, M. S., Zhang, J. (2015): UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Research*. 43: 204 - 212.

Binarová, P., Cenklová, V., Procházková, J., Doskocilová, A., Volc, J., Vrlík, M., Bögre, L. (2006): Gamma-tubulin is essential for acentrosomal microtubule nucleation and coordination of late mitotic events in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 18: 1199 - 1212.

Binarová, P., Straatman, K., Hause, B., Hause, G., Lammeren, A. A. M. (1993): Nuclear DNA synthesis during the induction of embryogenesis in cultured microspores and pollen of *Brassica napus* L. *Theoretical and applied genetics*. 87: 9 - 16.

Bird, A. W., Hyman, A. A. (2008): Building a spindle of the correct length in human cells requires the interaction between TPX2 and Aurora A. *Journal of Cell Biology*. 182: 289 - 300.

Boleti, H., Karsenti, E., Vernos, I. (1996): Xklp2, a novel *Xenopus* centrosomal kinesin-like protein required for centrosome separation during mitosis. *Cell*. 84: 49 - 59.

Bolser, D., Staines, D. M., Pritchard, E., Kersey, P. (2016): Ensembl Plants: Integrating Tools for Visualizing, Mining, and Analyzing Plant Genomics Data. *Methods in Molecular Biology*. 1374: 115 - 140.

Burkhard, P., Stetefeld, J., Strelkov, S. V. (2001): Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends in Cell Biology*. 11: 82 - 88.

Carazo-Salas, R., Gruss, O. J., Mattaj, I. W., Karsenti, E. (2001). Ran-GTP coordinates the regulation of microtubule nucleation and dynamics during mitotic spindle assembly. *Nature Cell Biology*. 3: 228 - 234.

Carmena, M., Earnshaw, W. C. (2003): The cellular geography of Aurora kinases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 4: 842 - 854.

Clough, S. J., Bent, A. F. (1998): Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. 16: 735 - 743.

Demidov, D., Van Damme, D., Geelen, D., Blattner, F. R., Houben, A. (2005): Identification and dynamics of two classes of Aurora-like kinases in *Arabidopsis* and other plants. *The Plant Cell*. 17: 836 - 848.

Dixit, R., Cyr, R. (2004): The cortical microtubule array: from dynamics to organization. *The Plant Cell*. 16: 2546 - 2552.

Dryková, D., Cenklová, V., Sulimenko, V., Volc, J., Draber, P., Binarová, P. (2003): Plant γ tubulin interacts with $\alpha\beta$ -tubulin dimers and forms membrane associated complexes. *The Plant Cell*. 15: 465 - 480.

Eyers, P. A., Maller, J. L. (2003): Regulation of *Xenopus* Aurora A activation by TPX2. *The Journal of Biological Chemistry*. 279: 9008 - 9015.

Finn, R. D., Bateman, A., Clements, J., Coghill, P., Eberhardt, R. Y., Eddy, S. R., Heger, A., Hetherington, K., Holm, Mistry, L. J., Sonnhammer, E. L. L., Tate, J., Punta, M. (2014): The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research*. 42: 222 - 230.

Glover, D., Leibowitz, M., McLean, D., Parry, H. (1995): Mutations in Aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles. *Cell*. 81: 95 - 105.

Gruss, O. J., Carazo-Salas, R. E., Schatz, C. A., Guarguaglini, G., Kast, J., Wilm, M., Le Bot, N., Vernos, I., Karsenti, E., Mattaj, I. W. (2001): Ran induces spindle assembly by reversing the inhibitory effect of importin alpha on TPX2 activity. *Cell*. 104: 83 - 93.

Gruss, O. J., Vernos, I. (2004): The mechanism of spindle assembly: functions of Ran and its target TPX2. *The Journal of Cell Biology*. 166: 949 - 955.

Haizel, T., Merkle, T., Pay, A., Fejes, E., Nagy, F. (1997): Characterization of proteins that interact with the GTP-bound form of the regulatory GTPase Ran in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. 11: 93 - 103.

Hamada, T. (2014): Microtubule organization and microtubule-associated proteins in plant cells. *International Review of Cell and Molecular Biology*. 312: 1 - 52.

Hardham, A. R., Gunning, B. E. (1978): Structure of cortical microtubule arrays in plant cells. *Journal of Cell Biology*. 77: 14 - 34.

Harrison, S. J., Mott, E. K., Parsley, K., Aspinall, S., Gray, J. C., Cottage, A. (2006): A rapid and robust method of identifying transformed *Arabidopsis thaliana* seedling following floral dip transformation. *Plant Methods*. 6: 2 - 19.

Heyndrickx, K. S., Vandepoele, K. (2012): Systematic identification of functional plant modules through the integration of complementary data sources. *Plant Physiology*. 159: 884 - 901.

Hyman, A., Karsenti, E. (1998): The role of nucleation in patterning microtubule networks. *Journal of Cell Science*. 111: 2077 - 2083.

Kahana, J. A., Cleveland, D. W. (2001): Some importin news about spindle assembly. *Science*. 291: 1718 - 1719.

Kalab, P., Pu, R. T., and Dasso, M. (1999): The Ran GTPase regulates mitotic spindle assembly. *Current Biology*. 9: 481 - 484.

Kawabe, A., Matsunaga, S., Nakagawa, K., Kurihara, D., Yoneda, A., Hasezawa, S., Uchiyama, S., Fukui, K. (2005): Characterization of plant Aurora kinases during mitosis. *Plant Molecular Biology*. 58: 1 - 13.

Klebe, R. J., Grant, A., Grant, G., Ghosh, P. (1995): Cyclic-AMP deficient MDCK cells form tubules. *Journal of Cellular Biochemistry*. 59: 453 - 462.

Kollman, J. M., Merdes, A., Mourey, L., Agard, D. A. (2011): Microtubule nucleation by γ tubulin complexes. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 12: 709 - 721.

Krishnakumar, V., Hanlon, M. R., Contrino, S., Ferlanti, E. S., Karamycheva, S., Kim, M., Rosen, B. D., Cheng, C., Moreira, W., Mock, S. A., Stubbs, J., Sullivan, J. M., Krampis, K., Miller, J. R., Micklem, G., Vaughn, M. & Town, C. D. (2014): Araport: the *Arabidopsis* Information Portal. *Nucleic Acids Research*. 43: 1003 - 1009.

Kumar, P., Wittmann, T. (2012): +TIPs: SxIPping along microtubule ends. *Trends in Cell Biology*. 22: 418 - 428.

Lamesch, P., Berardini, T. Z., Li, D., Swarbreck, D., Wilks, C., Sasidharan, R., Muller, R., Dreher, K., Alexander, D. L., Garcia-Hernandez, M., Karthikeyan, A. S., Lee, C. H., Nelson, W. D., Ploetz, L., Singh, S., Wensel, A., Huala, E. (2012): The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR): improved gene annotation and new tools. *Nucleic Acids Research*. 40: 1202 - 1210.

Letunic, I., Doerks, T., Bork, P. (2015): SMART: recent updates, new developments and status in 2015. *Nucleic Acids Research*. 43: 257 - 260.

Liu, W., Xie, Y., Ma, J., Luo, X., Nie, P., Zuo, Z., Lahrmann, U., Zhao, Q., Zheng, Y., Zhao, Y., Xue, Y., Ren, J. (2015): IBS: an illustrator for the presentation and visualization of biological sequences. *Bioinformatics*. 31: 3359 - 3361.

McNally, F. J., Vale, R. D. (1993): Identification of katanin, an ATPase that severs and disassembles stable microtubules. *Cell*. 75: 419 - 429.

Mitchell, A., Chang, H. Y., Daugherty, L., Fraser, M., Hunter, S., Lopez, R., McAnulla, C., McMenamin, C., Nuka, G., Pesseat, S., Sangrador-Vegas, A., Scheremetjew, M., Rato, C., Yong, S. Y., Bateman, A., Punta, M., Attwood, T. K., Sigrist, C. J., Redaschi, N., Rivoire, C., Xenarios, I., Kahn, D., Guyot, D., Bork, P., Letunic, I., Gough, J., Oates, M., Haft, D., Huang, H., Natale, D. A., Wu, C. H., Orengo, C., Sillitoe, I., Mi, H., Thomas, P. D., Finn, R. D. (2015): The InterPro protein families database: the classification resource after 15 years. *Nucleic Acids Research*. 43: 213 - 221.

Müller, S., Wright, A. J., Smith, L. G. (2009): Division plane control in plants: new players the band. *Trends in Cell Biology*. 19: 180 - 188.

Nachury, M. V., Maresca, T. J., Salmon, W. C., Waterman-Storer, C. M., Heald, R., Weis, K. (2001): Importin beta is a mitotic target of the small GTPase Ran in spindle assembly. *Cell*. 104: 95 - 106.

Patel, R. V., Nahal, H. K., Breit, R., Chen, Y., Provart, N. J. (2012): BAR Expressolog identification: expression profile ranking of “orthologous” genes in plant species. *The Plant Journal*. 71: 1038 - 1050.

Petrovská, B., Cenklová, V., Pochylová, Ž., Kourová, H., Doskočilová, A., Plíhal, O., Binarová, L., Binarová, P. (2012): Plant Aurora kinases play a role in maintenance of primary meristems and control of endoreduplication. *New Phytologist*. 193: 590 - 604.

Petrovská, B., Jeřábková, H., Chamrád, I., Vrána, J., Lenobel, R., Uřinová, J., Šebela, M., Doležel, J. (2014): Proteomic analysis of barley cell nuclei purified by flow sorting. *Cytogenetic and Genome Research*. 143: 78 - 86.

Petrovská, B., Jeřábková, H., Kohoutová, L., Cenklová, V., Pochylová, Ž., Gelová, Z., Kocárová, G., Váchová, L., Kurejová, M., Tomašíková, E., Binarová, P. (2013): Overexpressed TPX2 causes ectopic formation of microtubular arrays in the nuclei of acentrosomal plant cells. *Journal of Experimental Botany*. 64: 4575 - 4587.

Petrovská, B., Šebela, M., Doležel, J. (2015): Inside a plant nucleus: discovering the proteins. *Journal of Experimental Botany*. 66: 1627 - 1640.

Pickett-Heaps, J. D., Northcote, D. H. (1966): Organization of microtubules and endoplasmic reticulum during mitosis and cytokinesis in wheat meristems. *Journal of Cell Science*. 1: 109 - 120.

Radó-Trilla, N., Albà, M. (2012): Dissecting the role of low-complexity regions in the evolution of vertebrate proteins. *BMC Evolutionary Biology*. 12: 155.

Rasmussen, C. G., Humphries, J. A., Smith, L. G. (2011): Determination of symmetric and asymmetric division planes in plant cells. *Annual Review of Plant Biology*. 62: 387 - 409.

Růčková, E., Müller, P., Vojtěše, B. (2014): Expres a purifikace proteinů. *Klinická Onkologie*. 27: 92 - 97.

Sedbrook, J. C. (2004): MAPs in plant cells: delineating microtubule growth dynamics and organization. *Current Opinion in Plant Biology*. 7: 632 - 640.

The Arabidopsis Genome Initiative (2000): Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*. 408: 796 - 815.

Thiede, B., Koehler, C. J., Strozynski, M., Treumann, A., Stein, R., Zimny-Arndt, U., Schmid, M., Jungblut, P. R. (2013): High resolution quantitative proteomics of HeLa cells protein species using stable isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC), two-dimensional gel electrophoresis (2DE) and nano-liquid chromatography coupled to an LTQ-OrbitrapMass spectrometer. *Molecular and Cellular Proteomics*. 12: 529-538.

Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J. (2006): AceView: a comprehensive cDNA-supported gene and transcripts annotation. *Genome Biology*. 1: 12.1 - 14.

Tomašítková, E. (2015): Nепublikované výsledky.

Tomašítková, E., Demidov, D., Jeřábková, H., Binarová, P., Houben, A., Doležel, J., Petrovská, B. (2015): TPX2 protein of *Arabidopsis* activates Aurora kinase 1, but not Aurora kinase 3 *in vitro*. *Plant molecular biology reporter*. 33: 1988 - 1995.

Tsai, M. Y., Wiese, C., Cao, K., Martin, O., Donovan, P., Ruderman, J., Prigent, C., Zheng, Y. (2003): A Ran signalling pathway mediated by the mitotic kinase Aurora A in spindle assembly. *Nature Cell Biology*. 5: 242 - 248.

Tsai, M. Y., Zheng, Y. (2005): Aurora A kinase-coated beads function as microtubuleorganizing centers and enhance RanGTP-induced spindle assembly. *Current Biology*. 15: 2156 - 2163.

Van Damme, D. (2009): Division plane determination during plant somatic cytokinesis. *Current Opinion in Plant Biology*. 12: 745 - 751.

Vaughan, K. T. (2005): TIP maker and TIP marker; EB1 as a master controller of microtubule plus ends. *Journal of Cell Biology*. 171: 197 - 200.

Verhey, K. J., Hammond, J. W. (2009): Traffic control: regulation of kinesin motors. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 10: 765 - 777.

Vos, J. W., Pieuchot, L., Evrard, J. L., Janski, N., Bergdoll, M., de Ronde, D., Perez, L. H., Sardon, T., Vernos, I., Schmit, A. C. (2008): The plant TPX2 protein regulates prospindle assembly before nuclear envelope breakdown. *The Plant Cell*. 20: 1783 - 1797.

Wasteneys, G. O. (2002): Microtubule organization in the green kingdom: Chaos or self-order? *Journal of Cell Science*. 115: 1345 - 1354.

Wennerberg, K., Rossman, K. L., Der, C. J. (2005): The Ras superfamily at a glance. *Journal of Cell Science*. 118: 843 - 846.

Wiese, C., Wilde, A., Moore, M. S., Adam, S. A., Merdes, A., Zheng, Y. (2001): Role of importin- β in coupling Ran to downstream targets in microtubule assembly. *Science* 291: 653 - 656.

Wittmann, T., Boleti, H., Antony, C., Karsenti, E., Vernos, I. (1998): Localization of the kinesin-like protein Xklp2 to spindle poles requires a leucine zipper, a microtubule-associated protein, and dynein. *The Journal of Cell Biology*. 143: 673 - 685.

Wittmann, T., Wilm, M., Karsenti, E., Vernos, I. (2000): TPX2, A novel *Xenopus* MAP involved in spindle pole organization. *The Journal of Cell Biology*. 149: 1405 - 1418.

Zheng, Y., Wong, M. L., Alberts, B., Mitchison, T. (1995): Nucleation of microtubule assembly by a gamma-tubulin-containing ring complex. *Nature*. 378: 578 - 583.

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ADP	Adenzindifosfát
ATP	Adenzintrifosfát
ATPáza	Adenzintrifosfatáza
BSA	Hovězí sérový albumin (Bovine serum albumine)
CAS	S CRISPR asociovaný protein (CRISPR-associated protein)
cDNA	Komplementární DNA
CLASPs	Cytoplasmic linker associated proteins
CRISPR	<i>Clustered regularly-interspaced short palindromic repeats</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-fenylindol
DIC	Nomarského kontrast (Dark interference contrast)
DMSO	Dimetylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
dNTPS	Deoxyribonukleozidtrifosfáty
DTT	Dithiotreitol
EB1	Konec vázající protein 1 (End binding protein 1)
EDTA	Ethylendiaminotetraoctová kyselina (Ethylene diamin tetraacetic acid)
EGTA	Ethylenglycoltetraoctová kyselina (Ethylene glycol tetraacetic acid)
F	Vedoucí (Forward) primer
GDP	Guanozindifosfát
GFP	Zelený fluorescenční protein (Green fluorescent protein)
GIPs	G-protein-coupled receptors-interacting proteins
GTP	Guanozintrifosfát
GTPáza	Guanozin trifosfatáza
IHF	Integrující hostující faktor
LB	Luria-Bertani
LER	<i>Landsberg erecta</i>
MAPs	S mikrotubuly asociované proteiny (Microtubule-associated proteins)
MgSO ₄ .7H ₂ O	Síran hořečnatý - heptahydrát
Mpb	Mega pár bází
MS	Murashige & Skoog

N	Libovolný nukleotid
Na ₂ HPO ₄	Hydrogenfosforečnan disodný
NaCl	Chlorid sodný
NES	Jaderný exportní signál (Nuclear export signal)
NLS	Jaderný lokalizační signál (Nuclear localization signal)
OD	Optická hustota (Odds ratio)
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerázová řetězová reakce (Polymerase chain reaction)
R	Zpětný (Reverse) primer
RanGAP1	Ran GTPase activation protein 1
RCC1	Regulátor kondenzace chromozomů (Regulator of chromosome condensation 1)
RFP	Červený fluorescenční protein (Red fluorescent protein)
TPX2	Targeting protein for Xklp2
TPXL	TPX2-like protein
Xklp2	Xenopus kinesin-like protein 2
YEB	<i>Yeast extract broth</i>