

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Diplomová práce**

**Olomouc 2017**

**Bc. Klára Ptošková**

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Úloha *TPX2-like* proteinů v regulaci Aurora  
kinázy 1 u *Arabidopsis thaliana***

**Diplomová práce**

**Bc. Klára Ptošková**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2017**

**Vedoucí práce: Mgr. Eva Dvořák Tomašíková, Ph.D.**

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Evy Dvořák Tomašíkové, Ph.D. a uvedla jsem veškerou použitou literaturu.

V Olomouci:.....

Podpis:.....

Tímto bych chtěla poděkovat Mgr. Evě Dvořák Tomašíkové, Ph.D. za odborné vedení a pomoc s vypracováním diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Dr. Dmitri Demidovovi za mé vedení na pracovní stáži a taky celé výzkumné skupině Dr. Andree Houbena, ve které jsem měla možnost pracovat.

## SOUHRN

Kritickým krokem v buněčném dělení je správné sestavení dělicího vřeténka, které napomáhá separaci chromozomů do dceřiných buněk. Jedním z regulačních proteinů je i TPX2, jenž ovlivňuje složení dělicího vřeténka a jeho délku u živočichů i rostlin. TPX2 protein navíc reguluje a aktivuje Aurora kinázy. Tyto mitotické kinázy jsou nedílnou součástí buněčného dělení, kde se fosforylací jiných proteinů účastní segregace chromozomů, nukleace mikrotubulů a cytokineze. Mutace TPX2 nebo Aurora kináz vede v buňce k narušení správného mechanismu dělení a může vést i k nádorovému bujení. Na rozdíl od živočišných buněk, které mají pouze jeden gen kódující protein TPX2, genom *Arabidopsis thaliana* kóduje 12 proteinů s podobnou strukturou, tzv. TPX2-like proteinů. Bylo zjištěno, že tyto proteiny obsahují různé kombinace funkčních domén přítomných v kanonickém TPX2, které ovlivňují jejich vlastnosti, a prochází alternativním sestřihem.

Cílem první části této diplomové práce bylo umlčet kanonický TPX2 v rostlinách *A. thaliana* pomocí RNA interference. Tato metoda využívá specifické genové sekvence, které jsou zaklonovány do binárních vektorů a následně transformovány do rostlin s využitím bakterií *Agrobacterium tumefaciens*. Následně byla v rostlinách ověřována přítomnost RNAi konstruktů a exprese TPX2 genu pomocí polymerázové řetězové reakce. V posledním kroku byl ověřován vliv umlčení genu na tvorbu pylových zrn a semen. Expresi TPX2 genu se podařilo snížit ve 12 rostlinách.

V druhé části byla zkoumána lokalizace vybraných TPX2-like proteinů v buňce metodou infiltrace listového mezofylu rostlin *Nicotiana benthamiana* fúzními konstrukty. Stejná metoda byla použita ke studiu možné regulace Aurora kinázy 1 TPX2-like proteiny. Byla sledována kolokalizace vybraných TPX2-like proteinů s Aurora kinázou 1 a proteinem CENH3.

## SUMMARY

A critical step in the cell division is a correct assembly of the mitotic spindle which helps to separate chromosomes into daughter cells. One of the regulatory protein is TPX2 which influences the proper composition and length of the mitotic spindle in animals and plants. Moreover TPX2 protein regulates and activates Aurora kinase family members. These mitotic kinases are an integral part of the cell division where regulate chromosome segregation through phosphorylation of its targets including proteins involved in chromosome segregation, microtubule nucleation and cytokinesis. Mutations of TPX2 or Aurora kinases in the cell leads to disruption of proper mechanisms of the cell division and can lead to tumor growth. In contrast to animal cells which have only one gene encoding a TPX2 protein, *Arabidopsis* genome encodes 12 proteins with similar structure, TPX2-like proteins. TPX2-like proteins comprise different combinations of functional domains that are present in the canonical TPX2, therefore affecting its functional properties. The complexity is further influenced by alternative splicing

The aim of the first part of this thesis was to silence canonical TPX2 in *A. thaliana* plants using RNA interference. This method use specific gene sequences that are cloned into binary vectors and transformed to plants using *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. Subsequently, the presence of RNAi constructs and decreased TPX2 gene expression were checked using polymerase chain reaction. The effect of decreased TPX2 expression was further checked on the formation of pollen grains and seeds. The decreased expression of the TPX2 gene was verified altogether in 12 plants.

In the second part of this thesis, the localization of selected TPX2-like proteins in *Nicotiana benthamiana* plants was studied. *N. benthamiana* leaf mesophyll cell were infiltrated with fusion constructs and localization was studied using confocal microscopy. Moreover, potential link between function of Aurora kinase-1 by TPX2 likes proteins was investigated by its colocalization with Aurora kinase 1 and CENH3.

# OBSAH

<b>1 ÚVOD</b> .....	<b>8</b>
<b>2 CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>9</b>
<b>3 LITERÁRNÍ PŘEHLED</b> .....	<b>10</b>
3.1 TPX2 PROTEIN: STRUKTURA A FUNKCE .....	10
3.1.1 TPX2 v <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	14
3.2 AURORA KINÁZY: TYPY A FUNKCE.....	17
3.2.1 Aurora kinázy v <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	20
<b>4 MATERIÁL A METODY</b> .....	<b>23</b>
4.1 BIOLOGICKÝ MATERIÁL .....	23
4.1.1 Bakterie.....	23
4.1.2 Rostliny.....	23
4.2 VEKTORY .....	23
4.3 OVĚŘENÍ RNAi VEKTORŮ.....	25
4.3.1 PCR reakce a agarózová elektroforéza .....	26
4.3.2 Izolace plazmidu z pozitivních klonů a sekvenování .....	27
4.4 GATEWAY KLONOVÁNÍ .....	27
4.4.1 LR reakce.....	27
4.4.2 Transformace bakterií <i>Escherichia coli</i> .....	28
4.4.3 Ověření bakterií <i>Escherichia coli</i> po transformaci.....	28
4.5 TRANSFORMACE BAKTERIÍ <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i> .....	28
4.6 TRANSFORMACE ROSTLIN <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> .....	29
4.7 OVĚŘENÍ PŘÍTOMNOSTI KONSTRUKTU V F <sub>1</sub> GENERACI ROSTLIN .....	29
4.7.1 Izolace DNA .....	30
4.7.2 Navržení oligomerů, PCR reakce a elektroforéza .....	30
4.8 SLEDOVÁNÍ EXPRESE TPX2 V TRANSFORMOVANÝCH ROSTLINÁCH.....	32
4.8.1 Izolace RNA .....	32
4.8.2 Syntéza cDNA .....	33
4.8.3 RT PCR reakce .....	34
4.9 STANOVENÍ FERTILITY MUTANTŮ .....	34
4.9.1 Alexandrův test.....	34
4.9.2 Odbarvení šešulí .....	34

4.10	PŘÍPRAVA BAKTERIÁLNÍ SUSPENZE PRO INFILTRACI LISTŮ <i>NICOTIANA BENTHAMIANA</i>	35
4.10.1	Transformace bakterií elektroporací.....	35
4.10.2	Izolace plazmidové DNA .....	35
4.10.3	Příprava bakteriální suspenze pro infiltraci .....	35
4.10.4	Infiltrace listů <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	35
4.10.5	Konfokální laserová skenovací mikroskopie.....	36
4.11	SEZNAM POUŽITÝCH ROZTOKŮ A JEJICH SLOŽENÍ.....	36
4.12	SEZNAM POUŽITÝCH PŘÍSTROJŮ .....	38
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>40</b>
5.1	UMLČENÍ KANONICKÉHO TPX2 POMOCÍ RNA INTERFERENCE V <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> A EFEKT NA AKTIVITU AURORA KINÁZY 1 .....	40
5.1.1	Ověření RNAi vektorů.....	40
5.1.2	Gateway klonování .....	41
5.1.2.1	LR reakce a ověření bakterií <i>Escherichia coli</i> po transformaci .....	41
5.1.3	Transformace a ověření bakterií <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	42
5.1.4	Transformace rostlin <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	43
5.1.4.1	Ověření přítomnosti vektoru s inzertem v transformovaných rostlinách ....	43
5.1.5	Ověření exprese TPX2 v transformovaných rostlinách.....	44
5.1.6	Stanovení fertility mutantů .....	46
5.1.6.1	Alexandřův test a odbarvení šešulí mutantů <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	46
5.2.	REGULACE AURORA KINÁZY 1 OSTATNÍMI ČLENY TPX2 GENOVÉ RODINY .....	49
5.2.1	Infiltrace listů <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	49
<b>6</b>	<b>DISKUZE .....</b>	<b>55</b>
<b>7</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>58</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....</b>	<b>59</b>
<b>9</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>61</b>



## 1 Úvod

TPX2 protein (Targeting protein for Xenopus kinezin-like protein 2) je s mikrotubuly asociovaný protein, který v dělicích se buňkách zprostředkovává tvorbu mitotického vřeténka. Během mitózy je uvolňován od svého inhibičního vazebného partnera importinu  $\alpha$  a importinu  $\beta$  díky Ran gradientu. Volný TPX2 aktivuje Aurora kinázu A a stimuluje tvorbu mitotického vřeténka. Aurora kinázy při buněčném dělení zajišťují jeho správné načasování a rozdělení sesterských chromatid k opačným pólům buňky. V genomu *Arabidopsis* byl nalezen homolog Aurora A kinázy - Aurora kináza 1 (Demidov *et al.*, 2005; Kawabe *et al.*, 2005). Homology TPX2 proteinu byly nalezeny v živočišné i rostlinné říši, ale zatímco u člověka je v genomu přítomen pouze jeden gen pro TPX2, rostliny mají několik TPX2-like proteinů původem z různých genů. Tyto proteiny byly doposud však pouze málo prozkoumány.

Cílem této diplomové práce bylo umlčet kanonický TPX2 metodou RNA interference v rostlinách *Arabidopsis thaliana* a sledovat vliv TPX2 a TPX2-like proteinů na Aurora kinázu 1. Výsledky by měly prohloubit znalosti o genové rodině TPX2 v *Arabidopsis*.

## **2 Cíle práce**

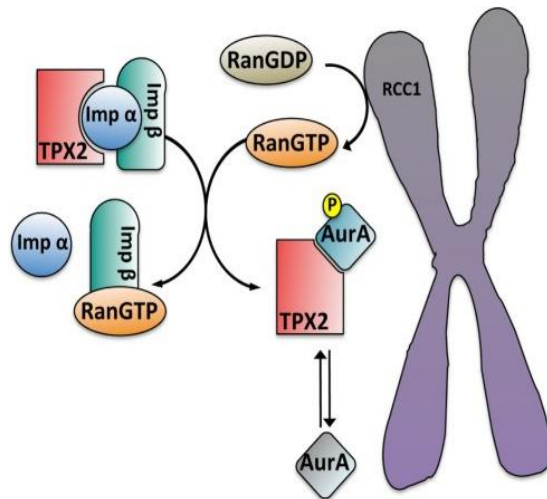
Cílem práce bylo vypracovat literární rešerši na téma TPX2 protein a Aurora kinázy u živočichů a rostlin. Experimentální část byla rozdělena na dva částečně samostatné cíle: 1) umlčení kanonického TPX2 (At1g03780) pomocí RNA interference v rostlinách *Arabidopsis thaliana* a jeho efekt na aktivitu Aurora kinázy, 2) regulace Aurora kinázy 1 ostatními členy TPX2 genové rodiny.

## 3 Literární přehled

### 3.1 TPX2 protein: struktura a funkce

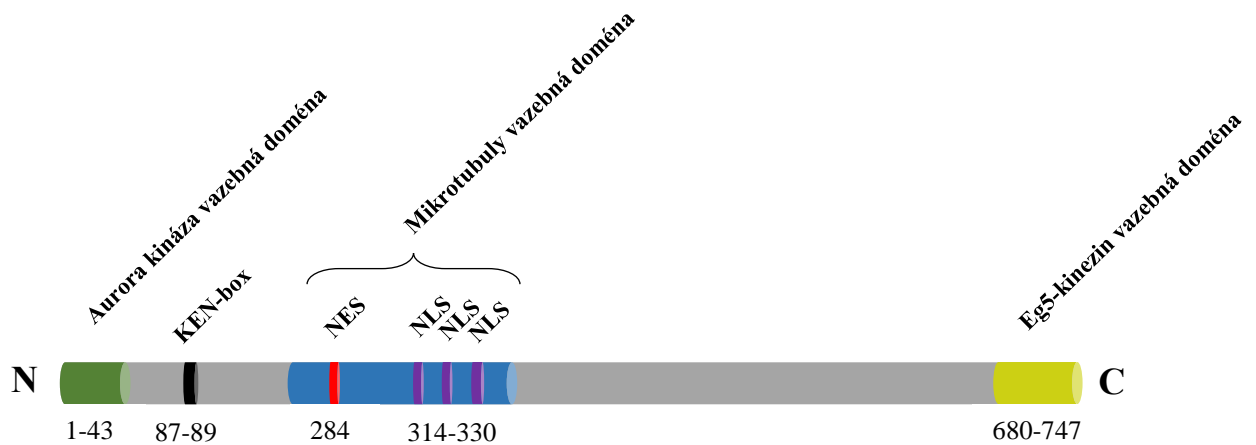
TPX2 protein (Targeting protein for Xenopus kinesin-like protein 2, *X/TPX2*) byl poprvé charakterizován v živočišné říši. Byl objeven v roce 1997 jako 100 kDa velký s mikrotubuly asociovaný protein (MAP) v extraktu vajíček *Xenopus laevis* (Wittmann *et al.*, 1998), jehož funkcí je přichytávání plus orientovaného konce kinezinu Xklp2 k mínus konci mikrotubulů dělicího vřeténka (Wittmann *et al.*, 2000). Xklp2 je motorový protein, který váže mikrotubuly během mitózy (Wittmann *et al.*, 1998). Experimenty s vajíčky *Xenopus* ukázaly, že *X/TPX2* je regulován GTP-vázající formou Ran a spouští lokální nukleaci mikrotubulů mitotického vřeténka okolo chromozomů (Gruss *et al.*, 2001). Později byl popsán i lidský homolog TPX2 (*HsTPX2*) a několik homologů u rostlin.

Doposud byla podrobněji popsána zejména funkce proteinu TPX2 v průběhu mitózy u živočišných buněk. TPX2 zde figuruje jako jeden z tzv. spindle assembly factors (SAFs, faktory ovlivňující tvorbu mitotického vřeténka), které hrají důležitou roli v procesu formace mitotického vřeténka. Během interfáze je TPX2 v cytoplazmě vázán na  $\alpha$  a  $\beta$  importin. Vazba na importin blokuje jeho aktivitu a zabraňuje mu interakci s mikrotubuly (Kahana *et al.*, 2001). V interfázi je v jádře buňky vyšší koncentrace RanGTP, která je zajištěna přeměnou RanGDP pomocí Ran výměnného faktoru RCC1 (Regulator of chromosome condensation 1, regulátor kondenzace chromozomů 1). V cytoplazmě je naopak vyšší koncentrace RanGDP zajišťována proteinem RanGAP (GTPázy aktivující protein). Tento proces vede ke gradientu RanGTP (Petry, 2016). Komplex importinů s TPX2 je přemístěn do jádra, ve kterém se RanGTP postupně naváží na  $\alpha$  a  $\beta$  importin a uvolní TPX2 protein (Gruss *et al.*, 2004). Volný TPX2 váže a aktivuje Auroru A, která se autofosforyluje, což vyvolává fosforylaci dalších substrátů, nukleaci a organizaci mikrotubulů (Garrido *et al.*, 2016) (Obrázek 1). Po rozpadu jaderné membrány během mitózy TPX2 nukleuje mikrotubuly v těsné blízkosti chromozomů nezávisle na centromerách a stimuluje chromatinem indukované složení mitotického vřeténka. V pozdní anafázi je TPX2 kompletně degradován (Whittman *et al.*, 2000).



**Obrázek 1:** Schematické znázornění interakce mezi proteinem TPX2 a kinázou Aurora A. Ran výměnný faktor RCC1 spojený s chromozomy vytváří RanGTP, které uvolňuje TPX2 z importinového komplexu. TPX2 se poté může vázat na Auroru A (Aur A), podporovat její autofosforylaci a aktivaci (převzato od Garrido *et Vernos*, 2016).

Primární struktura TPX2 je konzervovaná napříč obratlovci a vyššími rostlinami. Byly popsány 3 funkční domény a několik regulačních sekvencí (Obrázek 2). První z nich je nejlépe charakterizovaná doména interagující s Aurora A kinázou (Aurora kináza vazebná doména), která se nachází na N-terminálním konci proteinu (Bayliss *et al.*, 2003). Aktivace kinázy je vyžadována pro správnou lokalizaci mitotického vřeténka, což bylo potvrzeno v experimentech s lidskými buňkami (Kufer *et al.*, 2003) a *Caenorhabditis elegans* (Ozlu *et al.*, 2005). Mikrotubuly vazebná doména je zapojena ve vazbě mikrotubulů (Brunet *et al.*, 2004). Vysoká afinita TPX2 k mikrotubulům vyplývá z jeho rolí v buňce, mezi které patří sestavení mikrotubulů blízko kinetochorů (Tulu *et al.*, 2006) a jejich větvení v dělicím vřeténku (Petry *et al.*, 2013). Příčinou těchto dynamických interakcí by mohla být jeho fosforylace a interakce s dalšími vazebnými partnery jako je dynein (Balchand *et al.*, 2015). Eg5-kinezin vazebná doména je nezbytná pro segregaci vřeténka k pólům (Kahn *et al.*, 2015). Jaderný lokalizační signál (nuclear localization signal, NLS) je sekvence aminokyselin zodpovědná za vazbu  $\alpha$  importinu a transport do jádra (Gruss *et Vernos*, 2004). Naopak sekvence jaderného exportního signálu (nuclear export signal, NES) zajišťuje export proteinu z jádra (O'Brien *et Wiese*, 2006). V regulační funkci a degradačním procesu TPX2 během anafáze je zapojen KEN-box (Stewart *et Fang*, 2005a). Podle Sanchez-Pulido *et al.* (2016) je C-terminální doména tvořena  $\alpha$ -helikálními tandemovými repeticemi pokrývajícími 2/3 proteinu. Předpokládá se, že tato oblast formuje flexibilní solenoid zapojený v protein-proteinových interakcích.



**Obrázek 2:** Schématické zobrazení domén a regulačních sekvencí lidského TPX2 proteinu (upraveno dle Brunet *et al.*, 2004)

*Hs*TPX2 má na N-konci Aurora kináza vazebnou doménu (zeleně), která váže Aurora A kinázu, na C-konci má Eg5-kinezin vazebnou doménu (žlutě), která váže Eg-5 kinezin. Mikrotubuly vazebná doména (modře) umožňuje interakce s mikrotubuly. Za degradaci proteinu je zodpovědný KEN-box (černě). Tři NLS sekvence (fialově) váží  $\alpha$  importin a umožňují import proteinu do jádra, naopak NES sekvence (červeně) umožňuje export z jádra do cytoplazmy.

Od prvního objevu (Wittmann *et al.*, 1998) bylo popsáno několik ortologů TPX2 v různých organismech. Někteří z nich jsou jmenováni v Tabulce 1. U člověka je TPX2 prepisován z genu, který má nejméně 18 sestříhových variant a jeho nejdelší varianta obsahuje 783 aminokyselin (Thierry-Mieg *et* Thierry-Mieg, 2006). Zdá se, že klíčové funkce proteinu jsou široce konzervovány, ale v závislosti na organismu mohou být funkční moduly součástí více proteinů, případně může odlišný protein vykonávat některé funkce TPX2 (Wadsworth, 2015).

**Tabulka 1:** Ortology TPX2 proteinu a jejich struktura

Organismus	Ortolog	Strukturní domény
<i>Caenorhabditis elegans</i>	TPXL-1	pouze Aurora kináza vazebná doména (Ozlu <i>et al.</i> , 2005)
<i>Drosophila melanogaster</i> ( <i>Mei-38/Ssp1</i> )	TPXL-2	pouze mikrotubuly vazebná doména (Goshima, 2011)

**Tabulka 1:** Ortology TPX2 proteinu a jejich struktura (pokračování)

Organismus	Ortolog	Strukturní domény
<i>Homo sapiens</i>	<i>HsTPX2</i>	3 NLS Aurora kináza vazebná doména Mikrotubuly vazebná doména Eg5-kinezin vazebná doména (Ma <i>et al.</i> , 2011)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>AfTPX2</i>	2 NLS 2 Aurora kináza vazebné domény Eg5-kinezin vazebná doména (Vos <i>et al.</i> , 2008)
<i>Populus tremula</i>	<i>PttMAP20</i>	Mikrotubuly vazebná doména Eg5-kinezin vazebná doména (Rajangam <i>et al.</i> , 2008)

TPX2 má jako s mikrotubuly asociovaný protein celou řadu funkcí, které lze vysvětlit přítomností funkčních domén popsaných výše:

- 1) slouží jako aktivátor a stabilizátor kinázy Aurory A (Eyers *et al.*, 2003; Bayliss *et al.* 2004; Anderson *et al.*, 2007; Giubettini *et al.*, 2011; Zorba *et al.*, 2014)
- 2) působí jako regulátor činnosti Eg5-kinezinu (Kahn *et al.*, 2015)
- 3) podílí se na zpětném sestavení jádra v dceřiných buňkách po buněčném dělení (O'Brien *et Wiese*, 2006)
- 4) slouží jako koaktivátor CPC (Chromosome passenger complex) (Iyer *et Tsai*, 2012)
- 5) reguluje délku mitotického vřeténka a distribuci mikrotubulů (Helmke *et Heald*, 2014).

Stejně jako mnoho jiných proteinů, které kontrolují mitózu je i TPX2 nadměrně exprimován u většiny typů rakovinných buněk, což koreluje se špatnou prognózou pacientů (Wadsworth, 2015), a může tak sloužit jako rakovinný marker. TPX2 je nezbytný pro udržení stability genomu a mírné změny v jeho expresi mohou podpořit rozvoj tumoru *in vivo* (Aguirre-Portolés *et al.*, 2012). Zvýšená exprese tohoto proteinu vede k blokaci tvorby vřeténka, udržování buněk v prometafázi a způsobuje vady při tvorbě vřeténka (Gruss *et al.*, 2002; Stewart *et Fang*, 2005b). Důležitost TPX2 dokazují studie, ve kterých nedostatek proteinu způsobil vznik aberantního dělicího vřeténka a missegregaci mikrotubulů (Garrett *et al.*, 2002; Gruss *et al.*, 2002; Aguirre-Portolés *et al.*, 2012). Ačkoliv

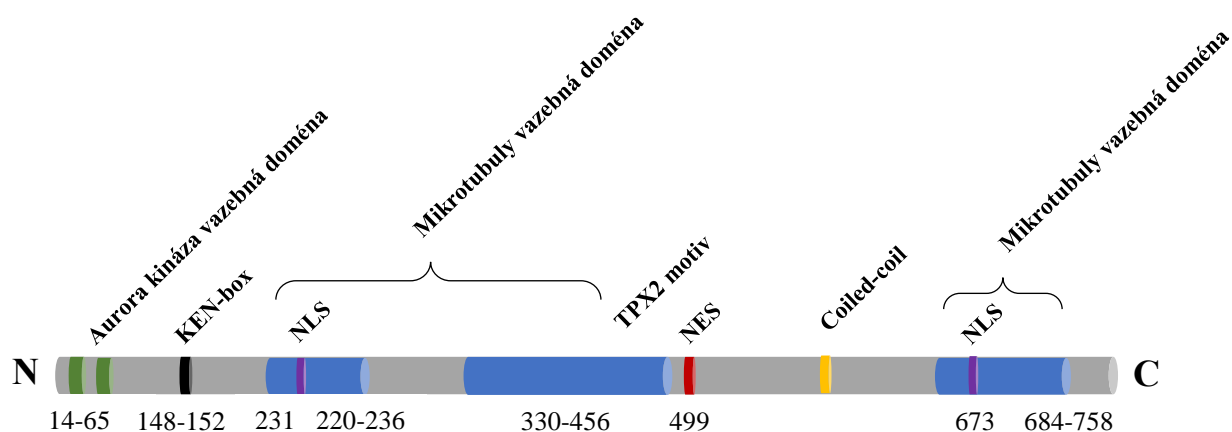
je význam tohoto proteinu spojen s buněčným dělením, nedávné studie se soustředí na TPX2 v nemitotických buňkách (Wadsworth, 2015). Například bylo zjištěno, že během interfáze má TPX2 v jádře pravděpodobně alternativní funkci v odpovědi na poškození DNA (Neumayer *et al.*, 2012).

### 3.1.1 TPX2 v *Arabidopsis thaliana*

V genomu *Arabidopsis thaliana* byl identifikován homolog proteinu TPX2 nazvaný *AtTPX2* (Vos *et al.*, 2008). Sekvence genu je dlouhá 790 aminokyselin a nachází se na prvním chromozomu (Lamesch *et al.*, 2012). Podobně jako u živočichů patří i u rostlin TPX2 ke skupině regulátorů buněčného cyklu a je to s mikrotubuly asociovaný protein (Vos *et al.*, 2008). Funkční analýza ukázala, že *AtTPX2* hraje důležitou roli v dělení rostlinných buněk (Vos *et al.*, 2008). Vyšší rostliny jsou charakterizovány acentrosomálním vřeténkem. „Provřetenko“ se formuje už před rozpadem jaderného obalu (Schmit *et al.*, 1985). *AtTPX2* se během interfáze nachází v jádře a je z něj exportován díky aktivitě jaderného exportního signálu (NES) na přechodu fází G2/M, aby inicioval složení vřeténka (Vos *et al.*, 2008). V počáteční fázi mitózy RanGTP uvolní TPX2 od jeho vazebného partnera importinu  $\beta$ , dochází k interakci *AtTPX2* s Aurora kinázami a mikrotubuly, stavbě bipolárního vřeténka a kontrole buněčného dělení (Petrovská *et al.*, 2013). Protein je kompletně degradován na konci anafáze (Vos *et al.*, 2008).

*AtTPX2* sdílí funkční domény s jeho živočišným protějškem (Vos *et al.*, 2008). Ve své struktuře obsahuje dvě Aurora kináza vazebné domény, dvě mikrotubuly vazebné domény, dva motivy jaderného lokalizačního signálu (NLS) a jeden motiv jaderného exportního signálu (NES) (Obrázek 3). Deleční analýza prokázala, že protein postrádající oba NLS motivy je cytoplazmatický a váže kortikální mikrotubuly během interfáze (Vos *et al.*, 2008). Srovnání peptidových sekvencí *AtTPX2* vedlo k objevu specifického zdvojeného TPX2 motivu udržovaného u eukaryot. Tento motiv je dlouhý 26 a 28 aminokyselin a byl nalezena v 17 analyzovaných rostlinných sekvencích (např. mech *Physcomitrella patens*, cykas *Zamia fischeri*, jednoděložné *Oryza sativa*, dvouděložné *Vitis vinifera*). U *Arabidopsis* se obě sekvence nachází uprostřed proteinu (aminokyseliny 330-356 a 430-456). TPX2/importin motiv je zodpovědný za vazbu  $\beta$  importinu a TPX2/Xklp2 motiv za vazbu Xklp2 proteinu (Vos *et al.*, 2008). Tzv. coiled-coil doména se podílí na oligomerizaci a proteinových interakcích (Burkhard *et al.*, 2001). N-koncová doména umožňuje *AtTPX2* vázat *AtAurora1* - homolog Aurora kinázy A v *Arabidopsis* (Petrovská *et al.*, 2013; Tomašítková *et al.*, 2015) a regulovat tvorbu vřeténka,

zatímco C-koncová doména váže mikrotubuly a ovlivňuje buněčné dělení (Vos *et al.*, 2008). *AtTPX2* reguluje aktivitu *AtAurora1* nejen cílením kinázy k mitotickému vřeténku (Petrovská *et al.*, 2012), ale zejména její aktivací. Vazba proteinu TPX2 mění konformaci kinázy, která se autofosforyluje a vede ke zvýšené fosforylaci histonu H3. Aktivace *AtAurora1* pomocí *AtTPX2* by mohl být mechanismus vedoucí k translaci RanGTP signalizace pro fosforylační kaskády prováděné Aurora kinázou na kinetochorech (Tomašítková *et al.*, 2015).



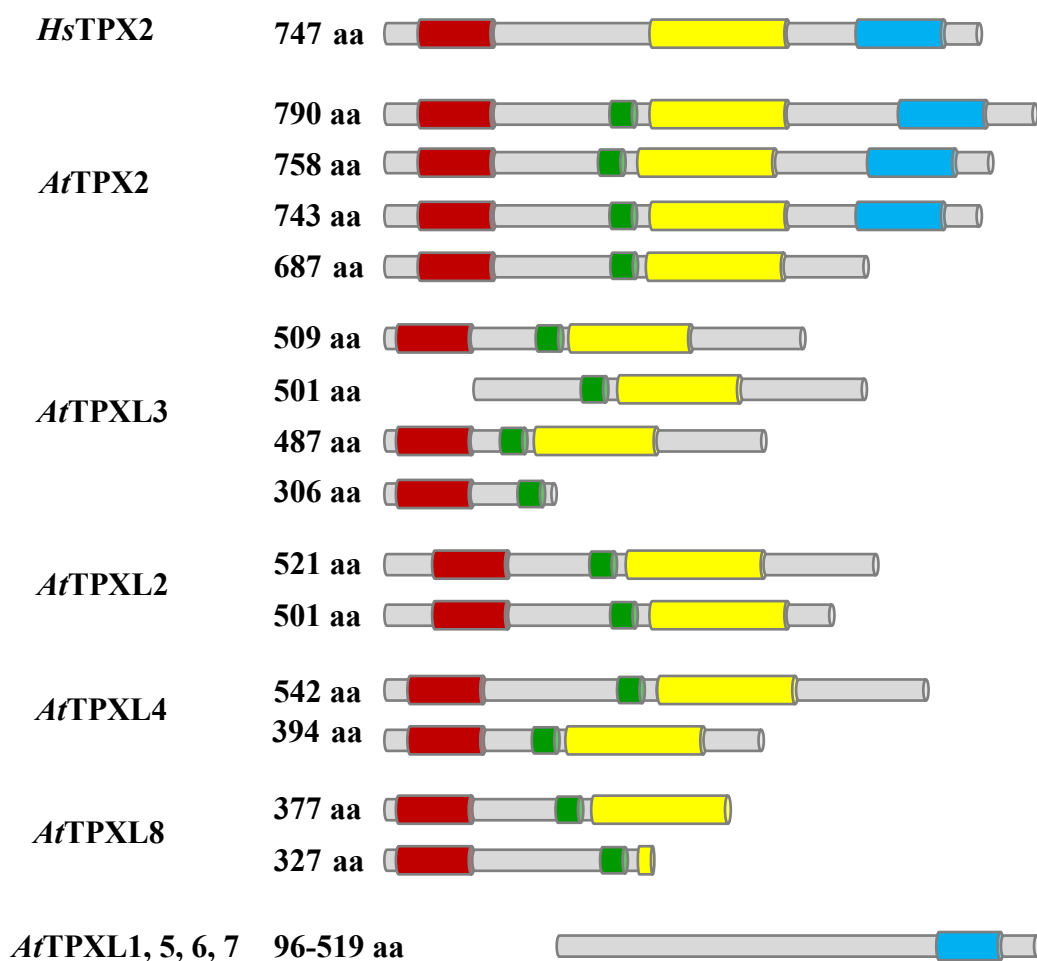
**Obrázek 3:** Schématické zobrazení domén a regulačních sekvencí TPX2 v *Arabidopsis thaliana* (upraveno dle Vos *et al.*, 2008; Petrovská *et al.*, 2013)

*AtTPX2* má dvě Aurora kináza vazebné domény (zeleně) nacházející se na N-konci proteinu, které váží Aurora kinázy. Dvě NLS sekvence (fialově) v mikrotubuly vazebných doménách (modře) jsou zodpovědné za transport proteinu do jádra. TPX2 motiv váže  $\beta$  importin a Xklp2 protein. Ken-box (černě) slouží k degradaci proteinu.

Na rozdíl od živočichů, kde je přítomen pouze jeden gen kódující protein TPX2, rostlinné genomy kódují celou rodinu TPX2 proteinů. Du *et al.* (2016) na základě přítomnosti TPX2/Xklp2 motivu identifikoval 12 členů této proteinové rodiny. Důkladnější bioinformatická analýza však prokázala přítomnost 20 TPX2-like proteinů (Tomašítková, nepublikovaná data). U *Arabidopsis thaliana* pět z nich (*AtTPX2*, *AtTPXL2*, *AtTPXL3*, *AtTPXL4*, *AtTPXL8*) obsahuje vazebnou doménu pro Aurora kinázu. Přítomnost nebo nepřítomnost strukturních domén je ovlivněna také alternativním sestřihem, kterému podléhají některé z proteinů (Tomašítková *et al.*, 2015). Obrázek 4 ukazuje jednotlivé sestřihové varianty TPXL (TPX2-like) proteinů *Arabidopsis* s vyznačením strukturních domén. Pro porovnání je vyobrazena i hlavní sestřihová varianta lidského TPX2 (*HsTPX2*). Varianty proteinu bez Aurora kináza vazebné domény by mohly být zapojeny ve formaci



komplexu TPX2-tubulin, který je nezávislý na fosforylaci Aurora kinázou. Na druhou stranu proteinové varianty s Aurora kináza vazebnou doménou, ale bez TPX2 motivu by mohly být zapojeny pouze v aktivaci Aurora kinázy a nejsou potřebné pro lokalizaci na mikrotubulech (Tomašítková *et al.*, 2015). Tato data napovídají, že TPX2 varianty jsou fyziologicky důležité pro funkci mikrotubulů vřeténka při buněčném dělení (Tsai *et al.*, 2005) a rovněž mají i další funkce (Tomašítková *et al.*, 2015).



**Obrázek 4:** Schématické zobrazení sestříhových variant TPX2-like proteinů v porovnání s *HsTPX2* (převzato od Demidov)

Červeně je zobrazena Aurora kináza vazebná doména, zeleně mikrotubuly vazebná doména, žlutě TPX2 motiv a modře Eg5-kinezin vazebná doména. *AtTPX2* a *AtTPXL3* mají čtyři sestříhové varianty lišící se svou velikostí a obsahem jednotlivých domén. *AtTPXL2*, *AtTPXL4* a *AtTPXL8* mají dvě sestříhové varianty. Proteiny *AtTPXL1*, *AtTPXL5*, *AtTPXL6* a *AtTPXL7* neobsahují Aurora kináza vazebnou doménu, pouze Eg5-kinezin vazebnou doménu.

### 3.2 Aurora kinázy: typy a funkce

Aurora kinázy jsou rodina serin/threoninových kináz s vysoce konzervovanou C- koncovou částí, které se účastní různých procesů v buněčném cyklu. Hrají ústřední roli ve vytváření bipolárního dělicího vřetenka, segregaci chromozomů a cytokinezi u kvasinek (Beggins *et al.*, 1999; Kotwaliwale *et al.*, 2007; Meyer *et al.*, 2015), rostlin (Demidov *et al.*, 2005; Kurihara *et al.*, 2006) i zvířat (Rogers *et al.*, 2002; Gang *et al.*, 2017). Glover *et al.* (1995) jako první potvrdil důležitost Aurora kináz u *Drosophila melanogaster*, kde mutantní alely způsobovaly vznik monopolárního vřetenka. Ortology Aurora kináz byly následně objeveny v lidských buňkách (Kimura *et al.*, 1997; Kimura *et al.*, 1998) a v dalších modelových organismech jako je *Caenorhabditis elegans* (Schumacher *et al.*, 1998) nebo *Xenopus laevis* (Giet *et al.*, 1999). Počet paralogů Aurora kináz v genomu se liší mezi organismy. Kvasinky mají pouze jeden gen pro Aurora kinázu, zatímco zvířata mají stejně jako rostliny dva až tři geny (Kawabe *et al.*, 2005).

Vysoká rozdílnost N- koncových částí umožňuje Aurora kinázám interagovat s různými proteinovými komplexy, což zapříčiňuje jejich různou funkci a lokalizaci v buňce (Hochegger *et al.*, 2013). Na základě toho byly Aurora kinázy rozděleny do tří skupin: Aurora A, B a C (Tabulka 2). Ve většině eukaryot od kvasinky až po člověka je aktivita Aurora kináz vyžadována na pólu dělicího vřetenka i na kinetochoru chromozomů. Tyto aktivity jsou rozděleny mezi dva různé paralogy: Auroru A a Auroru B. Dvojitá deaktivace obou Aurora kináz vede k narušení segregace chromozomů, což naznačuje, že tyto dvě činnosti spolu při mitóze koordinují (Hochegger *et al.*, 2013). Obě kinázy, Aurora A i B, interagují s N-koncovou částí histonu H3 a fosforylují serin 10 (Ser-10) a to jak *in vivo*, tak *in vitro*. V průběhu mitózy je histon H3 fosforylován nejméně na dvou zbytcích v pozici Ser-10 (Gurley *et al.*, 1978; Wei *et al.*, 1998) a Ser-28 (Goto *et al.*, 1999). Fosforylace Ser-10 histonu H3 je považována za klíčovou událost pro nástup mitózy v buňce. Tato epigenetická modifikace se u živočišných buněk objevuje v rané G2 fázi v rámci pericentromerického chromatinu a šíří se dál jako mitotická kondenzace chromozomů (Crosio *et al.*, 2002). Další experimenty však naznačily, že fosforylace by mohla být použita k označení chromozomů jako signál pro přechod buňky z metafáze do telofáze (Prigent *et al.*, 2003). Třetí člen kinázové rodiny - Aurora C byl popsán pouze v savčích buňkách (Carmena *et al.*, 2003). Rodina Aurora kináz u člověka obsahuje všechny tři zástupce, přičemž funkce Aurora kinázy A a B jsou velmi dobře popsány (přehledně zpracováno v Kufer *et al.*, 2003; Krenn *et al.*, 2015; Alfonso

*et al.*, 2016), na rozdíl od funkce Aurory C, která je důležitá hlavně v meiotických buňkách, spermích a oocytech.

Lidské Aurora kinázy mají tři domény. N-terminální doména obsahuje D-box a A-box, které jsou zodpovědné za ubikvitin-dependentní degradaci kinázy (Nguyen *et al.*, 2005) a KEN-box, který slouží hlavně k regulaci a částečně se podílí na degradaci (Pfleger *et Kirschner*, 2000). Protein-kinázová doména obsahuje aktivační smyčku, která reguluje aktivaci kinázy fosforylací aminokyseliny threoninu (Aurora A-Thr288, Aurora B-Thr232, Aurora C-Thr195) (Bayliss *et al.*, 2012). C-koncová doména obsahuje další D-box (Castro *et al.*, 2002).

**Tabulka 2:** Srovnání Aurora kináz na základě fosforylace substrátů, lokalizace a funkce (upraveno dle Bolanos-Garcia, 2005)

<b>Protein</b>	<b>Substrát</b>	<b>Buněčná lokalizace</b>	<b>Funkce</b>
Aurora A	TPX2, PP1, p53, Cdh1, Ajuba	centrozomy, mitotické vřeténko	maturace a separace centrozomů, složení vřeténka
Aurora B	Histon H3, INCENP, survivin	centrozom dělicího vřeténka, chromozomová ramena, centromery	segregace chromozomů, cytokineze, dynamika mikrotubulů
Aurora C	Aurora B, INCENP	dělicí vřeténko, chromozomová ramena	spermatogeneze, cytokineze

Aurora A je centrozomální kináza, která hraje důležitou roli během G2/M fáze a je regulována autofosforylací v závislosti na buněčném cyklu (Bay *et al.*, 2015). Po aktivaci kináza fosforyluje mnoho substrátů jako jsou Cdc25B, histon H3 a Lats2, čímž umožňuje buňce postup fázemi mitózy (Sakai *et al.*, 2002; Barros *et al.*, 2005). Autofosforylace Aurory A je regulována proteiny TPX2, Ajuba, HER1 atd. (Bayliss *et al.*, 2003; Hirota *et al.*, 2003; Kufer *et al.*, 2003). TPX2 je dobře charakterizovaný regulátor této kinázy (Kufer *et al.*, 2003), která po jeho vazbě mění svou konformaci. Fosforylovaná aktivační doména přijímá kompaktnější pozici, která umožňuje vazbu substrátu a blokuje aktivační autofosforylační doménu před defosforylací Protein fosfatázou 1 (PP1) (Bayliss *et al.*, 2003). Aktivovaná kináza je nezbytná pro tvorbu mitotického vřeténka stimulovanou Ran proteiny (Tsai *et Zheng*, 2005) a podporuje maturaci komponentů centrozomu jejich fosforylací (Bai *et al.*, 2014). Mezi další funkce patří zajištění správného spojení kinetochorů

s mikrotubuly (Monda *et al.*, 2015) a pomoc při separaci chromozomů fosforylací kinezinu Eg5 (Smith *et al.*, 2011). Aurora A je taky klíčovou regulační složkou dráhy proteinu p53, jejíž narušení vede k nádorové transformaci (Katayama *et al.*, 2004). Společným znakem mutací Aurory A u octomilek jsou defekty v separaci centrozomů (Glover *et al.*, 1995), což vedlo k názoru, že je hlavní hnací silou pro jejich oddělení. Nicméně u savců má inaktivace Aurory A za následek pouze mírné zvýšení tvorby monopolárních vřetének v důsledku nesprávného oddělení centrozomů (Hoar *et al.*, 2007; De Luca *et al.*, 2008). Nadměrná exprese Aurora A kinázy způsobuje rezistenci k apoptóze v liniích nádorových lidských buněk (Anand *et al.*, 2003).

Aurora B je významně zapojena do segregace chromozomů a cytokineze. Její kinázová aktivita je nutná pro kondenzaci a bipolární orientaci chromozomů (Dewar *et al.*, 2004). Aurora B je regulována prostřednictvím interakce se třemi neenzymatickými proteiny: INCENP (inner centromere protein, vnitřní protein centromery), Borealin a Survivin, které se také podílejí na její lokalizaci (Jeyaprakash *et al.*, 2007). Společně s těmito proteiny tvoří v buňce tzv. chromosome passenger complex (CPC). Lokalizace CPC během mitózy je velmi dynamická. Nejdříve se objevuje podél chromozomových ramen, od profáze do metafáze je lokalizován na vnitřní centromeře, poté se až do konce cytokineze nachází na dělicím vřeténku (Adams *et al.*, 2001). CPC zajišťuje klíčové funkce pro přesný průběh mitózy, jako je aktivace kontrolního bodu tvorby vřeténka (SAC, spindle assembly checkpoint) pouze pokud jsou všechny chromozomy biorientovány a tvorba kontraktálního prstence při cytokinezi (Carmena *et al.*, 2012). Aurora B podporuje kondenzaci mitotických chromozomů fosforylací histonu H3 na Ser-10 a Ser-28 (Goto *et al.*, 2002; Johansen *et al.*, 2006) a kontroluje kohezi sesterských chromatid (Carmena *et al.*, 2009). Nadměrná exprese Aurory B způsobuje vady v mitotické mašinérii včetně ztráty připevnění kinetochoru na mikrotubuly a ukončení mitózy bez průběhu anafáze a cytokineze (Murata-Hori *et al.*, 2002).

Nejméně prozkoumaným zástupcem z rodiny těchto kináz je Aurora C, zejména kvůli její aktivitě v meiotických buňkách. Poprvé byla identifikována v myších spermích a oocytech (Tseng *et al.*, 1998). Ve většině somatických tkání je její exprese úplně potlačena nebo výrazně snížena. Zvýšená exprese doprovází časný embryonální vývoj a nádorovou transformaci. Mírná exprese Aurory C v somatických buňkách při mitóze slouží jako katalytická složka CPC společně s Aurorou B (Sasai *et al.*, 2016). Naopak vysoce je kináza exprimována v savčích varlatech, kde je spojena se spermatogenezí (Fellmeth *et al.*, 2015). U lidí má delece jednoho nukleotidu v genu Aurora kinázy C za následek tvorbu

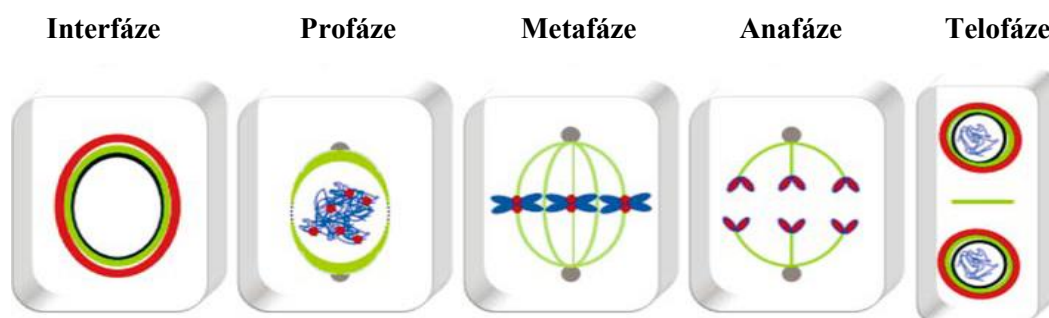
polyploidních spermií a mužskou neplodnost (Dieterich *et al.*, 2007). Aurora C interaguje s proteinem INCENP na karboxylovém konci, což vede k její aktivaci a autofosforylaci (Li *et al.*, 2004). Dále je schopná fosforylovat protein CENH3 (centromerický histon H3) v mitotických buňkách, což je vyžadováno pro rekrutování kinetochorových proteinů a segregaci chromozomů (Slattery *et al.*, 2008). V savčích buňkách se při mitotickém dělení nachází nejdříve na centroměře, potom se přesunuje do středu buněk, kde kooperuje s Aurorou B a reguluje segregaci chromozomů a cytokinezi (Bolanos-Garcia, 2005). Delece Aurory C v myším genomu vede k produkci velkých polyploidních oocytů, což svědčí o její funkci v cytokinezi při meióze (Yang *et al.*, 2010). Nadměrná exprese v myších fibroblastech vyvolává abnormální dělení a vede ke vzniku nádorů (Khan *et al.*, 2011).

### 3.2.1 Aurora kinázy v *Arabidopsis thaliana*

U *Arabidopsis thaliana* byly identifikovány 3 Aurora kinázy: *AtAurora1*, *AtAurora2*, *AtAurora3* (Demidov *et al.*, 2005; Kawabe *et al.*, 2005). Rostlinné Aurora kinázy sdílí 60% identitu s živočišnými a kvasinkovými homology (Kawabe *et al.*, 2015), nicméně evoluční analýza ukázala, že jsou jasně odděleny od Aurora kináz živočichů a hub. V živočišných buňkách je správná lokalizace místa buněčného dělení dána umístěním CPC. Bylo však zjištěno, že i přes absenci homologu CPC a centrozomů v rostlinách, jsou zde Aurora kinázy zapojeny do regulace buněčného dělení (Petrovská *et al.*, 2012). Vzhledem k obtížné klasifikaci rostlinných Aurora kináz mezi ty živočišné, rostlinné zástupce dělíme do dvou podskupin. Podskupina  $\alpha$  obsahuje kinázy *AtAurora1* a *AtAurora2*, které asociují s dělicím vřeténkem a buněčnou deskou a jsou zapojeny do řízení buněčného dělení při vývoji rostlin. Podskupina  $\beta$  obsahuje kinázu *AtAurora3* lokalizovanou na centromerách, která je pravděpodobně zapojena v separaci chromozomů (Boruc *et al.*, 2016). Všechny *AtAurora* kinázy sdílí stejnou strukturu s kinázovou doménou lemovanou krátkou C-terminální a N-terminální doménou o různé délce. D-box umístěný v kinázové doméně slouží k degradaci proteinu. Kinázová doména je vysoce konzervovaná u všech tří kináz (Demidov *et al.*, 2005).

Transkripty a proteiny Aurora kináz *A. thaliana* jsou nejvíce zastoupeny v tkáních obsahujících dělicí se buňky jako jsou kořeny, květní pupeny a květy (Demidov *et al.*, 2005). Během interfáze jsou všechny Aurora kinázy lokalizovány v jádře. V průběhu mitózy vykazují *AtAurora1* a *AtAurora2* ( $\alpha$  Aurora kinázy) dynamickou relokaci podobně jako Aurora B u živočichů (Obrázek 5) (Weimer *et al.*, 2015). V pozdní profázi jsou přesunuty z jaderné membrány směrem k pólům tvořícího se dělicího vřeténka (Demidov *et al.*, 2005;

Kawabe *et al.*, 2005). Jejich lokalizace je stejná jako lokalizace  $\gamma$ -tubulinu a je proto předpokládáno, že se podílejí na stabilizaci mikrotubulů (Demidov *et al.*, 2005; Petrovská *et al.*, 2012). *AtAurora1* a *AtAurora2* asociují se specifickými cytoskeletálními strukturami rostlin (preprofázový svazek, fragmoplast, buněčná deska), které jsou důležité pro vytvoření nové buněčné stěny mezi dělicími se sesterskými jádry (Demidov *et al.*, 2005). *AtAurora1* značí kinetochorové mikrotubuly stejně jako Aurora A u savců, zatímco její cílení na buněčnou desku se podobá vlastnosti Aurory B v místě dělicí rýhy (Weimer *et al.*, 2015). Do konce anafáze zůstávají  $\alpha$  Aurora kinázy lokalizovány na pólech vřeténka a během telofáze se koncentrují v regionu buněčné desky (Demidov *et al.*, 2005). Na rozdíl od toho *AtAurora3* ( $\beta$  Aurora kináza) se v profázi lokalizuje kolem jadérka a v jaderné periférii. Poté až do konce anafáze vykazuje nejsilnější koncentraci v centromerickém regionu (Obrázek 5) (Demidov *et al.*, 2005). Lokalizace *AtAurora3* na centromerách během metafáze (Demidov *et al.*, 2005) naznačuje, že pravděpodobně hraje roli v separaci chromozomů (Weimer *et al.*, 2015). V interfázi je *AtAurora3* přítomna na chromocentrech a v nukleoplazmě jader v meristému.



**Obrázek 5:** Dynamika rostlinných Aurora kináz v průběhu mitózy

*AtAurora1* (červeně) lokalizuje podél mikrotubulů mitotického vřeténka a na buněčné desce. *AtAurora3* (zeleně) lokalizuje v pericentromerických oblastech mitotických chromozomů od profáze do metafáze. V anafázi je *AtAurora3* rozložena po celých sesterských chromatidách (upraveno dle Kawabe *et al.*, 2005).

Důležitým substrátem Aurora kináz u živočichů i rostlin je histon H3. Pomocí western blottingu byla dokázána fosforylace Ser-10 histonu H3 všemi třemi Aurora kinázami v *Arabidopsis in vitro* (Kawabe *et al.*, 2005). Dále bylo zjištěno, že *AtAurora1* stejně jako Aurora A u živočichů, interaguje s TPX2, který slouží jako aktivátor kinázy (Tomašítková *et al.*, 2015). *AtAurora1* a *AtTPX2* kolokalizují na mikrotubulech od předprofáze až do brzké telofáze (Petrovská *et al.*, 2012). Protein *AtTPX2* je nejen substrátem, ale jeví se také jako důležitý regulátor kinázové aktivity při cílení *AtAurora1* k mitotickému vřeténku a při zvyšování autofosforylační aktivity kinázy. Nicméně bylo zjištěno, že i *AtAurora3* je schopná fosforylovat *AtTPX2* (Tomašítková *et al.*, 2015). Genom *Arabidopsis* kóduje další čtyři TPX2-like proteiny, které mají Aurora kináza vazebnou doménu (Tomašítková *et al.*, 2015). Vzhledem k tomu, že takto široká rodina TPX2-like proteinů byla popsána pouze u rostlin, lze spekulovat, že rozšíření této rodiny v rostlinných genomech koreluje s přítomností acentrozomálního bipolárního dělicího vřeténka (Weimer *et al.*, 2015). Zvýšením aktivity *AtAurora1* můžeme dosáhnout fosforylace různých dalších cílů, jako jsou histony nebo SAFs (Tomašítková *et al.*, 2015). Předpokládá se, že aktivní *AtTPX2* může spolupracovat s  $\gamma$ -tubulinovým komplexem a dalšími substráty, např. s mikrotubulárním crosslinkerem MAP65-4 nebo mikrotubulárními motory, v časoprostorové regulaci tvorby dělicího vřeténka (Petrovská *et al.*, 2012; Boruc *et al.*, 2017). Spojení *AtTPX2* s Aurora kinázou 1 může TPX2 protein chránit před jeho degradací (Petrovská *et al.*, 2012) stejně, jako to bylo popsáno i u spojení TPX2 s Aurorou A u živočišných buněk (Steward *et al.*, 2005b).

*AtAurora* kinázy jsou nedílnou součástí regulace signalizace pro správnou funkci meristémů, diferenciaci a vstupu do endoreduplikace (Petrovská *et al.*, 2012). Změna exprese Aurora kináz v rostlinách má za následek snížení meiotického dělení nebo tvorbu aneuploidního či polyploidního potomstva (Demidov *et al.*, 2014). Overexprese *AtAurora3* indukuje abnormality v mitotickém vřeténku (Kawabe *et al.*, 2005). Aurora kinázy v rostlinách jsou zatím málo prozkoumány, o čemž svědčí fakt, že jako jejich substráty byly popsány pouze histon H3 (Demidov *et al.*, 2009), protein TPX2 (Tomašítková *et al.*, 2015) a protein MAP65-1 (Boruc *et al.*, 2016).

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Biologický materiál

#### 4.1.1 Bakterie

Pro experimentální část byly použity bakterie *Escherichia coli* kmeny TOP10 a DH5 $\alpha$ , které byly kultivovány v LB médiu s přidavkem antibiotik podle rezistenčního markeru přítomného ve vektoru. Bakteriální kultury byly inkubovány při teplotě 37 °C na rotační třepačce (180 rpm) nebo v termostatu.

Bakterie *Agrobacterium tumefaciens* kmeny GV3101 a LBA4404 byly kultivovány na médiu YEB s příslušnými antibiotiky při teplotě 28 °C na orbitální třepačce (225 rpm) nebo v termostatu.

#### 4.1.2 Rostliny

Pro experimenty byly použity rostliny *Arabidopsis thaliana* ekotyp Columbia-0 a *Nicotiana benthamiana*.

### 4.2 Vektory

Vektory se specifickými genovými sekvencemi (GST, gene-specific tag) pro umlčení kanonického *AtTPX2* (At1g03780) pomocí RNA interference byly objednány z databáze Agrikola ([www.agrikola.org](http://www.agrikola.org)) (Tabulka 3). Byly vybrány dva různé GST s původem v CATMA (Compleat Arabidopsis Transcriptome Micro Array) sekvencích. Vektory byly Gateway klonováním vloženy do vstupního vektoru pDONR207.

**Tabulka 3:** RNAi vektory

Název	GST	Velikost GST [pb]	Vektor	Bakteriální kmen	Bakteriální rezistence
pDONR207::N259388	CATMA1a02640	208	pDONR207	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	gentamycin
pDONR207::N259376	CATMA1a02630	168	pDONR207	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	gentamycin

Vektory proteinové rodiny TPX2 *Arabidopsis thaliana* a *AtAurora1* s GFP nebo RFP pro infiltraci listů *Nicotiana benthamiana* připravili Dr. Eva Dvořák Tomašíková (ÚEB, Olomouc), Dr. Dmitri Demidov a Dr. Inna Lermontova (IPK, Gatersleben), Dr. D. van Damme (VIB Ghent) (Tabulka 4).



**Tabulka 4:** Vektory pro infiltraci listů *N. benthamiana*

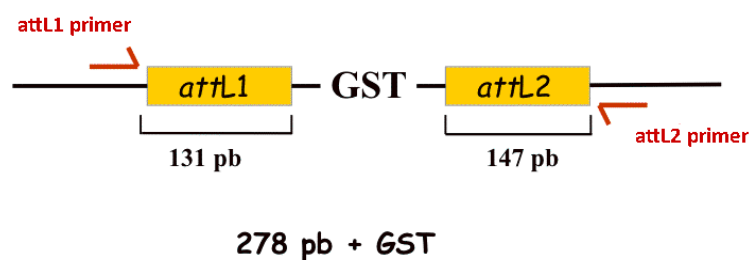
Název	Tag	Bakteriální rezistence v <i>A. tumefaciens</i>	Inzert	AGI číslo	Vektor
pK7WGF2- <i>A</i> tTPXL1-GFP	GFP	spectinomycin, rifampicin	TPXL1	At3g01015	pK7WGF2
p35s: pK7WGF2- <i>A</i> tTPXL2- GFP	GFP	spectinomycin, rifampicin	TPXL2	At4g11990	pK7WGF2
p35s: pK7WGF2- <i>A</i> tTPXL3- GFP	GFP	spectinomycin, rifampicin	TPXL3	At4g22860	pK7WGF2
pK7WGF2- <i>A</i> tTPXL4-GFP	GFP	spectinomycin, rifampicin	TPXL4	At5g07170	pK7WGF2
pMDC43- <i>A</i> tTPXL5-GFP	GFP	spectinomycin, rifampicin	TPXL5	At5g15510	pMDC43
pMDC43- <i>A</i> tTPXL6-GFP	GFP	spectinomycin, rifampicin	TPXL6	At5g37478	pMDC43
pK7WGF- <i>A</i> tTPXL7-GFP	GFP	spectinomycin, rifampicin	TPXL7	At5g44270	pK7WGF
pK7WGF2- <i>A</i> tTPXL8-GFP	GFP	spectinomycin, rifampicin	TPXL8	At5g62240	pK7WGF2
pK7WGF2- <i>A</i> tTPX2 can.-GFP	GFP	spectinomycin, rifampicin	TPX2can	At1g03780	pK7WGF2
pB7RWG2- <i>A</i> tTPXL1 gDNA- RFP	RFP	spectinomycin, rifampicin	TPXL1 gDNA	At3g01015	pB7RWG2
pB7RWG2- <i>A</i> tTPXL2 gDNA- RFP	RFP	spectinomycin, rifampicin	TPXL2 gDNA	At4g11990	pB7RWG2
pB7RWG2- <i>A</i> tTPXL3 gDNA- RFP	RFP	spectinomycin, rifampicin	TPXL3 gDNA	At4g22860	pB7RWG2
pB7RWG2- <i>A</i> tTPXL4 gDNA- RFP	RFP	spectinomycin, rifampicin	TPXL4 gDNA	At5g07170	pB7RWG2
pB7RWG2- <i>A</i> tTPXL5 gDNA- RFP	RFP	spectinomycin, rifampicin	TPXL5 gDNA	At5g15510	pB7RWG2

**Tabulka 4:** Vektory pro infiltraci listů *N. benthamiana* (pokračování)

Název	Tag	Bakteriální rezistence v <i>A. tumefaciens</i>	Inzert	AGI číslo	Vektor
pB7RWG- <i>AtTPXL6</i> cDNA- RFP	RFP	spectinomycin, rifampicin	TPXL6 cDNA	At5g37478	pB7RWG
pH7WGR2- <i>AtTPXL7</i> gDNA- RFP	RFP	spectinomycin, rifampicin	TPXL7 gDNA	At5g44270	pH7WGR2
pB7RWG2- <i>AtTPXL8</i> gDNA- RFP	RFP	spectinomycin, rifampicin	TPXL8 gDNA	At5g62240	pB7RWG2
pB7WGR2- <i>AtTPX2can.</i> cDNA- RFP	RFP	spectinomycin, rifampicin	TPX2 can. cDNA	At1g03780	pB7WGR2
pH7WGR- <i>AtAK1</i> -GFP	GFP	spectinomycin, rifampicin	<i>AtAurora1</i>	At4g32830	pH7WGR
pB7WGF2- <i>AtCENH3</i> -RFP	RFP	spectinomycin, rifampicin	CENH3	At1g01370	pB7WGR2

### 4.3 Ověření RNAi vektorů

Přítomnost GST ve vektorech byla ověřována PCR reakcí s *attL1* a *attL2* oligomery. Díky Gateway klonování obsahují RNAi vektory ve své struktuře *attL1* a *attL2* místo, mezi kterými se nachází různě dlouhé místo s GST (Obrázek 6). Velikost *attL1* a *attL2* míst je dohromady 278 pb. Oligomery *attL1* (5'- TCG CGT TAA CGC TAG CAT GGA TCT C - 3') a *attL2* (5'- GTA ACA TCA GAG ATT TTG AGA CAC - 3') byly navrženy k amplifikaci úseku od *attL1* a *attL2* místa. Velikost produktů tak můžeme ověřit na agarózovém gelu.



**Obrázek 6:** Obecná struktura genově specifické sekvence v RNAi vektoru (převzato z [www.agrikola.org](http://www.agrikola.org))

Bakterie *E. coli* s RNAi vektory byly přeočkovány na čerstvé misky s tuhým LB médiem obsahujícím gentamycin (50 µg/ml) a kultivovány přes noc při teplotě 37 °C v inkubátoru. Druhý den bylo přeočkováno 5 kolonií z každé misky do tekutého LB média s gentamycinem. Zkumavky byly následně inkubovány přes noc na rotační třepačce (180 rpm) při 37 °C.

#### 4.3.1 PCR reakce a agarózová elektroforéza

Pro ověření přítomnosti vektorů byla využita PCR reakce. Jako templát bylo odebráno 100 µl noční bakteriální kultury, která byla stočena na centrifuze po dobu 60 s při 13000 rpm. Pelet byl resuspendován ve 100 µl destilované vody a 5 µl bylo použito do PCR reakce. Reakce probíhala s oligonukleotidy attL1 (5'- TCG CGT TAA CGC TAG CAT GGA TCT C - 3') a attL2 (5'- GTA ACA TCA GAG ATT TTG AGA CAC - 3'). Na PCR byla připravena reakční směs s Perfect Taq Plus DNA Polymerázou (5 PRIME), Perfect Load Dye (5 PRIME), deoxynukleotidy, primery a destilovanou vodou podle Tubulky 5. Reakce probíhala v termocykléru za přesně stanovených teplotních podmínek (Tabulka 6).

Vzniklé PCR produkty byly separovány na 1% agarózovém gelu v 1x TAE pufru s ethidium bromidem (0,5 µg/ml) po dobu asi 25 min při napětí 100 V. Jako velikostní marker byl použit GeneRuler Low Range DNA Ladder (Thermo Scientific). Fotky gelu byly pořízeny pomocí UV transluminátoru.

**Tabulka 5:** Příprava PCR reakční směsi pro 1 vzorek

Reagencie	Koncentrace pracovního roztoku	Konečná koncentrace	1 reakce [µl]
Perfect Taq Plus PCR Buffer	10x	1x	2,5
Perfect Load Dye	10x	1x	2,5
dNTPs	10 nmol/l	0,2 nmol/l	0,5
Primer F	20 pmol/µl	0,8 pmol/µl	1
Primer R	20 pmol/µl	0,8 pmol/µl	1
Perfect Taq Plus DNA Polymerase	5 U/µl	0,025 U/µl	0,125
dH <sub>2</sub> O	-	-	12,37
Templát	-	-	5
<b>Objem reakce</b>			<b>25 µl</b>

**Tabulka 6:** Podmínky PCR reakce

<b>Krok</b>	<b>Teplota [°C]</b>	<b>Čas</b>	<b>Počet cyklů</b>
Počáteční denaturace	94	3 min	-
Denaturace	94	30 s	
Hybridizace	54	30 s	35
Elongace	72	30 s	
Konečná elongace	72	10 min	-

#### 4.3.2 Izolace plazmidu z pozitivních klonů a sekvenování

Na elektroforetogramu byla zkontrolována velikost amplifikovaného úseku podle velikosti vektoru a příslušného GST. Z pozitivních klonů byl vyizolován plazmid pomocí Plasmid Miniprep Kit (Qiagen) podle pokynů výrobce. Plazmidy byly sekvenovány s oligonukleotidy attL1, attL2 a získané sekvence byly zkontrolovány v programu DNA Baser.

#### 4.4 Gateway klonování

Gateway klonování je technologie vynalezená firmou Invitrogen, která umožňuje přenášet DNA fragmenty mezi plazmidy za použití sady rekombinačních sekvencí *att* a dvou enzymových směsí: LR klonázy a BP klonázy. Díky specifickým rekombinačním místům je umožněn přenos DNA fragmentů do různých vektorů při zachování čtecího rámce. Gateway klonování zahrnuje dvě reakce:

BP reakce: DNA fragment obklopený *attB* místy + donorový vektor s *attP* místy pomocí BP klonázy vytvoří vstupní klon s *attL* místy lemujícími DNA fragment a *attR* vedlejší produkt.

LR reakce: vstupní klon obsahující *attL* místa + destinační vektor s *attR* místy za pomoci LR klonázy vytvoří expresní klon obsahující *attB* místa lemující DNA fragment a *attP* vedlejší produkt.

##### 4.4.1 LR reakce

Inzerty byly z původního donorového vektoru pDONR207 pomocí LR klonázy překlonovány do binárního vektoru vhodného k transformaci rostlin. Jako destinační vektory byly zvoleny pH7GWIWG2.0 s rezistencí k hygromycinu a pK7GWIWG2.0 s rezistencí ke kanamycinu. Na jednu reakci bylo ve zkumavce smícháno 75 ng donorového vektoru, 75 ng destinačního vektoru, 1 µl LR klonázy a TE pufr (pH 8) do 10 µl (dle pokynů výrobce).

Reakce probíhala 1 hodinu při pokojové teplotě a byla zastavena přidáním 1  $\mu$ l Proteinázy K. Zkumavky byly inkubovány při teplotě 37 °C po dobu 10 min.

#### **4.4.2 Transformace bakterií *Escherichia coli***

Bakterie *E. coli* TOP10 byly transformovány metodou teplotního šoku s konstrukty pH7GWIWG2.0::N259388, pK7GWIWG2.0::N259388, pH7GWIWG2.0::N259376, pK7GWIWG2.0::N259376. Ke 100  $\mu$ l kompetentních buněk bylo přidáno 10  $\mu$ l směsi po LR reakci a byly inkubovány 30 min na ledu. Poté byl proveden teplotní šok: 45 s při teplotě 42 °C, 2 min na ledu. K transformovaným buňkám bylo přidáno 800  $\mu$ l LB média a byly inkubovány 1 h při teplotě 37 °C. Po inkubaci byly bakteriální kultury stočeny po dobu 1 min při 6000 rpm. Supernatant byl slit, pelet resuspendován ve 100  $\mu$ l čerstvého LB média a vyset na misky s tuhým LB médiem a spektinomycinem (100  $\mu$ g/ml). Misky byly inkubovány přes noc při 37 °C. Druhý den byly narostlé kolonie přeočkovány sterilním párátkem do 5 ml tekutého LB média se spektinomycinem a kultivovány přes noc na rotační třepačce při teplotě 37 °C.

#### **4.4.3 Ověření bakterií *Escherichia coli* po transformaci**

Inzert v bakteriálních kulturách byl amplifikován PCR reakcí s attB1 (5' - ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TTC - 3') a attB2 (5' - AC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC - 3') oligomery a jeho velikost byla zkontrolována na 1% agarózovém gelu v TAE pufru (viz kapitola 4.3.1). Plazmidy se správnou velikostí inzertu byly z bakterií izolovány pomocí Plazmid Miniprep Kit (Qiagen) a pro příslušné bakteriální klony byly vyrobeny konzervy.

#### **4.5 Transformace bakterií *Agrobacterium tumefaciens***

Ke zmrzlým kompetentním buňkám *A. tumefaciens* GV3101 byl přidán 1  $\mu$ g plazmidu. Směs byla inkubována 5 min při teplotě 37 °C ve vodní lázni. Následně byl přidán 1 ml YEB média a bakteriální kultura byla kultivována 4 h při 28 °C na třepačce (600 rpm). Zkumavky byly centrifugovány po dobu 30 s při 13000 rpm, supernatant byl slit a pelet resuspendován ve 100  $\mu$ l nového YEB média. Bakteriální kultura byla rozetřena na misky s tuhým YEB médiem a příslušnými antibiotiky: rifampicin (25  $\mu$ g/ml), gentamycin (50  $\mu$ g/ml), spektinomycin (100  $\mu$ g/ml). Misky byly inkubovány 3 dny při teplotě 28 °C. Narostlé kolonie byly přeočkovány do 5 ml tekutého média a inkubovány přes noc při 28 °C. Bakteriální kultury byly ověřeny pomocí PCR reakce s attB1 a attB2 oligomery

(viz kapitola 4.3.1) a z pozitivních klonů byly vytvořeny konzervy. Bakterie *A. tumefaciens* s příslušnými vektory byly použity k transformaci rostlin *A. thaliana* (Tabulka 7).

**Tabulka 7:** Konstrukty pro transformaci rostlin *A. thaliana*

Název konstruktů	Inzert	Vektor	Rezistence v bakteriích	Rezistence v rostlinách
KP1	CATMA1a02640	pH7GWIWG2.0		hygromycin
KP2	CATMA1a02630	pK7GWIWG2.0	rifampicin, gentamycin, spektinomycin	kanamycin
KP4	CATMA1a02630	pH7GWIWG2.0		hygromycin
KP5	CATMA1a02640	pK7GWIWG2.0		kanamycin

#### 4.6 Transformace rostlin *Arabidopsis thaliana*

Rostliny *A. thaliana* byly transformovány bakteriemi *A. tumefaciens* nesoucími příslušné konstrukty (Tabulka 7). Transformační protokol byl upraven podle Clough *et* Bent (1998). Bakteriální kultura *A. tumefaciens* GV3101 o objemu 50 µl byla inokulována do 5 ml tekutého YEB média s příslušnými antibiotiky (rifampicin, spektinomycin, gentamycin) a byla inkubována přes noc na rotační třepačce (225 rpm) při teplotě 28 °C. Druhý den byly 4 ml noční kultury přeočkovány do 100 ml YEB média s antibiotiky a kultura byla inkubována přes noc při teplotě 28 °C na rotační třepačce. Bakteriální suspenze byla centrifugována při teplotě 4 °C a otáčkách 4500 rpm po dobu 20 min. Supernatant byl slit a pelet resuspendován v roztoku 5% sacharózy. Supernatant byl ředěn tak dlouho, dokud jeho OD měřené na spektrofotometru nedosáhlo hodnoty mezi 0,6-0,8. K roztoku byl přidán acetosyringon v DMSO na finální koncentraci 200 µM a Silvet L-77 do konečné koncentrace 0,05 %. Do připraveného roztoku byly postupně na několik sekund namáčeny květenství rostlin *A. thaliana* generace F<sub>0</sub>.

#### 4.7 Ověření přítomnosti konstruktů v F<sub>1</sub> generaci rostlin

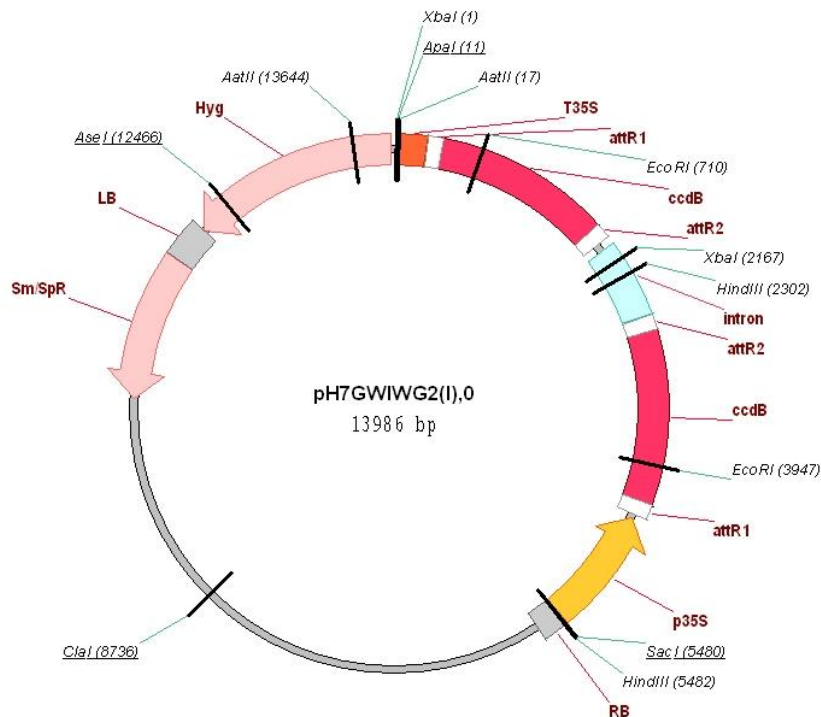
Transformované rostliny *A. thaliana* rostly ve skleníku při standardních podmínkách zhruba tři měsíce. Semena produkovaná jednotlivými rostlinami byla sesbírána a uchovávána v chladničce. Přítomnost konstruktů byla ověřena vysetím sterilních semen na ½ MS médium s přidavkem příslušných antibiotik: hygromycin (15 µg/ml), kanamycin (50 µg/ml). Vyklíčená semena byla po několika dnech přesunuta do zeminy a zhruba po dvou týdnech byly jednotlivé rostliny rozsazeny do samostatných květináčů.

#### **4.7.1 Izolace DNA**

Pro izolaci DNA byly použity 3-4 týdenní rostliny. Do 2ml zkumavky se dvěmi kovovými kuličkami byly přidány dva listy rostliny. Zkumavka byla ihned zmražena v tekutém dusíku. Struktura rostlinného materiálu byla narušena homogenzátorem TissueLyser II po dobu 2x30 s při 30 Hz. Po zhomogenizování bylo do zkumavek přidáno 1200  $\mu$ l Extrakčního pufru a byly inkubovány 15 min při teplotě 65 °C. Následně bylo přidáno 600  $\mu$ l směsi chloroform/isoamylalkohol, zkumavky byly přemístěny na 5 min na třepačku a dále centrifugovány po dobu 5 min na 13000 rpm. Do nové zkumavky byl odebrán 1 ml supernatantu a ke každému vzorku bylo přidáno 700  $\mu$ l izopropanolu. Po protřepání byly zkumavky inkubovány 2 min při pokojové teplotě. Další centrifugace probíhala 5 min při 13000 rpm, supernatant byl vylit a pelet byl omyt 300  $\mu$ l 70% etanolu. Po 5 minutách byly vzorky dodatečně centrifugovány 2 min při 13000 rpm. Pelet byl vysušen ve speedvacu a rozpuštěn v 50  $\mu$ l destilované vody. DNA byla uchovávána v -80 °C.

#### **4.7.2 Navržení oligomerů, PCR reakce a elektroforéza**

Izolovaná DNA byla použita do PCR reakce se třemi různými dvojicemi oligomerů. První dvojice oligomerů (TPXL5Left1, TPXL5Right1) byla použita pro kontrolu kvality vyizolované DNA. Druhá dvojice (35sPrLeft2, 35sPrRight2) byla navržena tak, aby rozpoznala a amplifikovala 35S promotor, tedy začátek inzertu ve vektoru. Poslední dvojice (HygrLeft2, HygrRight2) byla navržena, aby rozpoznala a amplifikovala konec inzertu, na kterém se nachází gen rezistence k hygromycinu. Bylo předpokládáno, že pokud bude vzorek pozitivní pro všechny tři dvojice oligomerů, obsahuje rostlina RNAi vektor s inzertem (Obrázek 7). Sekvence použitých oligomerů se nachází v Tabulce 8.



**Obrázek 7:** Mapa vektoru pH7GWIWG2.0 (pK7GWIWG2.0)

Vektor pH7GWIWG2.0 s vyznačenými místy začátku inzertu v místě promotoru 35S - **p35S** (oligomery navržené pro amplifikaci úseku: 35sPrLeft2, 35sPrRight2) a konce inzertu v místě genu rezistence k hygromycinu - **Hyg** (oligomery navržené pro amplifikaci úseku: HygrLeft2, HygrRight2). Vektor pK7GWIWG2.0 má stejnou strukturu, ale obsahuje gen rezistence ke kanamycinu.

**Tabulka 8:** Sekvence použitých oligomerů

Název	Sekvence
TPXL5Left1	5' - TGA AGG ATC GGA GCA AGT TTC A - 3'
TPXL5Right1	5' - CCT TCT TCC TCT CTC CGC ATT T - 3'
35sPrLeft2	5' - ACT TGC TTT GAA GAC GTG GTT G - 3'
35sPrRight2	5' - GCT TGC TTC ATA AAC CAA GGC A - 3'
HygrLeft2	5' - ATC GAA ATT GCC GTC AAC CAA G - 3'
HygrRight2	5' - CGC AAG GAA TCG GTC AAT ACA C - 3'

Na PCR reakci byla připravena reakční směs obsahující *Taq* DNA Polymerase (Qiagen), 10x PCR Buffer (Qiagen), deoxynukleotidy, primery F, R a destilovanou vodu (Tabulka 9). Jako templát bylo použito 5 µl vyzolované gDNA. Reakce probíhala podle teplotních podmínek uvedených v Tabulce 10.



PCR produkty byly ověřovány na 1% agarózovém gelu s ethidium bromidem (0,5 µg/ml) v TAE pufru. PCR produkt byl smíchán s 0,1% bromfenolovou modří ve 30% vodném roztoku glycerinu a nanesen do jamky v gelu. Pro určení velikosti produktů byl použit GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas).

**Tabulka 9:** Příprava reakční směsi PCR pro 1 vzorek

Reagencie	Koncentrace pracovního roztoku	Konečná koncentrace	1 reakce [µl]
10x PCR Buffer	10x	1x	2,5
dNTPs	10 nmol/l	0,8 nmol/l	2
Primer F	20 pmol/µl	0,8 pmol/µl	1
Primer R	20 pmol/µl	0,8 pmol/µl	1
<i>Taq</i> DNA polymerase	5 U/µl	0,06 U/µl	0,3
dH <sub>2</sub> O	-	-	13,2
gDNA	-	-	5
<b>Objem reakce</b>			25 µl

**Tabulka 10:** Podmínky PCR reakce

Krok	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	4 min	-
Denaturace	95	30 s	
Hybridizace	57	30 s	35
Elongace	72	40 s	
Konečná elongace	72	20 min	-

## 4.8 Sledování exprese TPX2 v transformovaných rostlinách

### 4.8.1 Izolace RNA

Veškerý materiál použitý k izolaci RNA byl RNase-free z důvodu zamezení její degradace. Do 2ml zkumavky byly ke dvěma kovovým kuličkám přidány tři listy rostlin starých 6-12 týdnů. Zkumavky byly následně zmraženy v tekutém dusíku. K homogenizaci rostlinného materiálu byl použit TissueLyser II po dobu 2x30 s na 30 Hz. Do zkumavek byl přidán 1 ml trizolu a vzorky byly vortexovány po dobu 5 min. Dále bylo přidáno 200 µl chloroformu a vzorky byly centrifugovány po dobu 15 min při 12000 rpm a teplotě 4 °C. K 700 µl odebraného supernatantu bylo přidáno 500 µl isopropanolu a promícháno otočením. Vzorky byly inkubovány 15 min na ledě, poté centrifugovány 15 min

při 12000 rpm a teplotě 4 °C. Pelet byl omyt 1 ml 70% etanolu. Vzorky byly centrifugovány 5 min při 12000 rpm. Etanol byl odpipetován a pelet byl vysušen ve speedvacu a rozpuštěn v 30 µl destilované vody.

Po izolaci RNA bylo provedeno ošetření DNázou s Turbo DNA-free Kit (Thermo Fisher Scientific). Do zkumavky obsahující 26 µl RNA z předchozího kroku bylo přidáno 2,6 µl 10x Turbo DNase Buffer a 1 µl Turbo DNase. Po promíchání byla zkumavka inkubována při 37 °C. Po 40 minutách bylo přidáno 5 µl DNase Inactivation Reagent. Za občasného míchání byl vzorek inkubován 5 min při pokojové teplotě. V posledním kroku byl centrifugován po dobu 2 min při 10000x g a RNA byla přepipetována do čisté zkumavky. Čistota a koncentrace RNA byly kontrolovány pomocí NanoDropu a 1,5% agarózovou elektroforézou v TAE pufru. Vzorky s izolovanou RNA byly uchovávány v -80 °C.

#### 4.8.2 Syntéza cDNA

Pro syntézu cDNA byl použit Revert Aid H minus First Strand cDNA synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) dle pokynů výrobce. Do sterilní zkumavky na ledě bylo přidáno: 1-3 ng RNA templátu, 1 µl primer-oligo(dT)<sub>18</sub>, destilovaná voda do objemu 12 µl. Zkumavky byly promíchány, krátce zcentrifugovány a inkubovány po dobu 5 min v 65 °C. Poté byly opět přemístěny krátce na led a zcentrifugovány. Do každé bylo přidáno: 4 µl reakčního pufru, 1 µl Ribolock RNase Inhibitor, 2 µl 10 mM dNTP mix, 1 µl Reverse Aid H minus M-MuLV Reverse Transcriptase (Tabulka 11). Vzorky byly zcentrifugovány a inkubovány po dobu 60 min při teplotě 42 °C. Reakce byla zakončena inkubací při teplotě 70 °C po dobu 5 min.

**Tabulka 11:** Syntéza cDNA

Reagencie	Koncentrace pracovního roztoku	Konečná koncentrace	1 reakce
RNA templát	-	1-3 ng	1-3 ng
oligo(dT) <sub>18</sub> primer	0,5 µg/µl	0,04 µg/µl	1 µl
dH <sub>2</sub> O	-	-	do 10 µl
<b>Objem reakce</b>			12 µl
5x Reakční pufr	5x	1x	4 µl
dNTP mix	10 mM	1 mM	2 µl
Reverse Aid H minus M-MuLV Reverse Transcriptase	200 U/µl	10 U/µl	1 µl
<b>Objem reakce</b>			20 µl

### 4.8.3 RT PCR reakce

K ověření exprese TPX2 genu v transformovaných rostlinách *Arabidopsis* a „wild typu“ byla využita metoda RT PCR, pro kterou byly navrženy oligomery TPX2can\_Left1 (5' - AGA AGT ACA CCA CAT CTG CCA G - 3') a TPX2can\_Right1 (5' - AGG GCT CTT TGG TTC AGT AAG G - 3'). Reakční směs byla namíchána stejně jako předchozí (Kapitola 4.7.2) s tím rozdílem, že templátu (cDNA) byly použity 3  $\mu$ l a destilované vody 15,2  $\mu$ l. Teplotní průběh reakce je uveden v Tabulce 10. PCR produkty byly separovány na 1,5% agarózovém gelu s ethidium bromidem v TAE pufru.

## 4.9 Stanovení fertility mutantů

### 4.9.1 Alexandrův test

Tento test využívá Alexandrovo barvivo k obarvení pylu v prašnicích zkoumaných rostlin. Prašníky jsou poté pozorovány pod mikroskopem, pyl je spočítán a je provedena statistika. Pyl, který je sterilní se zbarví do zelena, nesterilní pyl se obarví fialově.

Květní pupeny byly fixovány v 1,5 ml Fixačního roztoku 3:1 (96% etanol: kyselina octová) přes noc. Druhý den byl Fixační roztok vyměněn za čistý a poté ještě jednou po dvou hodinách. Pod binokulární lupou byly na mikroskopické sklíčko vypreparovány prašníky, které byly nabarveny 15  $\mu$ l Alexandrova barviva a přikryty krycím sklíčkem. Preparáty byly uchovávány ve 4 °C. Snímky byly pořízeny na konfokálním mikroskopu.

### 4.9.2 Odbarvení šesulí

Test slouží k určení počtu vyvinutých semen v šesulích zkoumaných rostlin. Používá se čistící roztok chloral hydrátu, který odstraní chlorofyl, šesuli zprůhlední a usnadní počítání semen.

Šesule byly 4-5 dní ponořeny v 1 ml Čistícího roztoku při pokojové teplotě. Poté byly pod binokulární lupou spočítány semena a mezery v jednotlivých šesulích a byla provedena statistika.

## **4.10 Příprava bakteriální suspenze pro infiltraci listů *Nicotiana benthamiana***

### **4.10.1 Transformace bakterií elektroporací**

*E. coli* DH5 $\alpha$  a *A. tumefaciens* LBA4404 byly transformovány elektroporací. Ke kompetentním buňkám byl přidán 1  $\mu$ l plazmidu. Směs byla pipetována do 0,2cm kyvety a inkubována na ledě. Po 10 min byl proveden pulz pomocí Gene Pulser a byl přidán 1 ml SOC média. Bakterie byly inkubovány při teplotě 37 nebo 28 °C na termomixeru. Transformované bakterie byly bakteriologickou hokejkou rozetřeny v objemu 50  $\mu$ l na Petriho misky s LB nebo YEB médiem a příslušnými antibiotiky.

### **4.10.2 Izolace plazmidové DNA**

Z menších objemů nočních kultur bakterií byla plazmidová DNA izolována podle pokynů výrobce Plazmid Miniprep Kit (Qiagen). K izolaci plazmidu z většího objemu byl použit NucleoBond Xtra Midiprep Kit (Machery-Nagel). Koncentrace a kvalita vyizolované DNA byla kontrolována spekrofotometricky.

### **4.10.3 Příprava bakteriální suspenze pro infiltraci**

K infiltraci byly použity *A. tumefaciens* kmen LBA4404. Bakteriální suspenze byla inkubována v YEB médiu s antibiotiky: spektinomycin (100 mg/l) nebo kanamycin (50 mg/l) a rifampicin (100 mg/l) po dobu 24 hodin při teplotě 28 °C na třepače (180 rpm). Narostlá bakteriální suspenze v objemu 2 ml byla centrifugována 2 min při 13000x g a supernatant byl vylit. Pro lepší infiltraci byl přidán 1 ml bakteriálního kmene HCpro. K peletu bylo přidáno 1700  $\mu$ l Infiltračního média, byl zvortexován a znovu centrifugován. Tento proces byl 3x opakován. Po poslední centrifugaci byl přidán 1 ml Infiltračního média a vzorky byly inkubovány 30 min na ledě.

### **4.10.4 Infiltrace listů *Nicotiana benthamiana***

Infiltrace listů *N. benthamiana* byla provedena podle Sparkes *et al.* (2006). Kultura *A. tumefaciens* byla injektována do intracelulárního prostoru ze spodní strany listů rostlin starých 2-4 týdny s použitím 1ml injekční stříkačky. Po 3-5 dnech byly z listů připraveny preparáty.

#### 4.10.5 Konfokální laserová skenovací mikroskopie

Fluorescenční signál byl analyzován na konfokálním laserovém skenovacím mikroskopu s pomocí Dr. Twana Ruttena (IPK, Gatersleben). GFP a RFP bylo excitováno při vlnové délce 488 nm a 561 nm a signál byl detekován při 505-530 nm a 575 nm. Fotospektrometrická analýza byla provedena s pomocí META detektoru k určení specifity fluorescenčního signálu.

#### 4.11 Seznam použitých roztoků a jejich složení

##### Alexandrovo barvivo (100 ml)

96% etanol.....	10 ml
Malachitová zeleň (1 ml 1% roztoku v 96% etanolu).....	10 mg
dH <sub>2</sub> O.....	50 ml
Glycerol.....	25 ml
Fenol.....	5 g
Chloralhydrát.....	5 g
Kyselý fuchsin.....	50 mg
Orange G (0,5 ml 1% roztoku ve vodě).....	5 mg

Přidat ledovou kyselinu octovou do finální koncentrace 4%, uchovávat v temnu.

##### Extrakční pufr (100 ml)

100mM TRIS.....	1,21 g
0,7M NaCl.....	4,09 g
0,05M EDTA.....	1,86 g
RNáza (100 mg/ml).....	50 µl

##### Fosfátový pufr (100 ml)

1M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	57,7 ml
1M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	42,3 ml

pH 7 upravit pomocí Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> nebo NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

##### Čistící roztok chloral hydrátu (100 ml)

Chloral hydrát.....	250 g
30% glycerol.....	100 ml

##### Infiltrační médium (1 l)

MgCl <sub>2</sub> .....	4,06 g
MES.....	3,9 g
Doplnit H <sub>2</sub> O.....	do 1 l

pH 5,6 upravit pomocí KOH

Sterilizovat autoklávováním.

### Kvasničný extrakt (50 ml)

Kvasničný autolyzát.....	1 g
DMSO.....	10 ml
Glycerol.....	10 ml

Rozpustit a doplnit dH<sub>2</sub>O do 50 ml.

### LB médium (1 l)

Pepton.....	10 g
Kvasničný extrakt.....	5 g
NaCl.....	15 g
na tuhé médium přidat agar.....	15 g

pH 7,0 upravit pomocí KOH

Sterilizovat autoklávováním.

### ½ MS médium (1 l)

Sacharóza.....	10 g
MES.....	1 g
MS salt.....	2,2 g
Agar.....	16 g

pH 5,8 upravit pomocí 3M KOH

Sterilizovat autoklávováním.

### SOC médium

Pepton.....	2 g
Kvasničný extrakt.....	0,5 g
1M NaCl.....	1 ml
1M KCl.....	0,25 ml
2M Mg <sup>2+</sup> roztok.....	1 ml
2M glukóza.....	1 ml
Doplnit dH <sub>2</sub> O do.....	100 ml

Sterilizovat autoklávováním.

### TAE pufr 50x (1 l)

TRIS.....	242 g
Ledová kyselina octová.....	57,1 ml
0,5M EDTA.....	100 ml
Doplnit dH <sub>2</sub> O do.....	1 l

pH 8 upravit pomocí kyseliny octové.

#### TE pufr (100 ml)

TRIS.....	1,21 g
Na <sub>2</sub> EDTA.....	0,37 g
dH <sub>2</sub> O.....	do 100 ml

pH 8,0

Sterilizovat autoklávováním.

#### YEB médium (1 l)

MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O.....	0,5 g
Beef extrakt.....	5 g
Pepton.....	5 g
Sacharóza.....	5 g
Kvasničný extrakt.....	1 g
na tuhé médium přidat agar.....	15 g

pH 7,2 upravit pomocí 3M KOH

Sterilizovat autoklávováním.

### **4.12 Seznam použitých přístrojů**

- Analytické váhy (Sartorius)
- Centrifuga Biofuge 13 (Heraeus)
- Centrifuga Jouan BR4I (Trigon-plus)
- Digitální váha Scout SC 4010 (Ohaus)
- Elektroforetická komora Easycast B1A (Thermo Scientific)
- Gene Pulser (Bio-Rad)
- Laminární box Biohazard Thermo Scientific MSC12 (Trigon-plus)
- Magnetická míchačka AREX Digital (P-Lab a.s.)
- Minicentrifuga 5415D (Eppendorf)
- Orbitální třepačka IKA-VIBRA\_VXR (Janke & Kunkel)
- Orbitální třepačka VKS-75 control (Bühler)
- pH metr InoLAB (WTW)
- TissueLyser II (Qiagen)
- Termocyklér T-gradient (Biometra)
- Termocyklér T100 (BIO-RAD)
- Thermomixer 5436 (Eppendorf)
- Termostat 200 (Mettler)
- Thermo Shaker (VWR)

- Transluminátor EA-40 UV (Ultra.Lum)
- ND-1000 Spectrophotometer NanoDrop (PerkinElmer)
- Speedvac DNA120-115 (Thermo Fisher Scientific)
- Konfokální laserový skenovací mikroskop (Zeiss LSM510 META, Carl Zeiss, Jena, Germany)
- Spektrofotometr Ultrospec 10 (Amersham Biosciences)
- Vodní lázeň TW8 (Julabo)
- Vortex mixer (VWR)
- Zdroj elektrického proudu Power Pack P25 (Biometra)

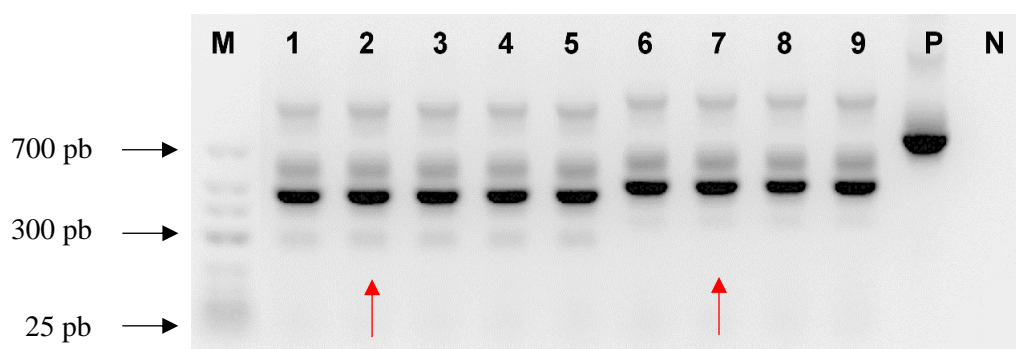


## 5 Výsledky

### 5.1 Umlčení kanonického TPX2 pomocí RNA interference v *Arabidopsis thaliana* a efekt na aktivitu Aurora kinázy 1

#### 5.1.1 Ověření RNAi vektorů

K umlčení genu pro TPX2 (*At1g03780*) v *Arabidopsis thaliana* byly objednány RNAi vektory v *E. coli* bakteriích. Byly vybrány dva druhy GST s různou velikostí: N259388 (CATMA1a02640) s 208 pb a N259376 (CATMA1a02630) se 168 pb. Přítomnost GST ve vstupních vektorech pDONR207 byla ověřena pomocí PCR reakce s attL1/attL2 oligomery. Jako templát byly použity kolonie transformovaných *E. coli* bakterií, do negativní kontroly byla použita destilovaná voda a jako pozitivní kontrola byl použit vektor pDONR207::ET6. PCR produkty byly separovány v 1% agarózovém gelu v TAE pufru (Obrázek 8). Velikost produktů pDONR207::N259376 byla 446 pb (168 + 278 pb dle pozice primerů v donorovém vektoru), velikost produktů pDONR207::N259388 byla 486 pb (208 + 278) a velikost pozitivní kontroly byla 710 pb. Pro každý vektor byly vybrány první dva pozitivní klony, ze kterých byl izolován plazmid. Pro konstrukt pDONR207::N259376 byly vybrány klony číslo 1 a 2, pro konstrukt pDONR207::N259388 byly vybrány klony číslo 6 a 7. Izolované plazmidy byly sekvenovány s oligonukleotidy attL1 a attL2. Po zkontrolování sekvence byly vybrány plazmidy č. 2 a 7, které byly překlonovány pomocí Gateway klonování do binárního vektoru vhodného k transformaci rostlin.



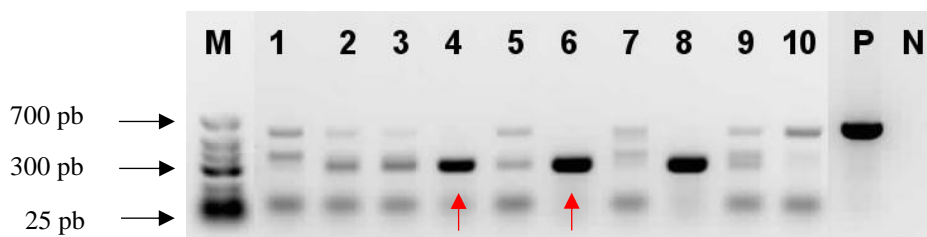
**Obrázek 8:** Ověření RNAi vektorů

**M** - GeneRuler Low Range DNA Ladder; **1-5** - pDONR207::N259376; **6-9** - pDONR207::N259388; **P** - pozitivní kontrola (pDONR207::ET6); **N** - negativní kontrola (voda). Červené šipky označují klony, které byly po ověření sekvence použity k další práci.

## 5.1.2 Gateway klonování

### 5.1.2.1 LR reakce a ověření bakterií *Escherichia coli* po transformaci

Ověřené GST inzerty v donorových vektorech (pDONR207::N259376 a pDONR207::N259388) byly překlonovány do destinačních vektorů pH7GWIWG2.0 a pK7GWIWG2.0 pomocí LR reakce. Byly vytvořeny čtyři konstrukty, kterými byly transformovány bakterie *E. coli* (pH7GWIWG2.0::N259388, pK7GWIWG2.0::N259388, pH7GWIWG2.0::N259376, pK7GWIWG2.0::N259376). Narostlé kolonie byly ověřeny PCR reakcí s oligomery attB1/attB2. Velikost PCR produktů byla zkontrolována na elektroforetogramu (Obrázek 9, 10, 11). Pozitivní PCR produkty s N259388 GST měly velikost 258 pb: 25 + 25 (attB1 + attB2 místo) + 208 a pozitivní PCR produkty s N259376 GST měly velikost 218 pb (25 + 25 + 168). Pro konstrukt pK7GWIWG2.0::N259388 byla vybrána kolonie č. 4, pro konstrukt pH7GWIWG2.0::N259388 byla vybrána kolonie č. 6 (Obrázek 9), pro konstrukt pK7GWIWG2.0::N259376 byla vybrána kolonie č. 10 (Obrázek 10), pro konstrukt pH7GWIWG2.0::N259376 byla vybrána kolonie č. 1 (Obrázek 11). Z pozitivních kolonií byly izolovány plazmidy, které byly použity k transformaci bakterií *A. tumefaciens*.

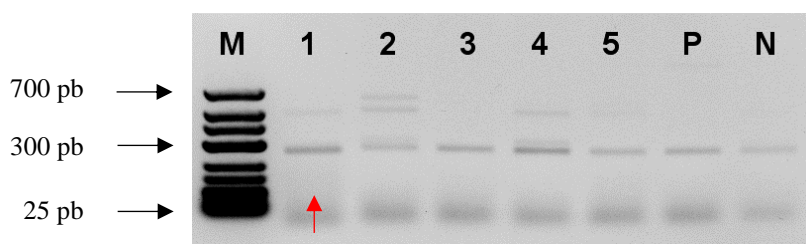


**Obrázek 9:** Ověření bakterií *E. coli* s konstrukty pK7GWIWG2.0::N259388 a pK7GWIWG2.0::N259388

**M** - GeneRuler Low Range DNA Ladder; **1-5** - pK7GWIWG2.0::N259388; **6-10** - pH7GWIWG2.0::N259388; **P** - pozitivní kontrola (pDONR207::ET6); **N** - negativní kontrola (voda). Červené šipky označují klony, které byly použity k další práci.



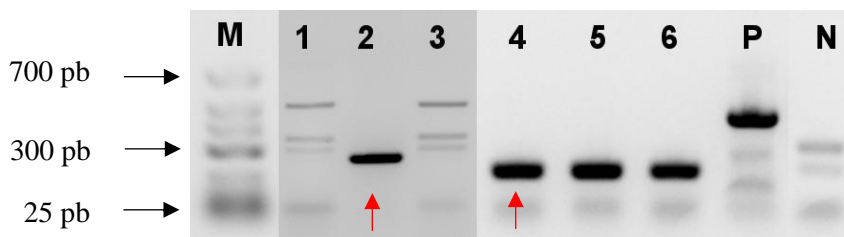
**Obrázek 10:** Ověření bakterií *E. coli* s konstruktem pK7GWIWG2.0::N259376  
**M** - GeneRuler Low Range DNA Ladder; **1-10** - pK7GWIWG2.0::N259376; **P** - pozitivní kontrola (pDONR207::ET6); **N** - negativní kontrola (voda). Červená šipka označuje klon, který byl použit k další práci.



**Obrázek 11:** Ověření bakterií *E. coli* s konstruktem pH7GWIWG2.0::N259376  
**M** - GeneRuler Low Range DNA Ladder; **1-5** - pH7GWIWG2.0::N259376; **P** - pozitivní kontrola (pDONR207::ET6); **N** - negativní kontrola (voda). Červená šipka označuje klon, který byl použit k další práci.

### 5.1.3 Transformace a ověření bakterií *Agrobacterium tumefaciens*

Izolovanými plazmidy byly transformovány bakterie *A. tumefaciens*. Narostlé kolonie byly ověřeny PCR reakcí s attB1/attB2 oligomery. Vzniklé produkty byly separovány pomocí elektroforézy. Do bakterií se podařilo transformovat pouze konstrukty pH7GWIWG2.0::N259388 a pH7GWIWG2.0::N259376. Pro zbylé dva konstrukty bylo ověřeno 48 kolonií ze tří nezávislých transformací, výsledek byl ale vždy negativní, proto se s těmito konstrukty dále nepracovalo. Pozitivní PCR produkty měly velikost 258 a 218 pb. Pro konstrukt pH7GWIWG2.0::N259388 byla vybrána kolonie č. 2, pro konstrukt pH7GWIWG2.0::N259376 byla vybrána kolonie č. 4 (Obrázek 12). Vybrané kolonie byly použity k transformaci rostlin.



**Obrázek 12:** Ověření bakterií *A. tumefaciens*

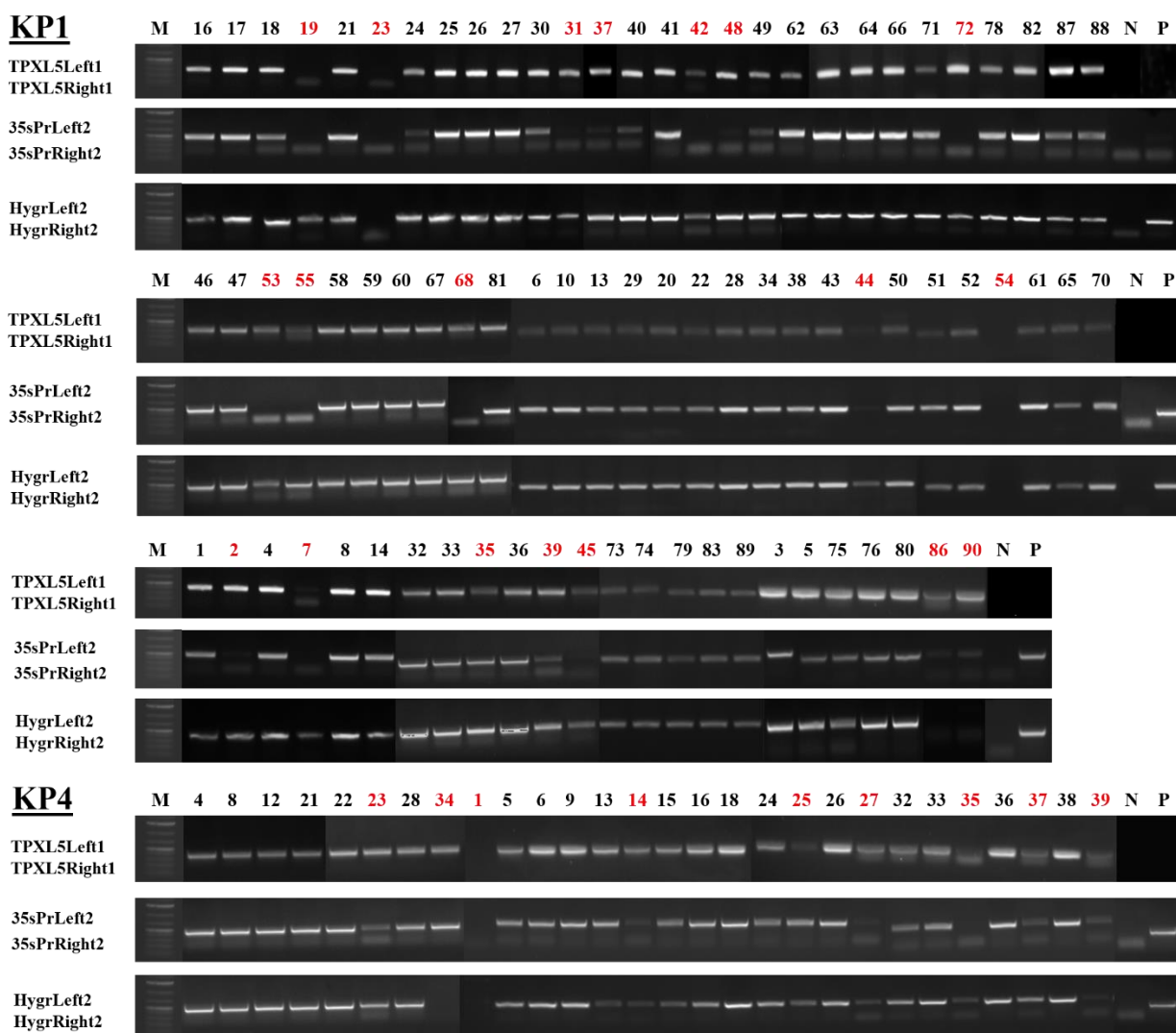
**M** - GeneRuler Low Range DNA Ladder; **1-3** - pH7GWIWG2.0::N259388; **4-6** - pH7GWIWG2.0::N259376; **P** - pozitivní kontrola (pDONR207::ET6); **N** - negativní kontrola (voda). Červené šipky označují klony, které byly použity k další práci.

### 5.1.4 Transformace rostlin *Arabidopsis thaliana*

Rostliny *A. thaliana* byly transformovány bakteriemi nesoucími konstrukty KP1 (pH7GWIWG2.0::N259388) a KP4 (pH7GWIWG2.0::N259376). Semena transformovaných rostlin byla posbírána a vyseta na ½ MS médium s hygromycinem. Z rostlin, které vyrostly a obsahovaly tedy rezistenční marker byla izolována DNA a pomocí PCR reakce s vhodnými oligomery byla ověřována přítomnost vektoru s inzertem v jednotlivých rostlinách.

#### 5.1.4.1 Ověření přítomnosti vektoru s inzertem v transformovaných rostlinách

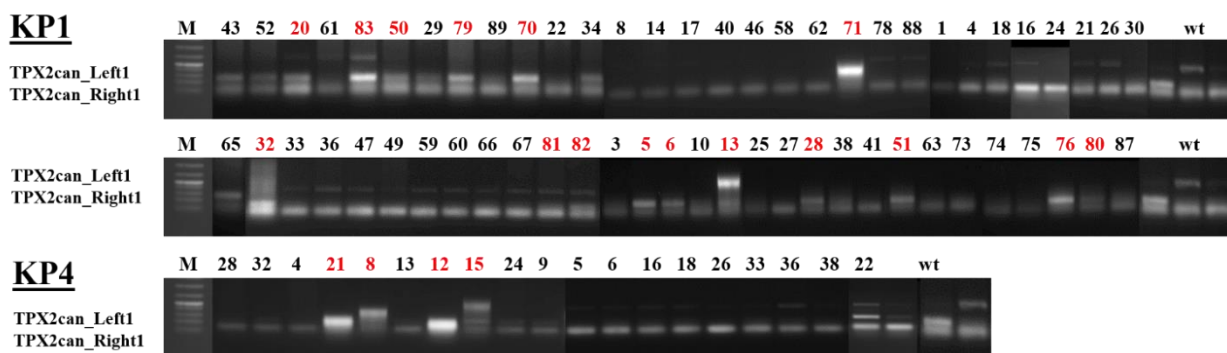
Bylo ověřováno 80 rostlin s konstruktem KP1 a 28 rostlin s konstruktem KP4. PCR produkty jednotlivých oligomerů byly použity do agaróзовé elektroforézy (Obrázek 13). Kvalita vyizolované DNA byla ověřována oligomery TPXL5Left1/TPXL5Right1 (odpovídá genu TPXL5 *Arabidopsis thaliana*, At5g15510). Vzorky, které neposkytly žádný PCR produkt byly vyřazeny nebo u nich byla izolace DNA opakována. Jako negativní kontrola byla použita destilovaná voda, jako pozitivní kontrola byl použit vektor pH7RWG2 ředěný 1:1000 o velikosti asi 500 pb. Oligomery 35sPrLeft2/35sPrRight2 byly navrženy k amplifikaci začátku inzertu v konstruktu (odpovídá sekvenci 35S promotoru pro expresi vektoru v rostlinách). Vzorky, u kterých se nevyskytl žádný PCR produkt byly vyřazeny. Oligomery HygrLeft2/HygrRight2 byly navrženy, aby rozpoznaly a amplifikovaly konec inzertu v konstruktu (odpovídá přítomnosti rezistenčního markeru v rostlinách). Vzorky, u kterých nebyl žádný PCR produkt byly vyřazeny. Pozitivní vzorky měly 3 proužky (bandy) s velikostí okolo 300 pb pro TPXL5Left1/TPXL5Right1 a 500 pb pro 35sPrLeft2/35sPrRight2 a HygrLeft2/HygrRight2 oligomery. Rostlin transformovaných KP1 konstruktem bylo negativních 19 s čísly: 2, 7, 19, 23, 31, 35, 37, 39, 42, 44, 45, 48, 53, 54, 55, 68, 72, 86, 90. Rostlin transformovaných KP4 konstruktem bylo negativních 9 s čísly: 1, 14, 23, 25, 27, 34, 35, 37, 39.



**Obrázek 13:** PCR reakce rostlin *A. thaliana* transformovaných konstrukty KP1 a KP4 s oligomery TPXL5Left1/TPXL5Right1, 35sPrLeft2/35sPrRight2 a HygrLeft2/HygrRight2. **M** - GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder; **P** - pozitivní kontrola (pH7RWG2); **N** - negativní kontrola (voda). Červeně jsou označeny negativní vzorky.

### 5.1.5 Ověření exprese TPX2 v transformovaných rostlinách

Z listů rostlin, které obsahovaly inzerť, byla izolována RNA. RNA byla přepsána do cDNA, která byla použita do RT PCR reakce. Reakce probíhala s TPX2can\_Left1 a TPX2can\_Right1 oligomery. Následně byla provedena elektroforéza na 1% agaróze v TAE pufru. Vzorky, u kterých byla intenzita signálu stejná či vyšší v porovnání s expresí TPX2 v nemutantních rostlinách, byly vyřazeny (Obrázek 14). Pro KP1 konstrukt bylo negativních 16 vzorků s čísly: 5, 6, 13, 20, 28, 32, 50, 51, 70, 71, 76, 79, 80, 81, 82, 83. S konstruktem KP4 byly negativní 4 vzorky s čísly 8, 12, 15, 21.



**Obrázek 14:** Ověření exprese TPX2 v rostlinách *A. thaliana* transformovaných konstrukty KP1 a KP4 s oligomery TPX2can\_Left1/TPX2can\_Right1

**M** - GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder; **P** - pozitivní kontrola (pH7RWG2); **N** - negativní kontrola (voda). Červeně jsou označeny negativní vzorky, wt - „wild type“.

V tabulce 12 jsou zobrazeny pozitivní (+) a negativní (-) vzorky PCR reakce s oligomery TPXL5Left1/TPXL5Right1, 35sPrLeft2/35sPrRight2 a HygrLeft2/HygrRight2 a RT PCR reakce s TPX2can\_Left1/TPX2can\_Right1 oligomery. Červeně jsou označena čísla rostlin, které byly z experimentů vyřazeny.

**Tabulka 12:** DNA a RNA analýza rostlin transformovaných konstrukty KP1 a KP4

KP1	1	2	3	4	5	6	7	8	10	13	14	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	
TPXL5 L1/R1	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
35SPr L2/R2	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	
Hygr L2/R2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
TPX2can L1/R1	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	
	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	58	59		
TPXL5 L1/R1	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	
35SPr L2/R2	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	
Hygr L2/R2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	
TPX2can L1/R1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	
	60	61	62	63	64	65	66	67	68	70	71	72	73	74	75	76	78	79	80	81	82	83	86	87	88	89	90	
TPXL5 L1/R1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	
35SPr L2/R2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
Hygr L2/R2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
TPX2can L1/R1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	
KP4	1	4	5	6	8	9	12	13	14	15	16	18	21	22	23	24	25	26	27	28	32	33	34	35	36	37	38	39
TPXL5 L1/R1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	
35SPr L2/R2	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hygr L2/R2	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TPX2can L1/R1	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

## 5.1.6 Stanovení fertility mutantů

### 5.1.6.1 Alexandrův test a odbarvení šesulí mutantů *Arabidopsis thaliana*

TPX2 je aktivní v dělicích se tkáních a reprodukčních orgánech. Pro ověření zapojení TPX2 do buněčného dělení v průběhu meiózy byly pozitivním mutantním rostlinám sesbírány květní pupeny a šesule. Z květních pupenů byly izolovány prašníky, které byly nabarveny Alexandrovým barvivem. Pro každého mutantu bylo izolováno 6-10 prašníků. Preparáty byly pozorovány pod mikroskopem a pro každý prašník byl spočítán počet pylových zrn. Pro každou rostlinu byla vypočítána průměrná hodnota pylových zrn v prašníku a směrodatná odchylka. Při porovnání s „wild typem“ byla určena hraniční hodnota (<260 pylových zrn na rostlinu). Rostliny s menším průměrným počtem pylových zrn jsou v tabulce 13 vyznačeny červeně a poskytují informaci o možném zapojení TPX2 proteinu do vývoje pylu.

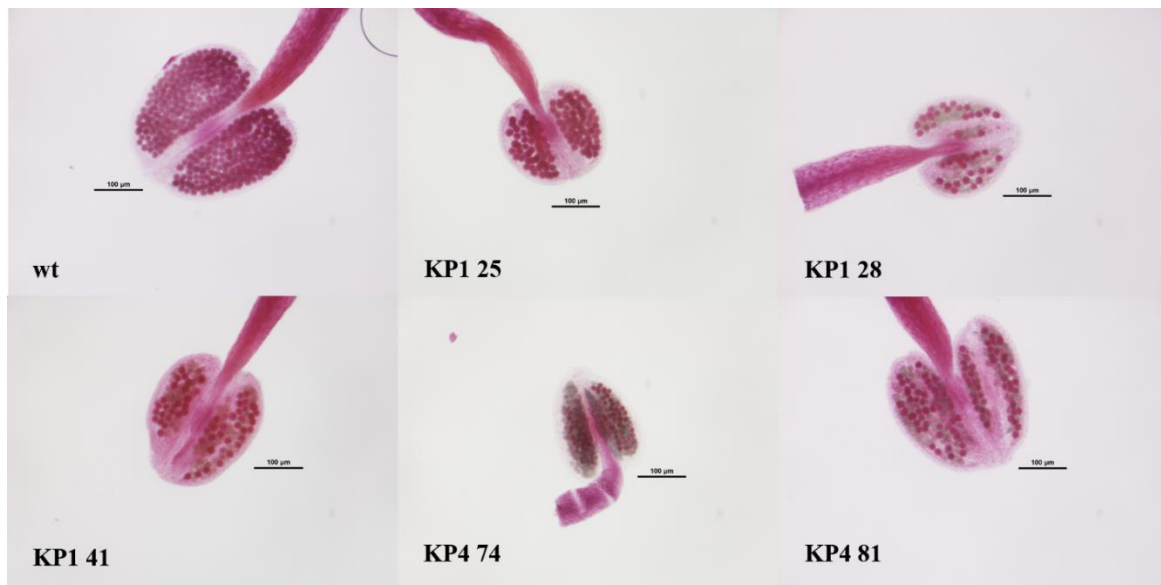
Dále byly posbírány 3-4 šesule pro každou rostlinu, které byly odbarveny chloralhydrátovým roztokem. U každé šesule byl spočítán počet semen a počet mezer, ve kterých se semena nenacházela. Byl spočítán průměrný počet semen v šesulích a směrodatná odchylka. Dále byl spočítán poměr počtu mezer/počet semen v šesulích jedné rostliny a počet mezer/součet semen a mezer. Při porovnání s „wild typem“ byly stanoveny hraniční hodnoty pro průměrný počet semen (<35) a pro poměr počet mezer/počet semen (>0,23). V tabulce 13 jsou červeně vyznačeny čísla rostlin, které se liší od stanovených hraničních hodnot.

Na základě statistiky byly vybrány rostliny, které v obou pozorovaných znacích vykazovaly výrazné odchýlení od „wild typu“. Pro konstrukt KP1 to byly rostliny č. 8, 17, 26, 34, 41, 62, 74, 81. Pro konstrukt KP4 byly vybrány rostliny č. 4, 8, 18, 32. Na obrázcích 15 a 16 jsou ukázány fotky některých mutantních rostlin z obou experimentů v porovnání s wt. Výsledky experimentů naznačují zapojení proteinu TPX2 do vývoje pylu a semen. Rostliny s nejsilnějším fenotypem budou použity k dalším experimentům.

**Tabulka 13: Hodnoty výpočtů pro Alexandrův test a odbarvení šesulí mutantů**

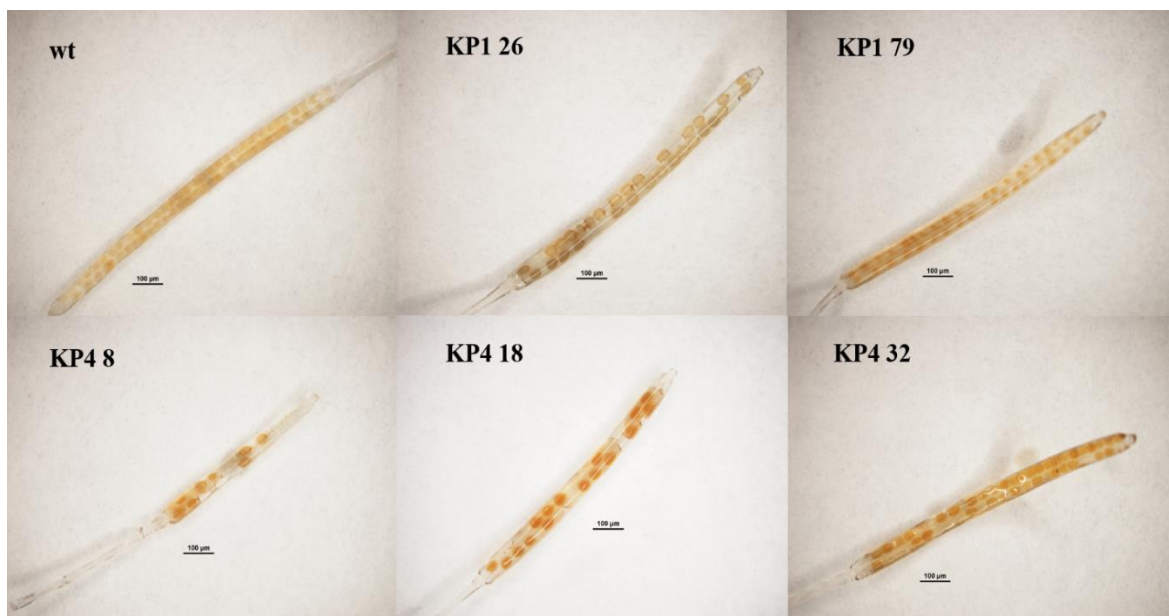
<b>KP1</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>10</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>18</b>	<b>20</b>	<b>21</b>	<b>22</b>
Počet pylových zrn průměr	372,5	335,4	360,6	327,2	222,3	113,6	302,2	273,3	232,1	-	173,7	-	216,1	336,8	311,2
Směrodatná odchylka	47,68	66,83	43,09	28,51	50,81	24,66	26,55	21,50	56,64	-	26,17	-	47,66	72,38	111,98
Počet semen průměr	48,3	39,7	56,7	59,3	44,3	17,3	60,0	52,3	49,7	40,7	20,7	23,0	-	58,0	33,0
Směrodatná odchylka	2,08	13,58	1,53	3,06	3,21	3,51	3,61	4,16	6,66	15,63	5,51	2,00	-	5,29	2,65
Počet mezer/počet semen	0,01	0,13	0,01	0,01	0,05	0,69	0,01	0,06	0,03	0,13	0,60	0,45	-	0,00	0,32
Počet mezer/součet	0,01	0,12	0,01	0,01	0,04	0,41	0,01	0,06	0,03	0,12	0,37	0,31	-	0,00	0,24
	<b>24</b>	<b>25</b>	<b>26</b>	<b>27</b>	<b>28</b>	<b>29</b>	<b>30</b>	<b>33</b>	<b>34</b>	<b>36</b>	<b>38</b>	<b>40</b>	<b>41</b>	<b>43</b>	<b>46</b>
Počet pylových zrn průměr	218,4	123,0	185,2	154,4	53,7	316,3	323,4	263,5	221,3	437,2	309,7	203,9	60,0	29,4	345,2
Směrodatná odchylka	45,89	14,78	13,16	23,14	13,19	14,90	88,54	40,46	56,26	78,32	37,01	38,73	11,05	34,00	63,09
Počet semen průměr	43,7	45,3	25,7	44,3	-	53,0	63,0	55,0	35,0	55,7	56,3	46,0	14,0	-	54,3
Směrodatná odchylka	3,06	10,02	4,51	10,97	-	6,08	6,08	2,65	2,65	7,64	9,29	2,65	2,65	-	8,96
Počet mezer/počet semen	0,11	0,01	0,35	0,03	-	0,02	0,03	0,06	0,27	0,05	0,01	0,05	1,88	-	0,07
Počet mezer/součet	0,10	0,01	0,26	0,03	-	0,02	0,03	0,06	0,21	0,05	0,01	0,05	0,65	-	0,06
	<b>47</b>	<b>49</b>	<b>51</b>	<b>52</b>	<b>58</b>	<b>59</b>	<b>60</b>	<b>61</b>	<b>62</b>	<b>63</b>	<b>64</b>	<b>65</b>	<b>66</b>	<b>67</b>	<b>70</b>
Počet pylových zrn průměr	281,3	353,5	288,7	-	-	341,8	318,3	281,7	213,7	259,2	377,2	272,9	365,6	342,5	397,3
Směrodatná odchylka	23,96	52,04	76,72	-	-	114,42	56,23	59,11	70,54	117,25	24,91	44,46	56,32	132,11	52,53
Počet semen průměr	60,7	48,0	47,7	58,7	44,0	56,7	63,0	45,3	34,7	53,0	60,0	33,3	30,0	44,7	61,0
Směrodatná odchylka	10,07	22,61	8,39	1,53	5,57	5,86	4,00	4,73	13,65	3,61	3,00	9,29	5,00	11,15	8,72
Počet mezer/počet semen	0,03	0,13	0,09	0,01	0,05	0,01	0,00	0,10	0,24	0,01	0,01	0,34	0,41	0,10	0,00
Počet mezer/součet	0,03	0,11	0,08	0,01	0,04	0,01	0,00	0,09	0,19	0,01	0,01	0,25	0,29	0,09	0,00
	<b>71</b>	<b>73</b>	<b>74</b>	<b>75</b>	<b>76</b>	<b>79</b>	<b>80</b>	<b>81</b>	<b>83</b>	<b>87</b>	<b>88</b>	<b>89</b>			
Počet pylových zrn průměr	-	311,3	111,6	294,3	258,0	286,8	294,8	133,8	335,7	400,8	239,7	239,7			
Směrodatná odchylka	-	46,82	17,92	35,16	31,35	50,04	39,47	25,22	36,98	26,24	32,62	44,91			
Počet semen průměr	42,0	33,7	27,3	53,3	57,7	33,3	57,3	24,7	60,0	52,3	49,7	57,3			
Směrodatná odchylka	11,36	8,50	5,51	3,21	7,57	4,16	6,43	3,06	7,00	3,21	12,10	6,43			
Počet mezer/počet semen	0,21	0,24	0,44	0,01	0,00	0,33	0,01	0,55	0,03	0,04	0,00	0,01			
Počet mezer/součet	0,18	0,19	0,31	0,01	0,00	0,25	0,01	0,36	0,03	0,04	0,00	0,01			
<b>KP4</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>18</b>	<b>21</b>	<b>22</b>	<b>24</b>	<b>26</b>	<b>28</b>
Počet pylových zrn průměr	-	437,50	420,63	77,17	493,00	-	429,00	221,50	429,33	250,50	-	187,56	407,10	354,50	123,44
Směrodatná odchylka	-	75,99	26,63	13,11	44,50	-	39,00	14,75	47,11	44,08	-	22,65	76,97	62,88	27,28
Počet semen průměr	18,3	55,3	45,7	27,0	54,7	46,7	47,0	46,3	51,7	29,7	42,3	42,7	52,3	54,7	40,7
Směrodatná odchylka	3,5	1,2	15,4	16,6	11,0	2,3	10,5	14,4	8,1	6,7	2,1	1,5	7,8	7,6	9,0
Počet mezer/počet semen	1,15	0,02	0,20	0,54	0,02	0,01	0,16	0,12	0,03	0,47	0,11	0,05	0,10	0,00	0,12
Počet mezer/součet	0,53	0,02	0,16	0,35	0,02	0,01	0,13	0,10	0,03	0,32	0,10	0,04	0,09	0,00	0,11
	<b>32</b>	<b>33</b>	<b>36</b>	<b>38</b>											
Počet pylových zrn průměr	256,25	289,00	360,67	431,33											
Směrodatná odchylka	87,39	56,18	59,93	42,09											
Počet semen průměr	19,0	44,3	65,0	59,7											
Směrodatná odchylka	6,1	8,4	4,4	10,7											
Počet mezer/počet semen	0,89	0,18	0,02	0,00											
Počet mezer/součet	0,47	0,15	0,02	0,00											





**Obrázek 15:** Alexandrovo barvení prašníků (Měřítka = 100 µm)

Mutantní rostliny měly snížený počet fertálních (fialových) pylových zrn v prašnících. Rostlina wt má v průměru 300 zrn v jednom prašníku. Stanovená hraniční hodnota byla průměrně <260 pylových zrn ve všech prašnících.



**Obrázek 16:** Odbarvení šesulí (Měřítka = 100 µm)

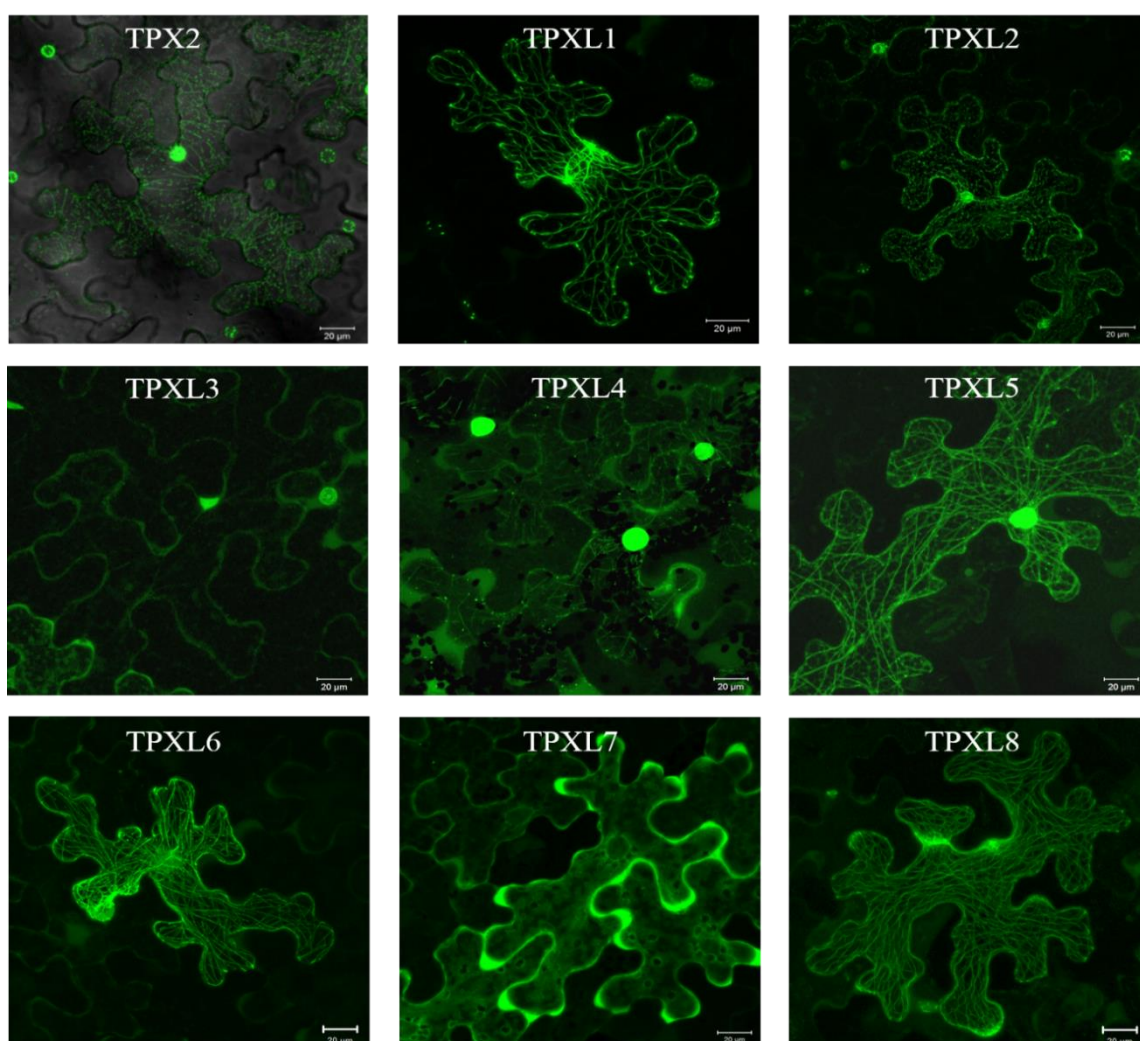
Mutantní rostliny měly snížený počet semen v šesulích. Rostlina wt má v jedné šesuli průměrně 40 semen. Stanovená hraniční hodnota pro mutantní rostliny byla průměrně <35 semen ve všech šesulích a pro poměr počet mezer/počet semen byla hodnota >0,23.

## 5.2. Regulace Aurora kinázy 1 ostatními členy TPX2 genové rodiny

### 5.2.1 Infiltrace listů *Nicotiana benthamiana*

Pro další experimenty bylo z TPX2 genové rodiny *Arabidopsis* vybráno 8 proteinů (TPXL1-8), které podle fylogenetické analýzy vykazovaly nejvyšší podobnost s kanonickým TPX2. U těchto proteinů byla zkoumána jejich lokalizace v buňce a kolokalizace s Aurora kinázou 1 a centromerickou variantou histonu H3 (CENH3).

Listy *N. benthamiana* byly infiltrovány bakteriemi *A. tumefaciens* nesoucími fúzní konstrukty. Pro sledování lokalizace v buňce byli jednotlivé proteiny TPX2 genové rodiny fúzovány se zeleným fluorescenčním proteinem (GFP). Přechodná exprese v *N. benthamiana* ukázala, že všechny zkoumané TPX2-like proteiny jsou lokalizovány v cytoplazmě. Kromě TPXL7, který se nacházel hlavně na jaderné membráně, byly všechny proteiny lokalizovány i v jádře. Na mikrotubulech byly přítomny proteiny TPXL1, 2, 4, 5, 6, 8 (Obrázek 17, Tabulka 14).

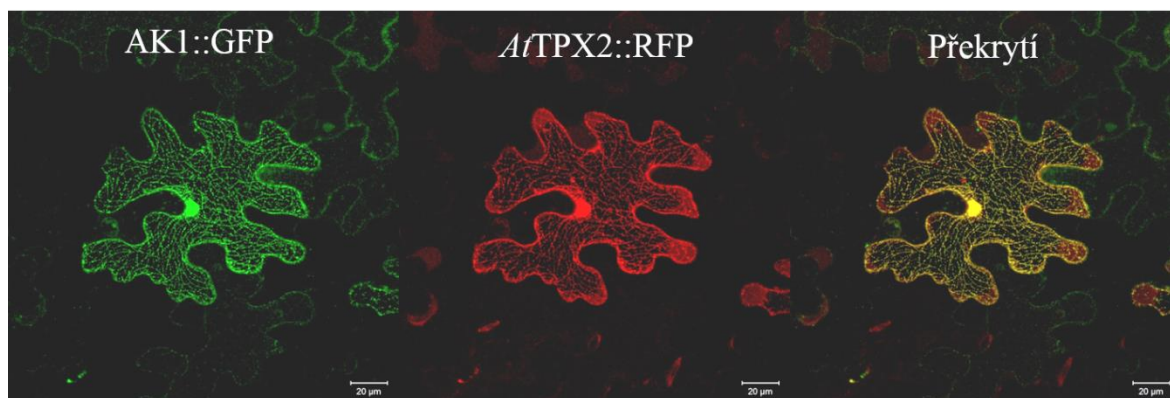


**Obrázek 17:** Lokalizace TPX2 a TPXL proteinů v buňce (Měřítko = 20 μm)

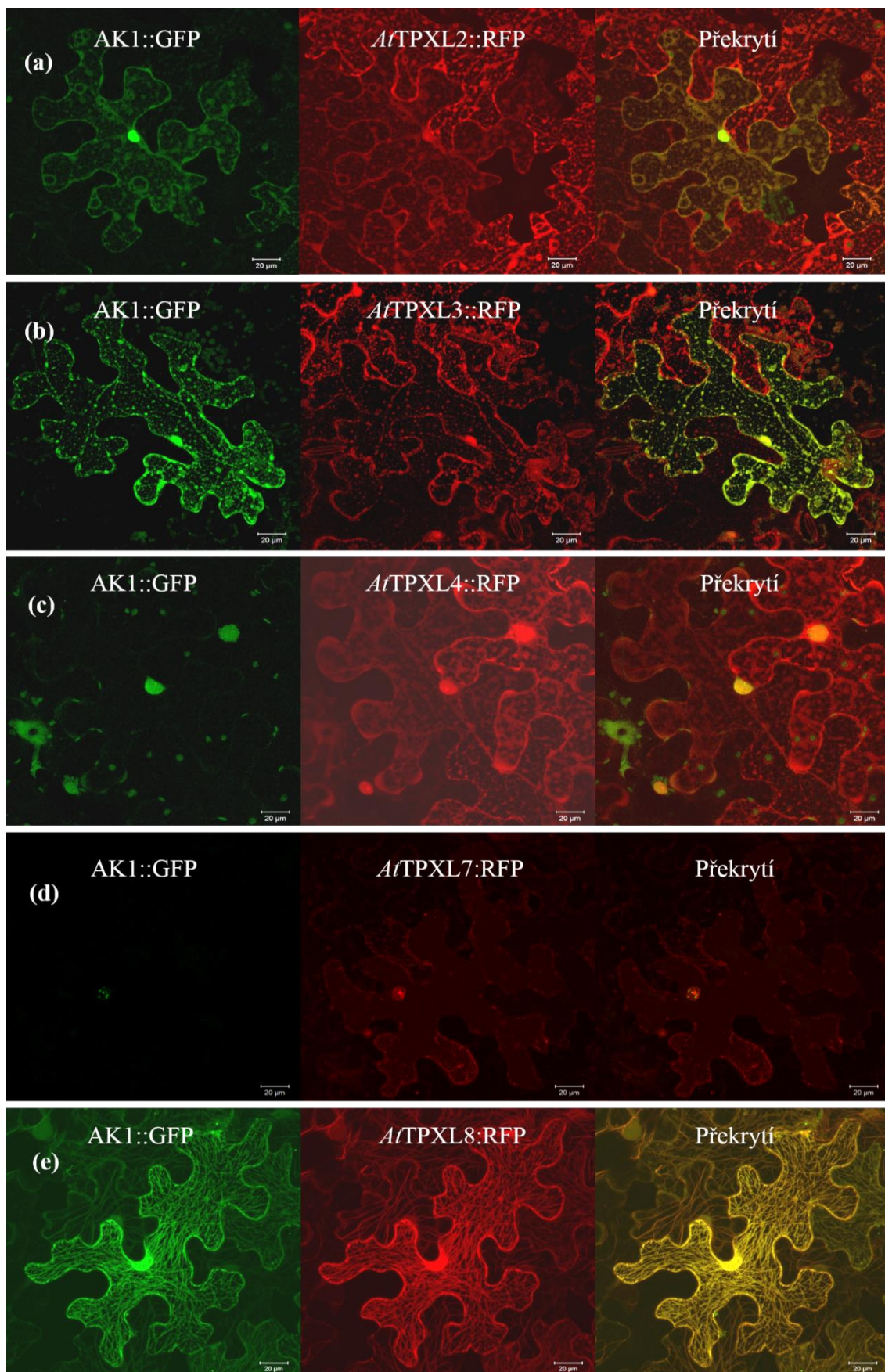
**Tabulka 14:** Rozmístění TPX2 a TPXL proteinů na mikrotubulech, v cytoplazmě a jádře

	Mikrotubuly	Cytoplazma	Jádro
TPX2	+	+	+
TPXL1	+	+	+
TPXL2	+	+	+
TPXL3		+	+
TPXL4	+	+	+
TPXL5	+	+	+
TPXL6	+	+	+
TPXL7		+	
TPXL8	+	+	+

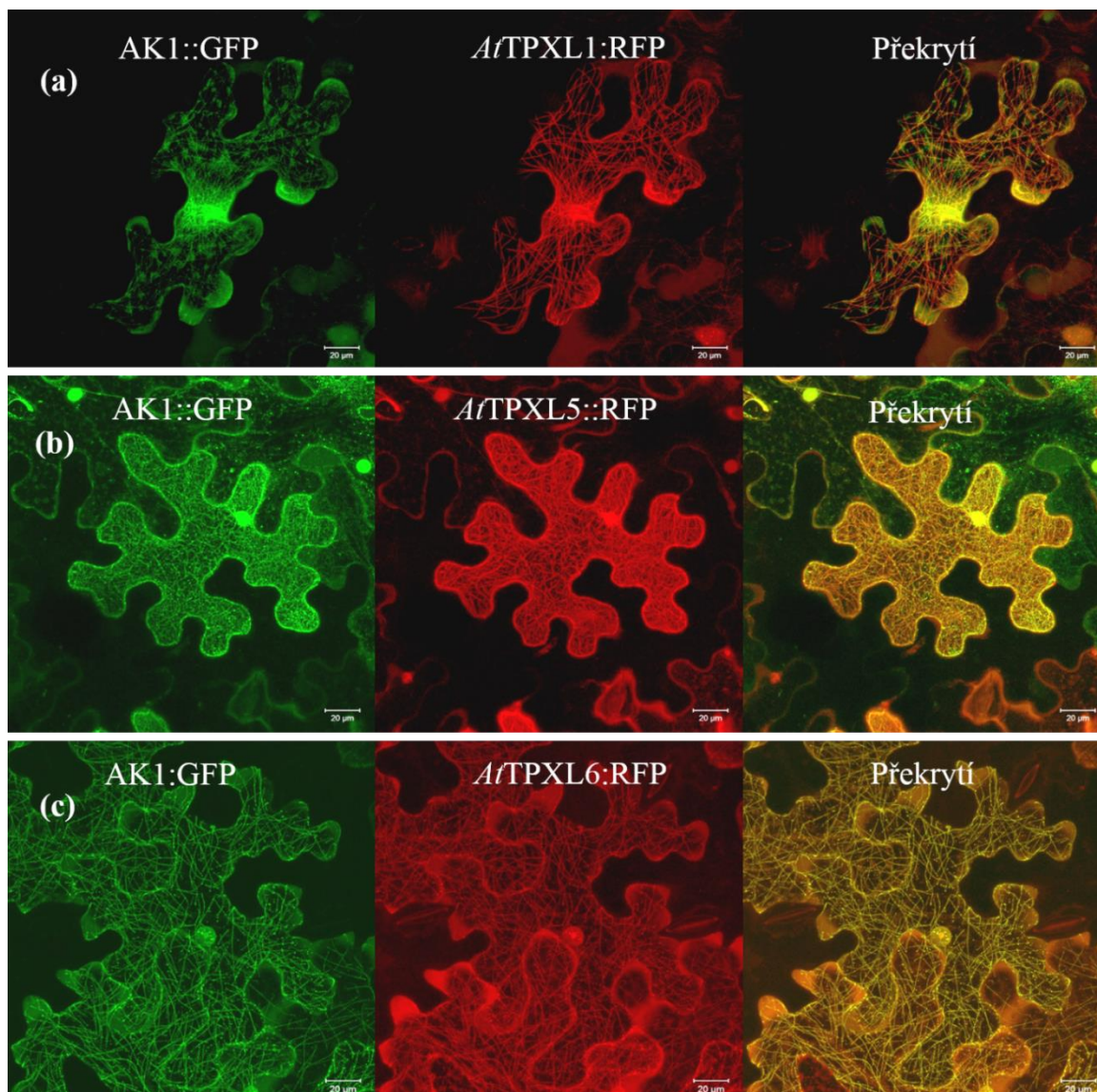
Při studiu kolokalizace s Aurora kinázou 1 byly TPXL proteiny fúzovány s GFP a Aurora kináza 1 s RFP. Z infiltrovaných listů *N. benthamiana* byly připraveny preparáty, které byly pozorovány na konfokálním laserovém skenovacím mikroskopu. Kolokalizace byla pozorována u proteinů TPXL2, 3, 4, 7, 8 (Obrázek 19), stejně tak jako u kanonického TPX2 (Obrázek 18). Naopak s Aurora kinázou 1 nekolokalizovaly proteiny TPXL1, 5, 6 (Obrázky 20).



**Obrázek 18:** Pozitivní kolokalizace Aurora kinázy 1 (AK1::GFP) s TPX2 (RFP) (Měřítko = 20  $\mu$ m)

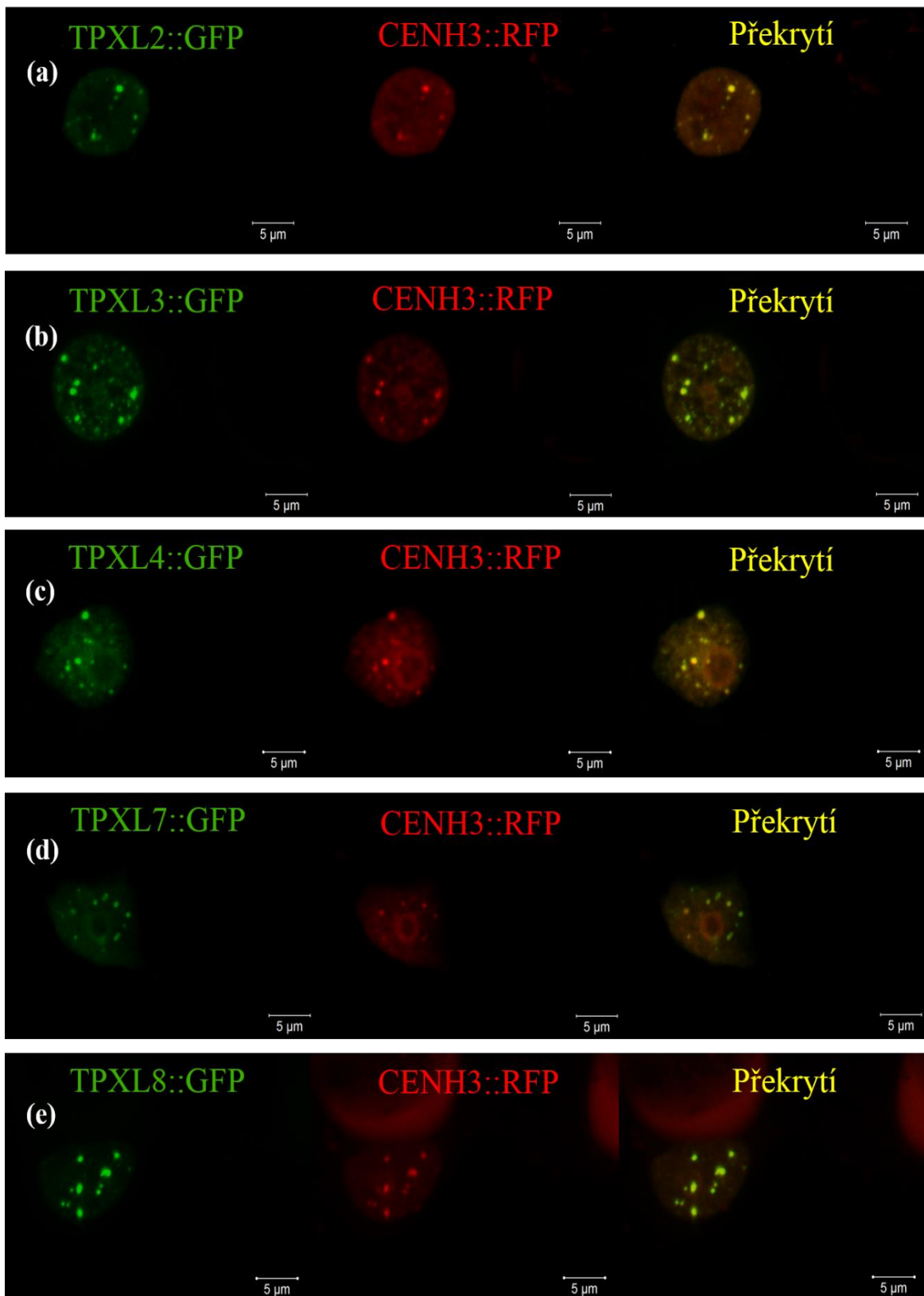


**Obrázek 19:** Pozitivní kolokalizace Aurora kinázy 1 (AK1::GFP) s (a) TPXL2; (b) TPXL3; (c) TPXL4; (d) TPXL7; (e) TPXL8 (Měřítko = 20 µm)

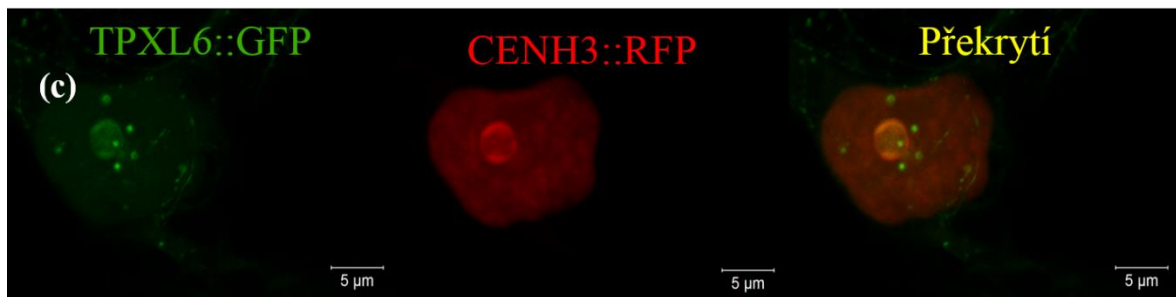
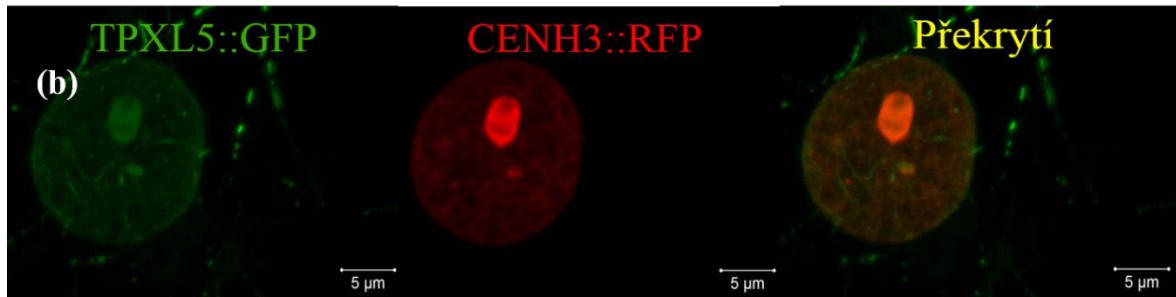
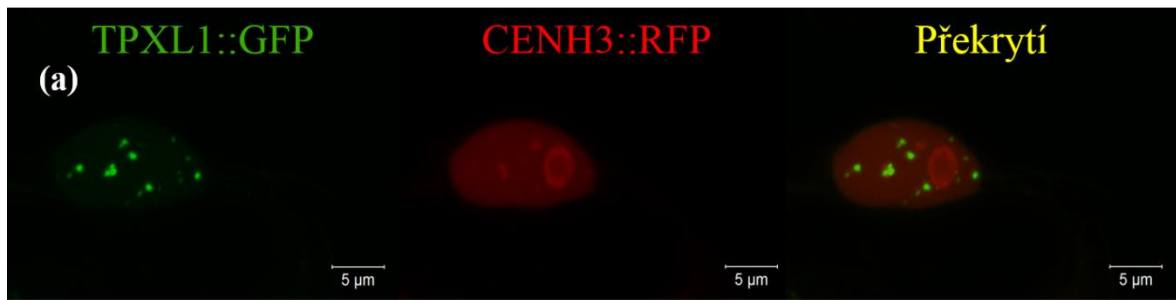


**Obrázek 20:** Negativní kolokalizace Aurora kinázy 1 (AK1::GFP) s (a) TPXL1; (b) TPXL5; (c) TPXL6 (Měřítko = 20 µm)

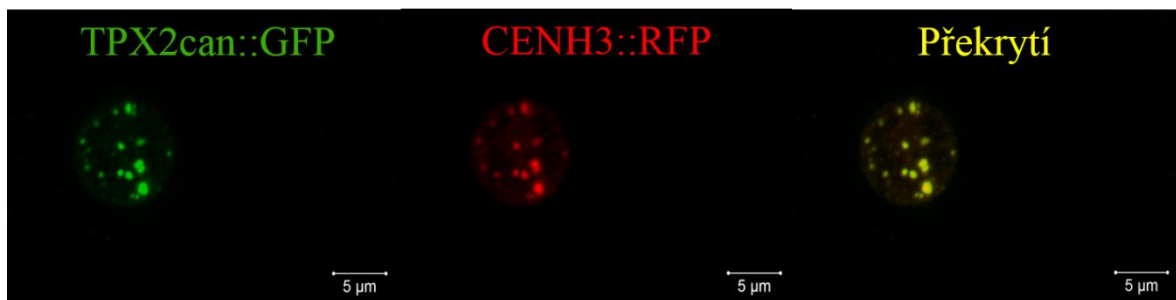
Na základě předchozích experimentů bylo prokázáno, že kanonický TPX2 (Petrovská *et al.*, 2013) a některé TPX2-*like* proteiny jsou lokalizovány jako tečky v buněčném jádře. Pro potvrzení, zda jsou proteiny lokalizovány na centromerách, které by mohly odpovídat této lokalizaci, byla sledována kolokalizace s centromerickou variantou histonu H3 (CENH3). TPXL proteiny byly fúzovány s GFP a CENH3 byl fúzován s RFP. Z transformovaných rostlin byly připraveny preparáty, které byly pozorovány na konfokálním laserovém skenovacím mikroskopu. Bylo zjištěno, že kanonický TPX2 (Obrázek 23) a TPXL2, 3, 4, 7, 8 kolokalizují s CENH3, což znamená, že se nachází na centromere (Obrázek 21). Naopak s CENH3 nekolokalizovaly proteiny TPXL1, 5, 6 (Obrázek 22).



**Obrázek 21:** Pozitivní kolokalizace CENH3::RFP s (a) TPXL2; (b) TPXL3; (c) TPXL4; (d) TPXL7; (e) TPXL8 (Měřitko = 5 μm)



**Obrázek 22:** Negativní kolokalizace CENH3::RFP s (a) TPXL1; (b) TPXL5; (c) TPXL6 (Měřítko = 5 μm)



**Obrázek 23:** Kolokalizace CENH3::RFP s TPX2can::GFP (Měřítko = 5 μm)

## 6 Diskuze

TPX2 protein je důležitou součástí buněčného dělení živočichů a stejně tak i rostlin. Spolu s Aurora kinázami se podílí na organizaci mitotického vřeténka, segregaci chromozomů a cytokinezi v dělicích se buňkách. TPX2 protein je doposud jediný popsáný aktivátor rostlinných Aurora kináz (Vos *et al.*, 2008). Na rozdíl od živočišných genomů kódujících pouze jeden TPX2 gen, však rostlinné genomy kódují několik TPX2-like proteinů pocházejících z různých genů (Vos *et al.*, 2008). Cílem této práce bylo umlčet kanonický TPX2 (At1g03780) v rostlinách *Arabidopsis thaliana*, k čemuž byla použita RNA interference. Z celkového počtu 108 rostlin bylo vyselektováno 12 rostlin (8 s KP1 konstruktem, 4 s KP4 konstruktem), u kterých byla potvrzena snížená exprese *AtTPX2* genu. U transformovaných rostlin F<sub>1</sub> generace nebyla pozorována gametofytická ani embryonální letalita, jako tomu bylo u homozygotních T-DNA mutantů (Vos *et al.*, 2008). Tato skutečnost by mohla být zapříčiněna tím, že při RNA interferenci zůstává zbytková aktivita genu.

U mutantních rostlin vykazujících odlišnou expresi TPX2 genu od „wild typu“ byl sledován efekt na meiotické dělení. Roli TPX2 v meióze nebyla doposud věnována velká pozornost. Potenciální funkce TPX2 proteinu při meióze živočichů byla potvrzena teprve nedávno v myších oocytech (Brunet *et al.*, 2008) a oocytech *Xenopus* (Helmke *et al.*, 2014). U rostlin nebyla meiotická funkce kanonického TPX2 popsána. Nicméně *AtTPX2* byl pozorován v jádře pylových tetrad (Dr. Twan Rutten, IPK Gatersleben, nepublikované výsledky) a homolog kanonického TPX2 byl přítomen také v meiocytech rýže (Collado-Romero *et al.*, 2014). Protože je *AtTPX2* známý pozitivní regulátor Aurora kinázy 1 (Tomašítková *et al.*, 2015), byl v experimentech zároveň pozorován efekt na aktivitu Aurora kinázy 1. V práci Demidov *et al.* (2014) byla potvrzena lokalizace všech tří *AtAurora* kináz v samčím gametofytu. Předpokládaný efekt umlčení TPX2 byl sledován na schopnosti RNAi rostlin tvořit fertillní pylová zrna a semena. U 12 rostlin se sníženou expresí TPX2 genu byly obě schopnosti výrazně sníženy, z čehož bylo usouzeno, že kanonický TPX2 má funkci během meiózy. Vzhledem k jeho roli při aktivaci Aurora kinázy 1 lze usuzovat, že pozorovaný efekt je důsledkem efektu na tuto kinázu. Dalším vysvětlením snížené tvorby pylových zrn a semen by mohlo být narušení nukleace mikrotubulů během tvorby dělicího vřeténka, která je jednou z hlavních funkcí *AtTPX2* (Vos *et al.*, 2008). Snížení aktivity TPX2 genu by také mohlo vést ke zpomalení rozpadu jaderné



mebrány, jako tomu bylo u *Tradescantia virginiana* po aplikaci protilátek proti TPX2 (Vos *et al.*, 2008).

Ke studiu regulace aktivity Aurora kinázy 1 ostatními členy TPX2 genové rodiny *A. thaliana* byly připraveny fúzní konstrukty s GFP a RFP proteiny, které byly použity pro transientní transformaci rostlin *N. benthamiana*. Z obsáhlé genové rodiny byly vybrány proteiny TPXL1-8, protože jsou podle fylogenetické analýzy nejbližší kanonickému TPX2. Nejdříve byla sledována lokalizace těchto proteinů v buňce. Proteiny TPXL1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 byly nejvíce zastoupeny v jádře. TPXL7 se nacházel na jaderném obalu a dalších membránách. Proteiny TPXL1, 2, 4, 5, 6, 8 byly navíc lokalizovány na mikrotubulech, což je v souladu s jejich strukturou, ve které se vyskytuje mikrotubuly vazebná doména. V cytoplazmě byly pozorovány všechny zkoumané proteiny. V práci Petrovská *et al.* (2013) byl nadměrně exprimovaný *AtTPX2* pozorován v buněčném jádře a na mikrotubulech. Zkoumané TPXL proteiny, až na TPXL7, vykazovaly podobnou lokalizaci jako kanonický TPX2, což napovídá tomu, že budou mít podobné vlastnosti.

Překvapivé byly výsledky kolokalizace TPXL proteinů s Aurora kinázou 1. Aurora kináza 1 se většinou nachází v jádře buňky, pokud však byla exprimována současně s TPX2-like proteiny, její lokalizace byla pozorována také na mikrotubulech. I přes absenci Aurora kináza vazebné domény kolokalizoval protein TPXL7 s *AtAurora1*. Dále byla pozorována kolokalizace u proteinů TPXL2, 3, 4, 8, v jejichž struktuře se nachází Aurora kináza vazebná doména (Tomašíková *et al.*, 2015). Na druhou stranu proteiny bez Aurora kináza vazebné domény (TPXL1, 5, 6) v experimentech neprokázaly stejnou lokalizaci jako *AtAurora1*. Aurora kináza vazebná doména TPX2-like proteinů je schopná vazby a aktivace  $\alpha$  Aurora kináz (Tomašíková *et al.*, 2015). Z experimentů vyplývá, že přítomnost této domény v proteinech ovlivňuje jejich lokalizaci v buňce. Stejná lokalizace některých TPXL proteinů s *AtAurora1* naznačuje možnou regulaci aktivity této kinázy. Zbývá však určit, zda všechny TPXL proteiny s Aurora kináza vazebnou doménou jsou schopny kinázu aktivovat a regulovat.

Je známo, že Aurora kinázy jsou součástí proteinového komplexu lokalizovaného na centromerách a složení tohoto komplexu rozhoduje o správné funkci kinetochorů. Konkrétně *AtAurora1* reguluje správné připojení kinetochoru k mitrotubulům (Kurihara *et al.*, 2008) Protein TPX2 by mohl být jedním ze členů komplexu zodpovědný za přesné načasování aktivity Aurora kináz a/nebo za složení celého komplexu. V interfázi jsou *AtAurora1* a *AtAurora2* lokalizovány v jádře. Po vstupu do mitózy asociují s mikrotubuly vřeténka v perinukleárním prostoru, zatímco *AtAurora3* je přímo lokalizována

na centromerách (Demidov *et al.*, 2005). Nicméně během mitózy se také *AtAurora1*, často spojená s mikrotubuly, překrývá s *AtAurora3* na centromeře. Protože je u Aurora kinázy 1 předpokládána funkce spojená s centromerou, byla testována kolokalizace TPXL proteinů s centromerickou histonovou variantou CENH3. V experimentech byla prokázána kolokalizace *AtTPX2* a TPXL2, 3, 4, 7, 8 s proteinem CENH3 v jádrech zkoumaných buněk. Proteiny TPXL1, 5, 6 s CENH3 nekolokalizovaly. Tato skutečnost by mohla být vysvětlena tím, že ve své struktuře nemají Aurora kináza vazebnou doménu a jejich funkce bude proto pravděpodobně odlišná od ostatních proteinů, které doménu mají a byly pozorovány na centromeře. Neočekávaně, navzdory nepřítomnosti Aurora kináza vazebné domény, TPXL7 vykazoval částečnou lokalizaci s centromerou. Již bylo zjištěno, že *AtTPX2* aktivuje *AtAurora1* a stimuluje její fosforylační aktivitu směrem k histonu H3 *in vitro* (Tomašítková *et al.*, 2015), který je klíčovým substrátem kináz na centromeře a prochází fosforylací závislé na buněčném cyklu (Kurihara *et al.*, 2006). Aurora kinázy fosforylují histon H3 na serinu 10 a serinu 28, což může sloužit jako rozpoznávací signál pro další proteiny nebo proteinové komplexy. Přesný mechanismus aktivace kináz zatím není znám, stejně tak jako není známo, zda existuje nějaký efekt aktivace kinázy na strukturu chromatinu v centromerách. Výsledky naznačují, že proteiny TPX2-like genové rodiny v *A. thaliana* budou mít díky své různé lokalizaci i různé funkce v buňce.

## 7 Závěr

V diplomové práci byla vypracována literární rešerše na téma TPX2 protein a Aurora kinázy u živočichů a rostlin. V experimentální části byla pomocí RNA interference snížena exprese TPX2 genu ve 12 rostlinách *Arabidopsis thaliana*. Nejdříve byly připraveny RNAi konstrukty se dvěma různými genově specifickými sekvencemi, které byly klonovány pomocí Gateway technologie, transformovány do bakterií *Agrobacterium tumefaciens* a následně s nimi byly transformovány rostliny. V generaci F<sub>1</sub> transformovaných rostlin byla ověřována přítomnost RNAi konstruktů v rostlinách pomocí polymerázové řetězové reakce. Exprese TPX2 genu oproti „wild typu“ byla sledována s využitím RT PCR reakce. Dále byl u rostlin zkoumán vliv umlčení TPX2 genu na fenotyp rostlin, zejména ve funkci s Aurora kinázou 1. Rostliny s umlčeným genem tvořily v průměru méně fertálních pylových zrn a semen, proto se předpokládá, že se TPX2 spolu s Aurora kinázou 1 může podílet na tvorbě pylových zrn a semen v průběhu meiózy.

Ve druhé části diplomové práce byla zkoumána lokalizace osmi TPX2-like proteinů v buňce a jejich kolokalizace s Aurora kinázou 1 a centromerickou variantou histonu H3 (CENH3) pomocí infiltrace listů rostlin *Nicotiana benthamiana*. Většina TPX2-like proteinů vykazovala lokalizaci na mikrotubulech, v cytosolu a kromě TPXL7 i v jádře. S Aurora kinázou 1 a CENH3 kolokalizovaly proteiny TPXL2, 3, 4, 7, 8. Proteiny TPXL1, 5, 6, které ve své struktuře neobsahují Aurora kináza vazebnou doménu, neukázaly stejnou lokalizaci jako *AtAurora1* ani CENH3. Výjimkou byl protein TPXL7, který vykazoval kolokalizaci v obou experimentech, ačkoliv nemá zmíněnou doménu. Dohromady výsledky poukazují na funkční rozdílnost TPX2 genové rodiny v *Arabidopsis* a naznačují možné zapojení TPX2-like proteinů do regulace aktivity Aurora kinázy.

## 8 Seznam použitých zkratek

<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
AGI	Arabidopsis Genome Initiative
CATMA	Complet Arabidopsis Transcriptome Micro Array
cDNA	Komplementární DNA
CENH3	Centromerický histon H3 (Centromeric histon H3)
CPC	Chromosome passenger complex
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
dNTPs	Deoxyribonukleozidtrifosfáty
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
F	Vedoucí primer (forward)
gDNA	Genomická DNA
GDP	Guanozindifosfát
GFP	Zelený fluorescenční protein (Green fluorescent protein)
GTP	Guanozintrifosfát
GTPáza	Guanozin trifosfatáza
INCENP	Protein vnitřní centromery (Inner centromere protein)
kb	kilo báze
kDa	kilo Dalton
LB	Luria-Bertani
MAP	S mikrotubuly asociovaný protein (Microtubule associated protein)
MS	Murashige & Skoog
<i>N. benthamiana</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>
NES	Jaderný exportní signál (Nuclear export signal)
NLS	Jaderný lokalizační signál (Nuclear localization signal)
OD	Optická hustota (Odds ratio)
pb	Pár bází
PCR	Polymerázová řetězová reakce (Polymerase chain reaction)

PP1	Protein fosfatáza 1 (Protein phosphatase 1)
R	Zpětný primer (reverse)
Ran	Ras-related nuclear protein
RanGAP	GTPázy aktivující protein (GTPase activating protein)
RCC1	Regulátor kondenzace chromozomů 1 (Regulator of chromosome condensation 1)
RFP	Červený flourescenční protein (Red fluorescent protein)
RNA	Ribonukleová kyselina
rpm	Otáčky za minutu
RT PCR	Polymerázová řetězová reakce s reverzní transkriptázou (Reverse transcription polymerase chain reaction)
SAFs	Faktory složení vřeténka (Spindle assembly factors)
Ser	Serin
TAE	Tris-acetát-EDTA
Thr	Threonin
TPX2	Targeting protein for Xklp2
TPX2can	kanonický TPX2
TPXL	TPX2- <i>like</i> protein
wt	Divoký typ (wild type)
Xklp2	Xenopus kinesin- <i>like</i> protein
YEB	Yeast extract broth

## 9 Seznam použité literatury

- Adams R. R., Carmena M., Earnshaw W. C. (2001):** Chromosomal passengers and the (aurora) ABCs of mitosis. *Trends Cell Biol.* 11, 49-54.
- Aguirre-Portolés 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 Res.* 72: 1518–1528.
- Alfonso O., Figueiredo A. C., Maiato H. (2016):** Late mitotic functions of Aurora kinases. *Chromosoma.* doi:10.1007/s00412-016-0594-5.
- Anand S., Penrhyn-Lowe S., Venkitaraman A. R. (2003):** Aurora A amplification overrides the mitotic spindle assembly check-point, inducing resistance to Taxol. *Cancer Cell.* 3: 51–62.
- Anderson K., Yang J., Koretke K., Nurse K., Calamari A., Kirkpatrick R. B., Patrick D., Silva D., Tummino P. J., Copeland R. A., Lai Z. (2007):** Binding of TPX2 to Aurora A alters substrate and inhibitor interactions. *Biochemistry.* 46(36):10287-95.
- Bai M., Ni J., Wu J., Wang B., Shen S., Yu L. (2014):** A novel mechanism for activation of Aurora-A kinase by Ajuba. *Gene* 543: 133-139.
- Balchand S. K., Mann B. J., Titus J., Ross J. L., Wadsworth P. (2015):** TPX2 inhibits Eg5 by interactions with both motor and microtubule. *J Biol Chem.* 290(28): 17367-17379.
- Barros T. P., Kinoshita K., Hyman A. A., Raff J. W. (2005):** Aurora A activates D-TACC–Mps complexes exclusively at centrosomes to stabilize centrosomal microtubules. *Journal of Cell Biology.* 170, 1039–1046.
- Bayliss R., Fry A., Haq T., Yeoh S. (2012):** On the molecular mechanisms of mitotic kinase activation. *Open Biol.* 2: 120136.
- Bayliss R., Sardon T., Ebert J., Lindner D., Vernos I., Conti E. (2004):** Determinants for Aurora A activation and Aurora B discrimination by TPX2. *Cell cycle.* 3(4): 404-7.
- Bayliss R., Sardon T., Vernos I., Conti E. (2003):** Structural basis of Aurora-A activation by TPX2 at the mitotic spindle. *Mol Cell.* 12: 851-862.
- Beggins S., Severin F. F., Bhalla N., Sassoon I., Hyman A. A., Murray A. W. (1999):** The conserved protein kinase Ipl1 regulates microtubule binding to kinetochore in budding yeast. *Genes Dev.* 13 (5): 532-44.
- Bolanos-Garcia, V. M. (2005):** Aurora kinases. *Int J Biochem Cell B.* 37: 1572-1577.
- Boruc J., Weimer A., Stoppin-Mellet V., Mylle E., Kosetsu K., Cedeno C., Jaquinod M., Njo M., De Milde L., Tompa P., Gonzalez N., Inze D., Beeckman T., Vantard M., van Damme D. (2016):** Phosphorylation of MAP65-1 by Arabidopsis Aurora kinases is required for efficient cell cycle progression. *Plant Physiology.* doi:10.1104/pp.16.01602.
- Brunet S., Dumont J., Lee K. W., Kinoshita K., Hikal P., Gruss O. J., Maro B., Verlhac M. H. (2008):** Meiotic Regulation of TPX2 Protein Levels Governs Cell Cycle Progression in Mouse Oocytes. *PloS ONE.* 3(10): e3338.
- Brunet S., Sardon T., Zimmerman T., Wittmann T., Pepperkok R., Karsenti E., Vernos I. (2004):** Characterization of the TPX2 domains involved in microtubule nucleation and spindle assembly in *Xenopus* egg extracts. *Mol Biol Cell.* 15: 5318-5328.

- Burkhard P., Stetefeld J., Strelkov S. V. (2001):** Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol.* 11(2): 82-8.
- Carmena M, Earnshaw W. C. (2003):** The cellular geography of aurora kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4(11): 842-54.
- Carmena M., Ruchaud S., Earnshaw W. C. (2009):** Making the Auroras glow: regulation of Aurora A and B kinase function by interacting proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 21: 796-805.
- Carmena M., Wheelock M., Funabiki H., Earnshaw W. C. (2012):** The chromosomal passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 13(12): 789-803.
- Castro A., Vigneron S., Bernis C., Labbe J. C., Prigent C., Lorca T. (2002):** The D-Box-activating domain (DAD) is a new proteolysis signal that stimulates the silent D-Box sequence of Aurora-A. *Embo Rep.* 3: 1209-1214.
- 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.
- Collado-Romero M., Alós E., Prieto P. (2014):** Unravelling the proteomic profile of rice meiocytes during early meiosis. *Front. Plant Sci.* 5: 356.
- Crosio C., Fimia G. M., Loury R., Kimura M., Okano Y., Zhou H., Sen S., Allis C. D., Sassone-Corsi P. (2002):** Mitotic Phosphorylation of Histone H3: Spatio-Temporal Regulation by Mammalian Aurora Kinases. *Mol Cell Biol.* 22(3): 874-885.
- De Luca M., Brunetto L., Asteriti I. A., Giubettini M., Lavia P., Guarguaglini G. (2008):** Aurora A and ch-TOG act in a common pathway in control of spindle pole integrity. *Oncogene.* 27: 6539–6549.
- Demidov D., Hesse S., Tewes A., Rutten T., Fuchs J., Ashtiyani R. K., Lein S., Fischer A., Reuter G., Houben A. (2009):** Aurora1 phosphorylation activity on histone H3 and its cross-talk with other post-translational histone modifications in *Arabidopsis*. *The Plant Journal.* 59: 221-230.
- Demidov D., Lermontova I., Weiss O., Fuchs J., Rutten T., Kumke K., Sharbel T. F., Van Damme D., Storme N. D., Greelen D., Houben A. (2014):** Altered expression of Aurora kinases in *Arabidopsis* results in aneu- and polyploidization. *Plant Jour.* 80: 449-461.
- Demidov D., Van Damme D., Greelen 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.
- Dewar H., Tanaka K., Nasmyth K., Tanaka T. U. (2004):** Tension between two kinetochores suffices for their bi-orientation on the mitotic spindle. *Nature.* 428: 93-97.
- Dieterich K, Soto Rifo R., Faure A. K., Hennebicq S., Ben Amar B., Zahi M, Perrin J, Martinez D., Séle B., Jouk P. S., Ohlmann T., Rousseaux S., Lunardi J., Ray P. F. (2007):** Homozygous mutation of AURKC yields large-headed polyploid spermatozoa and causes male sterility. *Nat Genet.* 39(5): 661-5.
- Du P., Kumar M., Yao Y., Xie Q., Wang J., Zhang B., Gan S., Wang Y., Wu A. (2016):** Genome-wide analysis of the TPX2 family proteins in *Eucalyptus grandis*. *BMC Genomics.* 17: 967.

- Eyers P. A., Erikson E., Chen L. G., Maller J. L. (2003):** A novel mechanism for activation of protein kinase Aurora A. *Curr Biol.* 13(8): 691-7.
- Fellmeth J. E., Gordon D., Robins C. E., Scott R. T., Treff N. R., Schindler K. (2015):** Expression and characterization of three Aurora kinase C splice variants found in human oocytes. *Mol Hum Reprod.* 21: 633-644.
- Gang X., Qian W., Zhang T., Yang X., Xia Q., Cheng D. (2017):** Aurora B kinase is required for cell cycle progression in silkworm. *Gene.* 599: 60-67.
- Garrett S., Auer K., Compton D. A., Kapoor T. M. (2002):** hTPX2 is required for normal spindle morphology and centrosome integrity during vertebrate cell division. *Curr Biol.* 12: 2055–2059
- Garrido G., Vernos I. (2016):** Non-centrosomal TPX2-Dependent Regulation of the Aurora A Kinase: Functional Implications for Healthy and Pathological Cell Division. *Front Oncol.* 6: 88.
- Giet R., Uzbekov R., Kireev I., Prigent C. (1999):** The *Xenopus laevis* centrosome aurora/Ipl1-related kinase. *Biol Cell.* 91: 461–470.
- Giubettini M., Asteriti I. A., Scrofani J., De Luca M., Lindon C., Lavia P., Guarguaglini G. (2011):** Control of Aurora A stability through interaction with TPX2. *J Cell Sci.* 124(1): 113-122.
- Glover D. M., Leibowitz M. H., McLean D. A., Parry H. (1995):** Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles. *Cell.* 81: 95–105.
- Goshima G. (2011):** Identification of a TPX2-Like Microtubule-Associated Protein in *Drosophila*. *Plos One.* 6: e28120.
- Goto H., Tomono Y., Ajiro K., Kosako H., Fujita M., Sakurai M., Okawa K., Iwamatsu A., Okigaki T., Takahashi T., Inagaki M. (1999):** Identification of a novel phosphorylation site on histone H3 coupled with mitotic chromosome condensation. *J Biol Chem.* 274(36): 25543-9.
- Goto H., Yasui Y., Nigg E. A., Inagaki M. (2002):** Aurora-B phosphorylates histone H3 at serine28 with regard to the mitotic chromosome condensation. *Genes Cells.* 7: 11-17.
- 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(1): 83-93.
- Gruss O. J., Vernos I. (2004):** The mechanism of spindle assembly: functions of Ran and its target TPX2. *J Cell Biol.* 166(7): 949–55.
- Gruss O. J., Wittmann M., Yokoyama H., Pepperkok R., Kufer T., Sillje H., Karsenti E., Mattaj I. W., Vernos I. (2002):** Chromosome-induced microtubule assembly mediated by TPX2 is required for spindle formation in HeLa cells. *Nat. Cell Biol.* 4: 871–879.
- Gurley L. R., D'Anna J. A., Barham S. S., Deaven L. L., Tobey R. A. (1978):** Histone phosphorylation and chromatin structure during mitosis in Chinese hamster cells. *Eur J Biochem.* 84(1): 1-15.
- Helmke K. J., Heald R. (2014):** TPX2 levels modulate meiotic spindle size and architecture in *Xenopus* egg extracts. *Journal of Cell Biology.* 206: 385-393.



- Hirota T., Kunitoku N., Sasayama T., Marumoto T., Zhang D. W., Nitta M., Hatakeyama K., Saya H., (2003):** Aurora-A and an interacting activator, the LIM protein Ajuba, are required for mitotic commitment in human cells. *Cell*. 114: 585-598.
- Hoar K., Chakravarty A., Rabino C., Wysong D., Bowman D., Roy N., Ecsedy J. A. (2007):** MLN8054, a small-molecule inhibitor of Aurora A, causes spindle pole and chromosome congression defects leading to aneuploidy. *Mol. Cell Biol*. 27: 4513-4525.
- Hochegger H., Hégarat N., Pereira-Leal J.B. (2013):** Aurora at the pole and equator: overlapping functions of Aurora kinase in the mitotic spindle. *Open Biol*. 3(3): 120185.
- Iyer J., and Tsai M. Y. (2012):** A novel role for TPX2 as a scaffold and co-activator protein of the Chromosomal Passenger Complex. *Cell Signal*. 24: 1677-1689.
- Jeyaprakash A. A., Klein U. R., Lindner D., Ebert J., Nigg E. A., Conti E. (2007):** Structure of a Survivin-Borealin-INCENP core complex reveals how chromosomal passengers travel together. *Cell*. 131(2):271-85.
- Johansen K. M., Johansen J. (2006):** Regulation of chromatin structure by histone H3S10 phosphorylation. *Chromosome Res*. 14: 393-404.
- Kahana J. A., Cleveland D. W. (2001):** Some importin news about spindle assembly. *Science*. 291: 1718-1719.
- Kahn O. I., Ha N., Baird M. A., Davidson M. W., Baas P. W. (2015):** TPX2 regulates neuronal morphology through kinesin-5 interaction. *Cytoskeleton*. 72: 340-348.
- Katayama H., Sasai K., Kawai H., Yuan Z. M., Bondaruk J., Suzuki F., (2004):** Phosphorylation by aurora kinase A induces Mdm2-mediated destabilization and inhibition of p53. *Nature Genetics*. 36: 55–62.
- 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 Mol Biol* 58: 1-13.
- Khan J., Ezan F., Cremet J. Y., Fautrel A., Gilot D., Lambert M., Benaud C., Troadec M. B., and Prigent C. (2011):** Overexpression of active Aurora-C kinase results in cell transformation and tumour formation. *Plos One* 6: e26512.
- Kimura M., Kotani S., Hattori T., Sumi N., Yoshioka T., Todokoro K., Okano Y. (1997):** Cell cycle-dependent expression and spindle pole localization of a novel human protein kinase, Aik, related to Aurora of *Drosophila* and yeast Ipl1. *J Biol Chem*. 272: 13 766–13 771.
- Kimura M., Matsuda Y., Yoshioka T., Sumi N., Okano Y. (1998):** Identification and characterization of STK12/Aik2: a human gene related to aurora of *Drosophila* and yeast IPL1. *Cytogenet. Cell Genet*. 82: 147–152.
- Kotwaliwale C. V., Frei S. B., Stern B. M., Biggins S. (2007):** A pathway containing the Ipl1/Aurora protein kinase and the spindle midzone protein Ase1 regulates yeast spindle assembly. *Dev Cell*. 13(3): 433-45.
- Krenn V., Musacchio A. (2015):** The Aurora B kinase in chromosome bi-orientation and spindle checkpoint signaling. *Front Oncol*. 5: 225.
- Kufer T. A., Nigg E. A., Silljé H. H. W. (2003):** Regulation of Aurora A kinase in the mitotic spindle. *Chromosoma*. 112: 159-163.

- Kurihara D., Matsunaga S., Kawabe A., Fujimoto S., Noda M, Uchiyama S, Fukui K. (2006):** Aurora kinase is required for chromosome segregation in tobacco BY-2 cells. *Plant J.* 48(4): 572-80.
- Kurihara D., Sachihiro M., Uchiyama S., Fukui K. (2008):** Live cell imaging reveals plant aurora kinase has dual roles during mitosis. *Plant Cell Physiol.* 49: 1256-1261.
- 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.
- Lens S. M., Voest E. E., Medema R. H. (2010):** Shared and separate functions of polo-like kinases and aurora kinases in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 10: 825–841.
- Li X., Sakashita G., Matsuzaki H., Sugimoto K., Kimura K., Hanaoka F. (2004):** Direct association with inner centromere protein (INCENP) activates the novel chromosomal passenger protein, Aurora-C. *Journal of Biological Chemistry.* 279: 47201–47211.
- Ma N., Titus J., Gable A., Ross J.L., Wadsworth P. (2011):** TPX2 regulates the localization and activity of Eg5 in the mammalian mitotic spindle. *Journal of Cell Biology.* 195: 87-98.
- Meyer R. E., Chuong H. H., Hild M., Hansen C. L., Kniter M., Dawson D. S. (2015):** Ipl1/Aurora-B is necessary for kinetochore restructuring in meiosis I in *Sacharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell.* 26(17): 2986-3000.
- Monda J. K., Cheeseman I. M. (2015):** Chromosome Segregation: A Spatial Code to Correct Kinetochore-Microtubule Attachments. *Curr Biol.* 25: R601-R603.
- Murata-Hori, M., Wang, Y. (2002):** The kinase activity of Aurora Bis required for kinetochore-microtubule interactions during mitosis. *Current Biology.* 12: 894–899.
- Neumayer G., Helfricht A., Shim S. Y., Le H. T., Lundin C., Belzil C., Chansard M., Yu Y., Lees-Miller S. P., Gruss O. J. (2012):** Targeting protein for xenopus kinesin-like protein 2 (TPX2) regulates gamma-histone 2AX (gamma-H2AX) levels upon ionizing radiation. *J Biol Chem.* 287(50): 42206–22.
- Nguyen H. G., Chinnappan D., Urano T., Ravid K. (2005):** Mechanism of aurora-B degradation and its dependency on intact KEN and A-boxes: Identification of an aneuploidy-promoting property. *Molecular and Cellular Biology.* 25, 4977-4992.
- O'Brien L. L., Wiese C. (2006):** TPX2 is required for postmitotic nuclear assembly in cell-free *Xenopus laevis* egg extracts. *Journal of Cell Biology* 173: 685-694.
- Ozlu N., Srayko M., Kinoshita K., Habermann B., O'Toole E.T., Muller-Reichert T., Schmalz N., Desai A., and Hyman A.A. (2005):** An essential function of the *C. elegans* ortholog of TPX2 is to localize activated aurora A kinase to mitotic spindles. *Dev Cell.* 9: 237-248.
- 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., Kohoutová L., Cenklová V., Pochylová Z., Gelová Z., Kocarová G., Vachová L., Kurejová M., Tomašítková E., Binarová P. (2013):** Overexpressed TPX2 causes ectopic formation of microtubular arrays in the nuclei of acentrosomal plant cells. *J Exp Bot.* 64: 4575-4587.
- Petry S. (2016):** Mechanism of Mitotic Spindle Assembly. *Annu Rev Biochem.* 85: 659-683.
- Petry S., Groen A. C., Ishihara K., Mitchison T. J., Vale R. D. (2013):** Branching microtubule nucleation in *Xenopus* eggs extracts mediated by augmin and TPX2. *Cell.* 152: 768-777.
- Pfleger C. M., Kirschner M. W. (2000):** The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. *Gene Dev.* 14: 655-665.
- Prigent C., Dimitrov S. (2003):** Phosphorylation of serin 10 in histone H3, what for?. *J Cell Sci.* 116: 3677-3685.
- Rajangam A.S., Kumar M., Aspeborg H., Guerriero G., Arvestad L., Pansri P., Brown C.J.L., Hober S., Blomqvist K., Divne C., Ezcurra I., Mellerowicz E., Sundberg B., Bulone V., Teeri T.T. (2008):** MAP20, a Microtubule-Associated Protein in the Secondary Cell Walls of Hybrid Aspen, Is a Target of the Cellulose Synthesis Inhibitor 2,6-Dichlorobenzonitrile. *Plant Physiol.* 148: 1283-1294.
- Rogers E., Bishop J. D., Waddle J. A., Schumacher J. M., Lin R (2002):** The aurora kinase AIR-2 functions in the release of chromosome cohesion in *Caenorhabditis elegans* meiosis. *J Cell Biol.* 157(2): 219-29.
- Sakai H., Urano T., Ookata K., Kim M. H., Hirai Y., Saito M., Nojima Y., Ishikawa F., (2002):** MBD3 and HDAC1, two components of the NuRD complex, are localized at Aurora-A-positive centrosomes in M phase. *Journal of Biological Chemistry.* 277: 48714-48723.
- Sanchez-Pulido L., Perez L., Kuhn S., Vernos I., Andrade-Navarro M. A. (2016):** The C-terminal domain of TPX2 is made of alpha-helical tandem repeats. *BMC Structural Biology.* 1-8.
- Sasai K., Katayama H., Hawke D. H., Sen S. (2016):** Aurora-C Interactions with Survivin and INCENP Reveal Shared and Distinct Features Compared with Aurora-B Chromosome Passenger Protein Complex. *PloS One.* 11(6): e0157305.
- Schmit A.C., Vantard M., Lambert A.M. (1985):** Microtubule and F-actin rearrangement during the initiation of mitosis in acentriolar higher plant cells. *Cell Motility: Mechanism and Regulation*, Ishikawa H., Hatano S., Sato H., eds (Tokyo: University of Tokyo Press), pp.415-433.
- Schumacher J. M., Golden A., Donovan P. J. (1998):** AIR-2: an Aurora/Ipl1-related protein kinase associated with chromosomes and midbody microtubules is required for polar body extrusion and cytokinesis in *Caenorhabditis elegans* embryos. *J Cell Biol.* 143: 1635–1646.
- Slattery S. D., Moore R. V., Brinkley B. R., Hall R. M. (2008):** Aurora-C and Aurora-B share phosphorylation and regulation of CENP-A and Borealin during mitosis. *Cell Cycle.* 7: 787-795.

- Smith E., Hegarat N., Vesely C., Roseboom I., Larch C., Streicher H., Straatman K., Flynn H., Skehel M., Hirota T., Kuriyama R., Hochegger H. (2011):** Differential control of Eg5-dependent centrosome EMBO separation by Plk1 and Cdk1. *Embo J.* 30: 2233-2245.
- Sparkes I. A., Runions J., Kearns A., Hawes C. (2006):** Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. *Nat Protoc.* 1: 2019-2025.
- Stewart S., Fang G.W. (2005a):** Destruction box-dependent degradation of Aurora B is mediated by the anaphase-promoting complex/cyclosome and Cdh1. *Cancer Res.* 65: 8730-8735.
- Stewart S., Fang G. W. (2005b):** Anaphase-promoting complex/cyclosome controls the stability of TPX2 during mitotic exit. *Mol Cell Biol.* 25: 10516–10527
- 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 Mol Biol Rep.* 33: 1988-1995.
- Tseng T. C., Chen S. H., Hsu Y. P., Tang T. K. (1998):** Protein kinase profile of sperm and eggs: cloning and characterization of two novel testis-specific protein kinases (AIE1, AIE2) related to yeast and fly chromosome segregation regulators. *DNA Cell Biol.* 17(10): 823-33.
- Tulu U. S., Fagerstrom C., Ferenz N. P., Wadsworth P. (2006):** Molecular requirements for kinetochore-associated microtubule formation in mammalian cells. *Curr Biol.* 16: 536–541.
- Wadsworth P. (2015):** TPX2. *Curr Biol.* 21;25(24): R1156-8.
- Wei Y., Mizzen C. A., Cook R. G., Gorovsky M. A., Allis C. D. (1998):** Phosphorylation of histone H3 at serine 10 is correlated with chromosome condensation during mitosis and meiosis in *Tetrahymena*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(13): 7480-4.
- Wittmann T., Boleti H., Antony C., Karsenti E., and Vernos I. (1998):** Localization of the kinesin-like protein Xklp2 to spindle poles requires a leucine zipper, a microtubule-associated protein, and dynein. *J Cell Biol.* 143: 673-685.
- Wittmann T., Wilm M., Karsenti E., Vernos, I. (2000):** TPX2, a novel *Xenopus* MAP involved in spindle pole organization. *Journal of Cell Biology.* 149: 1405-1418.
- Yang K.T., Li S. K., Chang C.C., Tang C. J. C., Lin Y. N., Lee S. C., Tang T. K. (2010):** Aurora-C Kinase Deficiency Causes Cytokinesis Failure in Meiosis I and Production of Large Polyploid Oocytes in Mice. *Mol Biol Cell.* 21: 2371-2383.
- Zorba A., Buosi V., Kutter S., Kern N., Pontiggia F., Cho Y., Kern D. (2014):** Molecular mechanism of Aurora A kinase autophosphorylation and its activation by TPX2. *eLife.* 3: e02667.