

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2017

Bc. Kateřina Perníčková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Hledání interakčních partnerů cytoskeletálního
proteinu EB1c a jeho lokalizační analýza s využitím
moderních mikroskopických technik**

Diplomová práce

Bc. Kateřina Perníčková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2017

Vedoucí práce: Mgr. Anna Kuchařová, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky a za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne 27. 4. 2017

.....

SOUHRN

Cytoskelet je významnou částí eukaryotní buňky – hraje roli v buněčném dělení, transportu organel a makromolekul nebo v odpovědi na vnější podněty. V plnění jeho funkcí mu napomáhá také velké množství interagujících proteinů, mezi nimi i EB1c, jehož bližší charakteristika je hlavním předmětem této diplomové práce. Jako modelový organismus byla použita rostlina *Arabidopsis thaliana*.

Pomocí metody bimolekulární fluorescenční komplementace (BiFC) byly testovány potenciální interaktory proteinu EB1c určené na základě předchozích *in silico* studií. Výsledky mikroskopických studií agroinfiltrovaných listů tabáku ukázaly pravděpodobnou interakci s některými z nich. Za účelem potvrzení interakce byla připravena polyklonální anti-EB1c protilátka proti C-terminálnímu peptidu proteinu. Tato protilátka však při imunoprecipitační analýze a „whole-mount“ barvení nedetekovala protein EB1c.

Za účelem studia pohybu proteinu EB1c z jádra a do jádra byly rostliny *Arabidopsis* exprimující EB1c-GFP pod nativním promotorem kříženy s rostlinami exprimujícími fluorescenčně značený jaderný marker. Rovněž byly tyto rostliny spolu s rostlinami Col-0 a rostlinami exprimujícími EB1c-Dronpa pod nativním promotorem stabilně transformovány konstrukty pro vybrané jaderné markery. Vyselektované rostliny byly dopěstovány do další generace, jež bude předmětem dalšího výzkumu.

Také byl proveden pokus s depolymerizací mikrotubulů *Arabidopsis* a následné „whole-mount“ barvení pro vizualizaci mikrotubulů a proteinu EB1c. Výsledky experimentu naznačují, že depolymerizace mikrotubulů má vliv na lokalizaci EB1c na kortikálních mikrotubulech, nikoliv však na jadernou lokalizaci EB1c proteinu.

SUMMARY

Cytoskeleton is an important part of eukaryotic cells – it plays role in the cell division, cellular transport of organelles and macromolecules or in response to external stimuli. To fulfil its tasks, cytoskeleton cooperates with a large number of interacting proteins including EB1c which is the main object of this diploma thesis. As a model organism, *Arabidopsis thaliana* was used.

With the help of Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) method potential EB1c interacting partners, identified in previous *in silico* studies, were tested. Microscopic studies of agroinfiltrated tobacco leaves showed possible interaction of EB1c with some of them. To prove these interactions, polyclonal antibody raised against EB1c C-terminal peptide was prepared. Unfortunately, our antibody did not target EB1c protein in the crude extract and we also did not manage to localize the EB1c protein in the seedlings satisfyingly.

To study EB1c nucleo-cytoplasmic shuttling during the cell-cycle, *Arabidopsis* plants expressing EB1c-GFP under the native promoter were crossed with plants expressing some fluorescence-tagged nuclear markers. Further, Col-0, EB1c-GFP and EB1c-Dronpa under the native promoter expressing plants were stably transformed with constructs for chosen nuclear markers. Second generation of selected first generation plants was obtained.

Finally, microtubule-depolymerizing experiment with subsequent whole-mount staining to visualize microtubules and EB1c in *Arabidopsis* was realized. Microtubule depolymerization significantly influenced EB1c localization on cortical microtubules but not EB1c localization in the nucleus.

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat především své školitelce Mgr. Anně Kuchařové, Ph.D., za její velikou pomoc a ochotu při zpracovávání této diplomové práce. Jsem moc ráda, že jsem s ní mohla pracovat. Také jsem vděčná všem vstřícným lidem z Oddělení buněčné biologie Centra regionu Haná za jejich rady a pomoc. Nakonec děkuji svým blízkým za jejich podporu.

This work was supported by the Czech Science Foundation (GACR) grant 14-27598P and by student project IGA PrF_2017_026.

Obsah

1	CÍL PRÁCE	8
2	ÚVOD	9
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	10
3.1	CYTOSKELET	10
3.1.1	<i>Intermediální filamenta</i>	10
3.1.2	<i>Mikrofilamenta</i>	11
3.1.3	<i>Mikrotubuly</i>	11
3.1.4	<i>Mikrotubulární buněčné struktury rostlin</i>	15
3.1.5	<i>Proteiny interagující s mikrotubuly</i>	16
3.2	BUNĚČNÝ CYKLUS	19
3.2.1	<i>Checkpoint proteiny</i>	21
3.2.2	<i>Acentrozomální mitóza</i>	23
3.3	MAP KINÁZY	25
3.4	STANOVENÍ PROTEINOVÝCH INTERAKCÍ	26
3.4.1	<i>Biochemické metody</i>	26
3.4.2	<i>Mikroskopické metody</i>	27
3.4.3	<i>Jiné metody</i>	28
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	30
5	VÝSLEDKY	57
6	DISKUZE	81
7	ZÁVĚR	86
8	LITERATURA	88
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	101

1 CÍL PRÁCE

Teoretická část

1. Vypracování literární rešerše na téma plus-koncových proteinů mikrotubulů.
2. Vypracování literární rešerše týkající se metod studia proteinových interakcí.

Praktická část

1. Klonování potencionálních interakčních partnerů EB1c a zvládnutí techniky BiFC s využitím infiltrace konstruktů do tabákových listů.
2. Zvládnutí práce s živým rostlinným materiálem.
3. Zvládnutí pokročilých mikroskopických technik a základních biochemických technik.

2 ÚVOD

Cytoskelet eukaryotické buňky sestává ze tří hlavních složek: mikrotubulů, mikrofilament a středních filament. Jeho úlohy jsou rozmanité a pro buňku životně důležité – umožňuje jí transportovat rozličný „náklad“ podél svých vláken na různá místa v cytoplazmě, je nezbytný pro správný průběh buněčného dělení nebo se uplatňuje při buněčné odpovědi na vnější podněty, přičemž mj. spolupracuje s intenzivně zkoumanými MAP kinázovými kaskádami. Své funkce by cytoskelet nemohl plnit, nebýt jeho dynamičnosti a schopnosti reorganizace. Struktura cytoskeletální sítě se výrazně mění v průběhu buněčného cyklu podle aktuálních potřeb buňky.

Vlastnosti a dynamika cytoskeletu jsou modulovány rozsáhlou řadou proteinů, mezi něž patří i plus-koncový protein EB1c. Ten kromě plus-konců mikrotubulů interaguje s mnoha dalšími proteiny a tím jim dává možnost na mikrotubuly také působit. Na důležitost EB1c poukazuje fakt, že v jeho nepřítomnosti dochází ke změnám v organizaci cytoskeletu a k defektům v buněčném dělení. Hlubší pochopení úlohy EB1c a jeho interakcí s vybranými proteiny v rostlinných buňkách bylo hlavním záměrem této diplomové práce.

Hojně používané metody pro studium proteinových interakcí jsou založeny mj. na využití specifických protilátek proti studovaným proteinům. Pro vizualizaci mohou být tyto protilátky fluorescenčně či jinak označeny. Proteinové interakce lze také studovat *in vivo*, např. pomocí BiFC metody.

V teoretické části této diplomové práce je zpracován přehled současných poznatků o cytoskeletu, proteinu EB1c a buněčném cyklu se zaměřením na rostlinnou buňku. Dále je uveden stručný popis některých metod studia proteinových interakcí. Experimentální část se pak zabývá praktickými pokusy prováděnými především za účelem nalezení interakčních partnerů proteinu EB1c.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Cytoskelet

Nedílnou součástí každé eukaryotní buňky je její cytoskelet. Jedná se o trojrozměrnou vysoce dynamickou síť proteinových vláken, jež buňce poskytují nejen mechanickou oporu (tato funkce má velký význam především v živočišných buňkách, neboť tyto postrádají buněčnou stěnu, jíž se vyznačují buňky rostlin), ale také hrají roli při buněčném dělení. Cytoskelet dále umožňuje vnitrobuněčný transport makromolekul a buněčných organel v rámci odpovědi na vnější podněty, a to ve spolupráci s tzv. motorovými proteiny, pohybujícími se podél cytoskeletálních vláken (de Keijzer *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2010). V buňkách eukaryotních organismů můžeme také pozorovat stabilní pohybové struktury – ať už se jedná o mikrotubulární bičíky (Lehti *et al.*, 2015), řasinky složené z aktinových vláken (Stewart *et al.*, 2016) nebo kontraktilní aparát svalových buněk tvořený aktinem a myozinem (Kampourakis *et al.*, 2016).

Cytoskeletální vlákna jsou tří typů: mikrotubuly, aktinová mikrofilamenta a intermediální (zvaná také střední) filamenta. První dva zmíněné lze nalézt ve všech eukaryotních buňkách. O intermediálních filamentech se mluví spíše v souvislosti s živočišnými buňkami, u rostlin byly už ale struktury podobné intermediálním filamentům také nalezeny (Fiserova *et Goldberg*, 2010; Graumann, 2014; Tamura *et al.*, 2015). Jednotlivé složky cytoskeletu se liší svou strukturou i funkcí.

3.1.1 Intermediální filamenta

Intermediální filamenta jsou vlákna o průměru přibližně 10 nm, v porovnání s aktinovými mikrofilamenty (o tloušťce 7 nm) a mikrotubuly (o průměru 25 nm) jsou tedy středně silná a odtud také pochází jejich název. Střední filamenta vytvářejí vedle svých dalších funkcí (Coulombe *et Wong*, 2004; Schweitzer *et Evans*, 1998; Styers *et al.*, 2005) jadernou laminu, nacházející se na vnitřní straně jaderné membrány a propůjčující této membráně mechanickou odolnost a pružnost (Fiserova *et Goldberg*, 2010). Lamina také interaguje s chromatin-vazebnými proteiny a je tak zapojena i do organizace chromatinu v jádře a regulace genové exprese (Fiserova *et Goldberg*, 2010; Tajik *et al.*, 2016). V rostlinných buňkách se zatím nepodařilo nalézt proteiny homologní k živočišným laminům (Fiserova *et Goldberg*, 2010; Tamura *et al.*, 2015), avšak byla již pozorována lamině podobná proteinová síť (Fiserova *et Goldberg*, 2010;

Goto *et al.*, 2014; Pawar *et al.*, 2016; Poulet *et al.*, 2016). Mezi kandidátní proteiny jaderné laminy u *Arabidopsis thaliana* patří i rostlinně specifický protein KAKU4, lokalizovaný na vnitřní straně jaderné membrány (Goto *et al.*, 2014). Nadměrná exprese KAKU4 vede ke zvýšenému růstu jaderné membrány a v důsledku toho k jejímu vchlípnutí a hromadění, přičemž stupeň deformace membrány je úměrný stupni exprese KAKU4 (Goto *et al.*, 2014). KAKU4 se spolu s dalšími proteiny zřejmě podílí na určování tvaru buněčného jádra (Goto *et al.*, 2014).

3.1.2 Mikrofilamenta

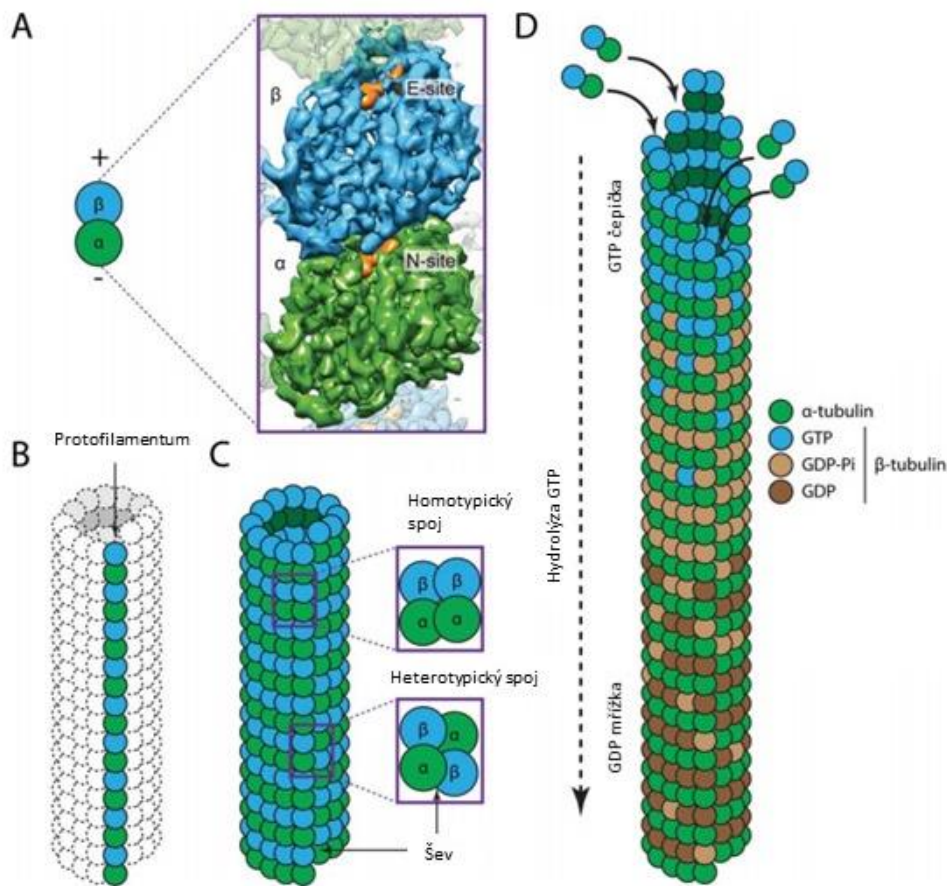
Aktinová vlákna bývají také nazývána mikrofilamenta, protože jsou to nejtenčí vlákna cytoskeletu – jejich průměr činí pouhých 7 nm. Jedno mikrofilamentum se skládá ze dvou vzájemně se obtáčejících řetězců fibrilárního aktinu (F-aktinu). Základní stavební jednotkou každého polymerního řetězce F-aktinu je globulární aktin (G-aktin) obsahující ATP-vazebnou doménu. Po vazbě monomerního G-aktinu na již vzniklý řetězec je ATP vázaný na G-aktin hydrolyzován na ADP, což vede k destabilizaci vazby mezi aktinovými podjednotkami. Pro růst vlákna je tedy nezbytné, aby docházelo k připojování nových podjednotek rychleji, než dochází k hydrolyze ATP, v opačném případě se vlákno začne rozpadat. Tvorba nových mikrofilament i jejich zánik nastává velice rychle a na mnoha místech v buňce současně – tento jev zvaný „stochastická dynamika“ popsali Staiger *et al.* (Staiger *et al.*, 2009). Polymerizace G-aktinu za vzniku F-aktinu může při vysoké koncentraci G-aktinu probíhat samovolně, avšak v živých buňkách jí zabráňují specifické regulační proteiny (Hussey *et al.*, 2006), konkrétně se jedná např. o profilin vázající aktinové monomery (Wang *et al.*, 2005).

V buňkách se nachází velké množství mikrofilament, která tak vytvářejí celé sítě nebo dávají vzniknout silnějším a pevnějším svazkům. Aktinový cytoskelet je důležitý pro vezikulární transport a polaritu buněk (Ringli *et al.*, 2002; von Wangenheim *et al.*, 2015) a také umožňuje organizované proudění cytoplazmy, tzv. cyklózu, podílející se na rovnoměrném šíření látek v cytoplazmě (Woodhouse *et al.*, 2013).

3.1.3 Mikrotubuly

Jak již bylo zmíněno, třetí složkou cytoskeletu jsou mikrotubuly, jejichž vnější průměr činí přibližně 25 nm (Choi *et al.*, 2009). Vnitřní průměr těchto dutých polymerních válcovitých struktur je 14 nm (Tilney *et al.*, 1973). Mikrotubulus se

obvykle skládá ze 13 podélně uložených protofilament, přičemž každé z nich vzniká polymerizací heterodimerů α - a β -tubulinu (viz Obr. 1B). Tyto heterodimery jsou základními stavebními jednotkami mikrotubulárního cytoskeletu. Mezi heterodimery jednotlivých protofilament dochází k homotypickým laterálním spojmům, kdy spolu interagují vždy dvě α - a dvě β -podjednotky, pouze mezi prvním a posledním protofilamentem nastává heterotypický spoj (interakce α -podjednotky se sousední β -podjednotkou; viz Obr. 1C) daný podélným posunem mezi protofilamenty (Vleugel *et al.*, 2016). V místě posunu tak vzniká tzv. šev, který se podílí na dynamice mikrotubulů, neboť může být místem jejich disociace či asociace (Vleugel *et al.*, 2016; Wade, 2009; Wade *et Hyman*, 1997).



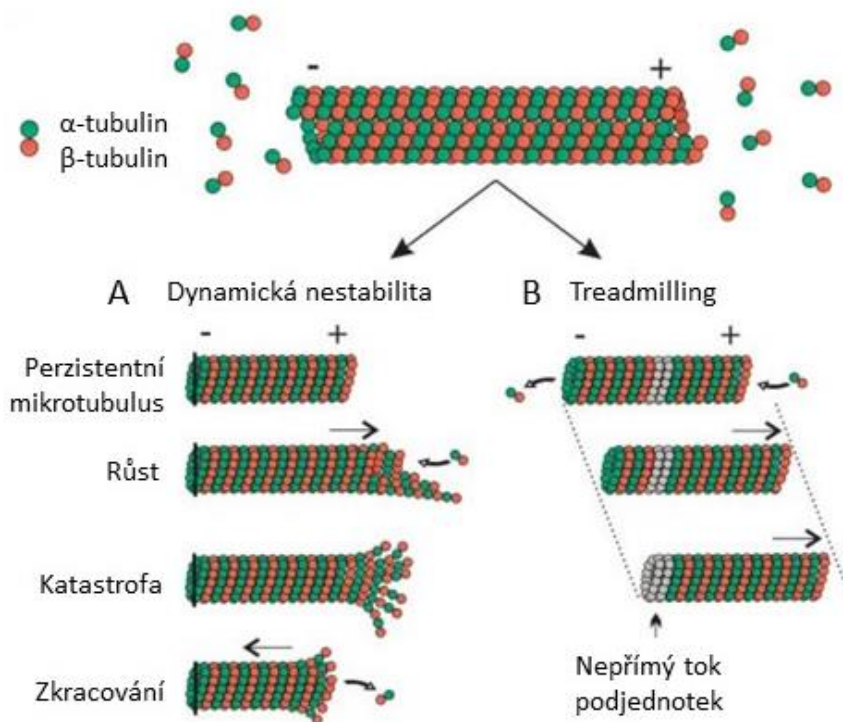
Obr. 1: Struktura a dynamika mikrotubulů. A) Tubulinový $\alpha\beta$ -heterodimer obsahuje 2 vazebná místa pro GTP, zvaná E-site a N-site. B) Mikrotubulus se skládá z podélně uložených protofilament tvořených tubulinovými heterodimery. C) Heterodimery jednotlivých protofilament spolu bočně interagují za vzniku homotypických a heterotypických spojů. V místě heterotypických spojů se vytváří tzv. šev. D) Mikrotubulus roste, pokud jsou tubulinové dimery inkorporovány do jeho struktury rychleji, než dochází k hydrolyze GTP. Na plus-konci mikrotubulu vzniká GTP čepička. Upraveno podle Vleugel *et al.* (2016).

Z prostorového uspořádání tubulinových heterodimerů v rámci protofilamenta vyplývá důležitá vlastnost mikrotubulů potřebná pro intracelulární transport – jejich polarita. Tubulinové heterodimery jsou orientovány svou α -podjednotkou směrem k tzv. minus-konci mikrotubulu a β -podjednotkou k jeho plus-konci (Vleugel *et al.*, 2016). Pojmenování obou konců se odvíjí od faktu, že plus-konec je dynamičtější než minus-konec, dochází zde tedy rychleji k růstu nebo naopak odbourávání mikrotubulu než v případě minus-konce.

Proces polymerizace mikrotubulů se do značné míry podobá polymerizaci aktinových vláken popsané v kapitole 3.1.2. Tubulinové heterodimery však na rozdíl od aktinových monomerů váží molekulu GTP, který může být hydrolyzován na GDP. Tento hydrolyzovatelný GTP nese β -podjednotka v tzv. E-místě, zatímco na α -podjednotce heterodimeru v tzv. N-místě je vázána molekula GTP, která nepodléhá hydrolyze a je skrytá mezi oběma podjednotkami (Vleugel *et al.*, 2016). Název obou míst vychází z jejich anglických termínů E-site (exchangeable) a N-site (nonexchangeable), z nichž je patrné, zda v daném místě může být GTP hydrolyzou zaměněn za GDP (viz Obr. 1A). Heterodimer nesoucí na β -podjednotce GDP je méně pevně vázán do protofilamenta než heterodimer nesoucí GTP, a to v důsledku konformační změny způsobené hydrolyzou GTP (Alushin *et al.*, 2014; Horio *et Murata*, 2014; Wade, 2009). Pokud jsou volné $\alpha\beta$ -heterodimery přidávány do vznikajícího mikrotubulu rychleji, než u nich nastane hydrolyza GTP, mikrotubulus roste, na jeho plus-konci se vytváří tzv. GTP-čepička, která zabraňuje depolymerizaci (viz Obr. 1D) (Dimitrov *et al.*, 2008; Piedra *et al.*, 2016). Teprve po inkorporaci heterodimeru do mikrotubulu je GTP na β -podjednotce hydrolyzován, což dává vzniknout mřížce obsahující na β -podjednotkách převážně GDP (Dimitrov *et al.*, 2008). Jsou-li však nové heterodimery integrovány do mikrotubulu pomaleji, pak po hydrolyze GTP dochází k destabilizaci vazeb mezi heterodimery v mikrotubulu, což vede k jeho odbourávání a zkracování. Přechod ze stavu polymerace do stavu depolymerace se nazývá katastrofa (viz Obr. 2A). V extrémním případě se může mikrotubulus zcela rozpadnout. Jestliže po katastrofě dojde k obnovení růstu mikrotubulu, hovoříme o jeho záchraně, „rescue“.

Proces neustálého přepínání mezi růstem a odbouráváním mikrotubulů se označuje jako dynamická nestabilita (Horio *et Murata*, 2014; Wade, 2009) a ve většině buněk je pozorovatelný pouze na plus-koncích mikrotubulů, protože tyto nejsou ukotvené na žádném místě buňky (viz Obr. 2A). Minus-konce bývají často ukotveny v tzv. mikrotubulárních nukleačních centrech, anglicky zvaných microtubule organizing

centres (MTOCs). Největším MTOC v buňkách živočichů je centrozóm, který se nachází přibližně na středu buňky, obsahuje dvě centrioly a především na své periferii značné množství mikrotubul-nukleačních prstenců tvořených malými a velkými γ -tubulinovými proteinovými komplexy (Fu *et al.*, 2015; Gaume *et al.*, 2015; Chavali *et al.*, 2015; O'Toole *et al.*, 2012). Malé a velké komplexy jsou tvořeny γ -tubulinem a také proteiny netubulinové povahy, tzv. GCP (γ -tubulin complex proteins; Kollman *et al.*, 2008). Z nukleačních center mikrotubuly vyrůstají směrem k okrajovějším částem buňky (Fu *et al.*, 2015; Gaume *et al.*, 2015; Chavali *et al.*, 2015; O'Toole *et al.*, 2012), a také napomáhají udržování vnitřního prostoru centrozómu bez mikrotubulů (O'Toole *et al.*, 2012). γ -tubulin také přispívá k vytváření správné morfologie konců mikrotubulů umístěných v centrozómu a hraje významnou úlohu v průběhu buněčného dělení, kdy zabraňuje centriolám v předčasném rozchodu k opačným pólům buňky (O'Toole *et al.*, 2012).



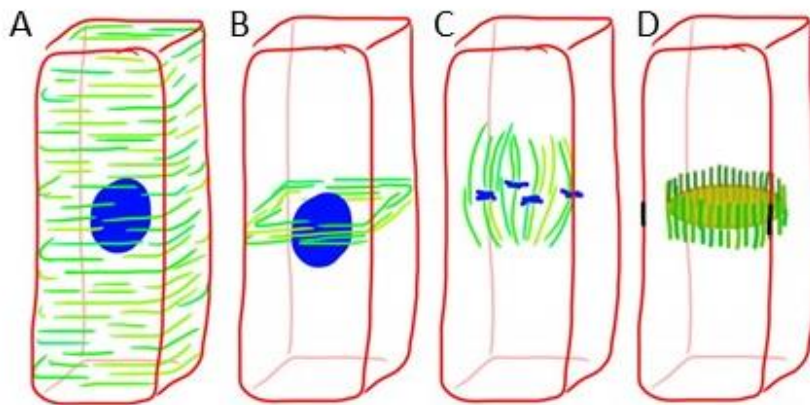
Obr. 2: Dynamická nestabilita mikrotubulů a treadmilling. A) Plus-konce mikrotubulů obvykle nejsou v buňce nijak ukotveny, a proto častěji než minus-konce podléhají růstu díky přidávání tubulinových heterodimerů. Při příliš rychlé hydrolyze GTP na přidaném heterodimeru se plus-konec stává nestabilním a dochází k depolymerizaci mikrotubulu neboli katastrofě. Následným odebráním tubulinových podjednotek se mikrotubulus zkracuje. B) U neukotvených mikrotubulů může nastávat současně s připojováním podjednotek na plus-konci také jejich odebrání na minus-konci. Výsledkem je nepřímý tok podjednotek v rámci mikrotubulu. Takto zapříčiněný pohyb mikrotubulu v prostoru se nazývá treadmilling. Upraveno podle Dixit *et Cyr* (2004).

V rostlinných buňkách se centrozóm ani jemu podobná přesně definovaná MTOCs nenacházejí. Nukleační centra mikrotubulů jsou rozmístěna na cytoplazmatické membráně (Schmit, 2002) a na membránách buněčných organel, jako je jádro (Batzenschlager *et al.*, 2013; Stoppin *et al.*, 1994) či Golgiho komplex (Drykova *et al.*, 2003; Vildanova *et al.*, 2014). O průběhu buněčného dělení v buňkách bez centrozómu pojednává kapitola 3.2.2. Díky přítomnosti neukotvených mikrotubulů lze v buňkách rostlin často pozorovat tzv. treadmilling (viz Obr. 2B). Při tomto jevu se mikrotubulus zkracuje na minus-konci a zároveň roste na plus-konci (Erlenkamper *et al.*, 2013; Chomicki *et al.*, 2016; Kueh *et al.*, 2009). Mikrotubuly podléhající treadmillingu jsou většinou velmi krátké a vzápětí může dojít k jejich zániku, avšak mnohem častěji splynou ve svazek s jinými již existujícími mikrotubuly (Chomicki *et al.*, 2016). Jelikož nejsou omezeny svou délkou ani pevnou pozicí v mikrotubulární síti a jsou schopny rychlé reorientace, mohou se v buňce tyto krátké mikrotubuly díky treadmillingu pohybovat různými směry a náhodným svazkováním se stabilnějšími mikrotubuly podporují stávající uspořádání celé sítě (Chomicki *et al.*, 2016).

3.1.4 Mikrotubulární buněčné struktury rostlin

Jak již bylo uvedeno v předchozí kapitole, rostlinné buňky se nevyznačují centrozómem, avšak můžeme v nich nalézt jiné mikrotubulární struktury, specifické pro rostliny. V interfázi jsou rostlinné mikrotubuly uspořádány autoorganizací do vysoce dynamické sítě tzv. kortikálních mikrotubulů (viz Obr. 3A), nacházejících se na vnitřní straně cytoplazmatické membrány a schopných reorganizace dle aktuálních potřeb buňky (Komis *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2016b; Shaw, 2013; Wasteneys *et al.*, 2009). Jak buňka prochází buněčným cyklem a dostává se do fáze buněčného dělení, kortikální mikrotubuly jsou soustřeďovány do paralelních svazků v úzkém pásu okolo buněčného jádra. Tato struktura se nazývá předprofázní svazek (PPB z anglického preprophase band; viz Obr. 3B) a udává polohu pro následné buněčné dělení (Rasmussen *et al.*, 2013), zřejmě však existují i jiné mechanismy určení pozice dělení nezávislé na PPB (Rasmussen *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2016). Během dělení se předprofázní svazek rozpadá a mikrotubuly jsou reorganizovány do jiných struktur, v původním místě svazku však zůstává stopa pro pozdější vytvoření buněčné přepážky (Rasmussen *et al.*, 2013). Bipolární dělicí vřeténko (viz Obr. 3C), nezbytné pro správný průběh rozdělení jádra, je u rostlin v důsledku nepřítomnosti centrozómu acentrozomální a mikrotubuly se v něm organizují samy; na jejich organizaci se podílí

také jaderný chromatin, k němuž po rozpadu jaderného obalu pronikají (Dinarina *et al.*, 2009; Petrovska *et al.*, 2013). Poté, co se chromozómy díky dělicímu vřeténku rozejdou k opačným pólům buňky, vytváří se v rostlinné buňce další specifická struktura zvaná fragmoplast (Obr. 3D). Ten je situován na základě signálu po mikrotubulech předprofázního svazku a určuje pozici vytvářející se buněčné přepážky (Lipka *et al.*, 2014; Murata *et al.*, 2013). Antiparalelní svazky stabilních i dynamických mikrotubulů fragmoplastu jsou organizovány kolmo ke vznikající buněčné přepážce a slouží jako dráhy pro molekulové motory přepravující sem materiál pro tvorbu nové buněčné stěny (de Keijzer *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2010). Buněčná přepážka se následně centrifugálně rozšiřuje díky přeuspořádání nukleačních komplexů na minus-koncích mikrotubulů a následně nukleaci nových mikrotubulů při okrajích přepážky (Murata *et al.*, 2013).



Obr. 3: Znárodnění mikrotubulárních struktur v rostlinné buňce. A) Kortikální mikrotubuly se nacházejí na vnitřní straně cytoplazmatické membrány. B) Předprofázní svazek (PPB) udává pozici pro buněčné dělení. C) Dělicí vřeténko je u rostlin acentrozomální. D) Fragmoplast umožňuje tvorbu buněčné přepážky v místě určeném signály po PPB. Upraveno podle de Keijzer *et al.* (2014).

3.1.5 Proteiny interagující s mikrotubuly

Funkční i mechanické vlastnosti mikrotubulů jsou významně ovlivňovány množstvím proteinů, jež interagují jak s polymerizovanými mikrotubuly, tak i se samostatnými tubulinovými dimery. Mezi tyto interagující proteiny patří skupina molekulových motorů. U živočichů sem řadíme kineziny, pohybující se většinou k plus-konci mikrotubulů, a dyneiny, pohybující se k minus-konci (Marx *et al.*, 2005). V buňkách vyšších rostlin se dyneiny nenacházejí, proto pohyb k plus- i minus-koncům mikrotubulů zprostředkovávají pouze kineziny, jež jsou diverzifikovány do mnoha

podskupin (Richardson *et al.*, 2006; Wickstead *et Gull*, 2007). Molekulové motory ke svému pohybu podél mikrotubulů získávají energii hydrolyzou ATP prostřednictvím své ATP-vazebné domény (Hirokawa *et al.*, 2009; Vale, 2003) a umožňují transport buněčného nákladu např. při tvorbě buněčné přepážky (de Keijzer *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2010) nebo se podílejí na reorganizaci mikrotubulární sítě během buněčného dělení (Lee *et al.*, 2007; Lipka *et al.*, 2014).

Další významnou skupinu tvoří tzv. MAPs neboli proteiny asociované s mikrotubuly (zkratka pochází z anglického microtubule associated proteins). Funkcí MAPs je modulace dynamiky mikrotubulů tak, aby mohly plnit širokou škálu úloh v buňce. MAPs mohou s mikrotubuly reagovat přímo anebo prostřednictvím interakce s jinými MAPs (Vleugel *et al.*, 2016). Patří sem proteiny stabilizující nebo naopak destabilizující mikrotubuly, proteiny podporující nukleaci mikrotubulů, jejich svazkování nebo rozvětvení, či proteiny zprostředkovávající ukotvení mikrotubulů k buněčným organelám (Horio *et Murata*, 2014).

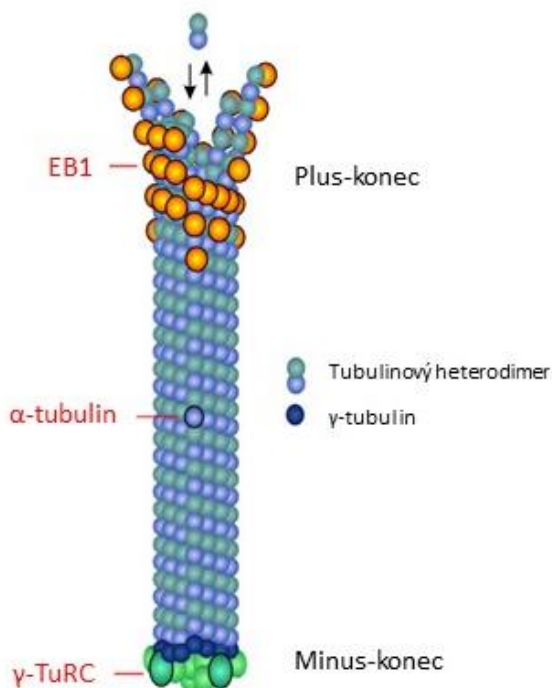
Mezi MAPs řadíme také proteiny interagující s plus-konci mikrotubulů, jinak zvané +TIPs (z anglického plus-end tracking proteins), které jsou vlastní všem eukaryotním organismům (Schuyler *et al.*, 2003). Vzhledem k jejich lokalizaci na rostoucím konci mikrotubulů je velmi pravděpodobné, že během prorůstání mikrotubulu cytoplazmou interagují také s jinými proteiny a buněčnými komponenty (Vleugel *et al.*, 2016). V následující kapitole se budu podrobněji zabývat EB proteiny, protože jeden z nich je stěžejním objektem této diplomové práce.

3.1.5.1 End Binding protein 1

Proteiny vážící rostoucí plus-konec mikrotubulů (nebo také EB proteiny z anglického názvu end-binding proteins, Obr. 4) mají významnou úlohu v interakcích s jinými +TIPs a jsou evolučně velmi konzervované (Akhmanova *et Steinmetz*, 2008; Schuyler *et al.*, 2003). U savců byly objeveny tři subtypy těchto proteinů, označované čísly: EB1, EB2 a EB3 (Vleugel *et al.*, 2016). EB proteiny lze nalézt i v rostlinných buňkách (Gleeson *et al.*, 2012; Komaki *et al.*, 2010), jejich homology se vyskytují také u kvasinek (Sandblad *et al.*, 2006). V *in vitro* studiích EB proteiny zvyšují frekvenci katastrof mikrotubulů (Komaki *et al.*, 2010; Maurer *et al.*, 2014), což je v rozporu s některými *in vivo* pozorováními (Galva *et al.*, 2014). Tento nesoulad je nejspíš dán nepřítomností jiných +TIPs v *in vitro* experimentech, zatímco *in vivo* tyto proteiny

modulují působení EB proteinů na chování mikrotubulů (Galjart, 2010; Stepanova *et al.*, 2010).

EB proteiny interagují s rostoucími plus-konci mikrotubulů svou N-terminální CH (calponin homology) doménou (Galva *et al.*, 2014; Komaki *et al.*, 2010). K vazbě EB proteinu dochází na rozhraní 4 tubulinových dimerů mimo šev (Zhang *et al.*, 2015), následkem čehož nastávají na α -podjednotce heterodimerů konformační změny usnadňující hydrolýzu GTP a tím zvyšující pravděpodobnost rozpadu mikrotubulu (Duellberg *et al.*, 2016; Maurer *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015). EB proteiny však také mohou stabilizovat plus-konec mikrotubulů a tím přispívat k jejich prodloužení (Duellberg *et al.*, 2016; Galva *et al.*, 2014). C-terminální doména EB proteinů je pak k dispozici pro vytváření EB dimerů nebo pro vazbu jiných interagujících proteinů (Honnappa *et al.*, 2009).



Obr. 4: Interakce proteinu EB1 s plus-koncem mikrotubulu. Mikrotubulus je nukleován v γ -TuRC, šipky naznačují polymerizaci a depolymerizaci dynamického konce mikrotubulu. Upraveno podle Schuster *et al.* (2015).

U rostlin se EB proteiny nazývají EB1. Existuje několik subtypů EB1 proteinů – homology EB1a a EB1b se vyskytují v živočišných, rostlinných i kvasinkových buňkách (Komaki *et al.*, 2010) a vykazují 79% identitu v aminokyselinovém složení (Galva *et al.*, 2014). Oproti tomu EB1c je specifický pouze pro rostliny (Bisgrove *et al.*,

2008; Komaki *et al.*, 2010; Novak *et al.*, 2015) a jeho identita aminokyselinového složení s EB1b činí pouze 52 % (Galva *et al.*, 2014).

C-terminální doména EB1c obsahuje bazickou oblast zprostředkávající jaderný lokalizační signál, proto se tento protein během interfáze nachází v buněčném jádře (Komaki *et al.*, 2010; Novak *et al.*, 2015). V průběhu buněčného dělení se EB1c podílí na polaritě dělicího vřetenka a na rozchodu anafázních chromozómů, později je EB1c lokalizován ve fragmoplastu a po dokončení buněčného dělení relokalizuje do nově vzniklých dceřiných jader (Komaki *et al.*, 2010; Novak *et al.*, 2015), zatímco EB1a a EB1b se i nadále nacházejí na plus-koncích kortikálních mikrotubulů (Komaki *et al.*, 2010).

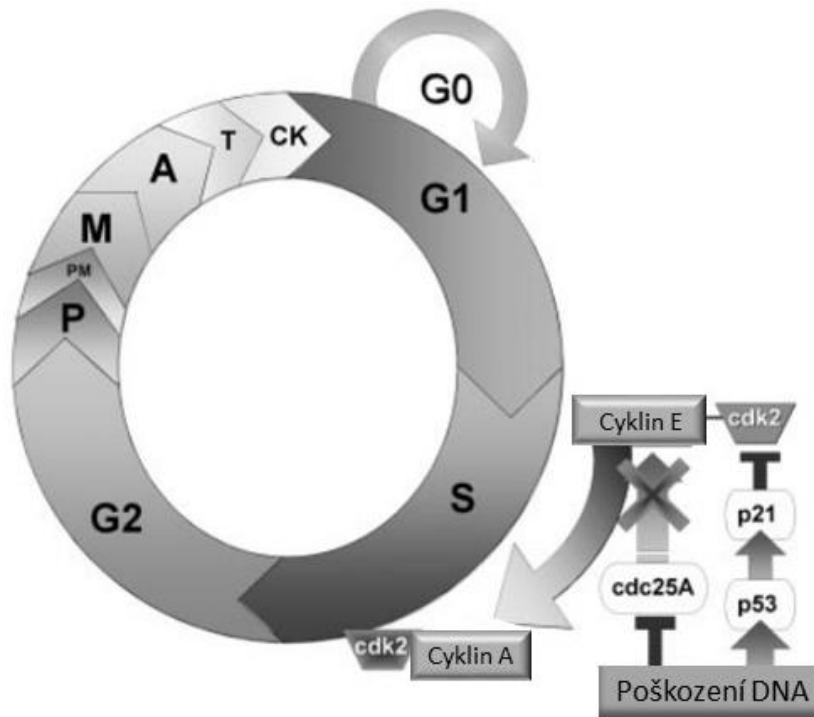
Na rozdíl od zbylých dvou subtypů EB1, které mohou vytvářet homodimery i heterodimery, EB1c vytváří pouze homodimery, a to jak *in vivo*, tak v *in vitro* experimentech (Komaki *et al.*, 2010). Další odlišností tohoto proteinu je fakt, že zatímco C-terminální doména EB1a a EB1b vykazuje inhibiční účinky na polymerizaci mikrotubulů prostřednictvím interakce s N-terminální doménou EB1 proteinu, v případě EB1c tato autoinhibiční funkce není přítomna (Komaki *et al.*, 2010).

3.2 Buněčný cyklus

Jako buněčný cyklus se označuje doba od jednoho dělení eukaryotní buňky do dělení následujícího. Rozlišujeme několik fází buněčného cyklu: G₁-fázi, S-fázi, G₂-fázi a M-fázi (viz Obr. 5). Během fáze G₁ (označení G vychází z anglického gap neboli mezera) buňka roste po předchozím ukončeném dělení a připravuje se na následující S-fázi. V G₁-fázi se také nachází jeden z kontrolních bodů cyklu – pokud buňka nemá vhodné podmínky pro vstup do S-fáze nebo je příliš malá, její cyklus se v tomto okamžiku zastaví a buňka vstoupí do tzv. G₀-fáze, v níž setrvává do té doby, než bude připravena pokračovat v cyklu. V následující S-fázi (S od slova syntéza) dochází k replikaci jaderné DNA. Dále cyklus pokračuje G₂-fází, v jejímž průběhu buňka dále roste a replikuje své cytoplazmatické organely. Na konci G₂-fáze se nachází další důležitý kontrolní bod, jímž buňka projde do M-fáze pouze tehdy, má-li dostatečnou velikost a je-li její DNA správně zreplikována. G₁- (příp. i G₀-), S- a G₂-fáze se souhrnně označují jako interfáze, protože se nacházejí mezi dvěma buněčnými děleními. Buněčné dělení probíhá v M-fázi (M od slova mitóza) buněčného cyklu a má dvě hlavní části: dělení jádra (mitózu) a dělení cytoplazmy neboli cytokinezi.

Podobně jako buněčný cyklus se i mitóza rozděluje do několika částí: profáze, prometafáze, metafáze, anafáze a telofáze (viz Obr. 5). V profázi kondenzují chromozómy, takže se stávají pozorovatelnými ve světelném mikroskopu. Duplikované centrozomy se rozcházejí k opačným pólům buňky a začíná se utvářet mitotické vřetenko. Mitóza probíhající v rostlinných buňkách bez centrozomu bude popsána v kapitole 3.2.2. V prometafázi se rozpadá jaderný obal a mikrotubuly vřetenka se tak mohou vázat na chromozómy v oblasti centromer prostřednictvím interakce s kinetochorovými proteiny (Dinarina *et al.*, 2009; Nerusheva *et al.*, 2016). Metafáze je typická seřazením všech chromozómů v ekvatoriální rovině buňky, čehož se zřejmě účastní motorové proteiny, ale také dynamická nestabilita mikrotubulů (Dinarina *et al.*, 2009). V anafázi se od sebe oddělují sesterské chromatidy a jsou taženy k opačným pólům buňky. Na jejich pohybu se podílí nejprve zkracování kinetochorových mikrotubulů v anafázi A, posléze také oddalování samotných centrozómů v anafázi B (Schuyler *et al.*, 2003; Uehara *et al.*, 2016). Touto segregací dceřiných chromozómů je umožněno rozdělení replikované DNA do dvou identických sad, a tedy zachování genetické informace v další generaci buněk. Během telofáze se z fragmentů původní jaderné membrány vytvářejí nové jaderné obaly kolem obou vznikajících dceřiných jader (Chen *et al.*, 2016). Skrz jaderné póry do každého jádra putují jaderné proteiny, celé jádro nabývá na velikosti a chromozómy v něm dekondují zpět do svého interfázního stavu.

Poslední fází buněčného dělení je cytokineze, začínající zpravidla už v anafázi (Zhou *et al.*, 2008), avšak dokončená až po vzniku dceřiných jader. U živočichů probíhá cytokineze centripetálně – buňka je zaškrcena pomocí kontraktálního prstence vytvořeného z aktinových vláken přichycených k cytoplazmatické membráně (Huang *et al.*, 2016; Uehara *et al.*, 2016). V rostlinné buňce probíhá cytokineze centrifugálně a je zprostředkována mikrotubulárním fragmoplastem (viz kapitola 3.1.4).



Obr. 5: Schéma buněčného cyklu a mechanismu regulace G₁-S přechodu. P – profáze. PM – prometafáze. M – metafáze. A – anafáze. T – telofáze. CK – cytokineze. Upraveno podle Douglas *et Haddad* (2003).

3.2.1 Checkpoint proteiny

Buněčný cyklus obsahuje řadu kontrolních bodů (checkpointů), v nichž musí být rozhodnuto, zda předchozí fáze cyklu proběhla správně a je řádně ukončena a zda tedy buňka může vstoupit do další fáze. Toto rozhodnutí umožňují tzv. checkpoint proteiny. Přechod mezi jednotlivými fázemi cyklu zajišťují komplexy cyklinů a jimi aktivovaných cyklin-dependentních kináz (Cdk). Hladina kináz je během cyklu víceméně stabilní, zato množství cyklinů značně kolísá v závislosti na fázi cyklu (Swaffer *et al.*, 2016; Wilczynska *et al.*, 2016).

Asi nejdůležitějším kontrolním bodem je tzv. start, nacházející se v G₁-fázi. Jakmile buňka tento bod jednou překročí do S-fáze, musí již celý cyklus dokončit, za určitých okolností je však i tento proces reverzibilní (Cappell *et al.*, 2016). Významnou roli v přechodu do S-fáze hraje transkripční faktor p53, jehož množství v buňce se zvyšuje v případě poškození DNA (viz Obr. 5; Rutkowski *et al.*, 2010). Aktivní p53 stimuluje transkripci proteinu p21, který inhibuje Cdk2, jejíž aktivita je nutná pro vstup do S-fáze (Spencer *et al.*, 2013). Poškození DNA tak vede k zastavení buněčného cyklu v G₁-fázi, kdy mohou být spuštěny DNA-reparační mechanismy, a nedochází tedy k replikaci mutované či jinak poškozené DNA. U rostlin a kvasinek sice nebyly proteiny rodiny

p53 identifikovány (Rutkowski *et al.*, 2010), avšak v *Arabidopsis thaliana* transformovaných konstruktem nesoucím gen pro lidský p53 docházelo k předčasnému stárnutí a morfologickým abnormalitám (Ma *et al.*, 2016a). Ma *et al.* (2016a) také v *Arabidopsis thaliana* zjistili přítomnost signální dráhy homologní k živočišné dráze aktivované p53.

Klíčovým regulátorem přechodu buňky mezi G₂- a M-fází je fosfatáza Cdc25, která defosforyluje specifický tyrozin kinázy Cdc2, a to v závislosti na dostatečné velikosti buňky (Rupes *et al.*, 2001). Aktivita Cdc2 je potřebná pro vstup do M-fáze, její inhibice je zajištěna protein kinázou Wee1, fosforylující tentýž tyrozin, který je cílovým místem fosfatázy Cdc25 (Jorgensen *et Tyers*, 2004). Tento kontrolní mechanismus je v rámci eukaryot evolučně konzervován (Jorgensen *et Tyers*, 2004).

Dalším kontrolním bodem buňka prochází v průběhu mitózy. Jedná se o tzv. spindle assembly checkpoint (SAC), což lze česky vyjádřit jako kontrolní bod sestavení dělicího vřeténka. V tomto bodě dochází na kinetochorech k mechano-chemické signalizaci toho, jestli jsou všechny chromozómy připojeny svými centromerami na mikrotubuly vřeténka (Aravamudhan *et al.*, 2016). Následuje spuštění signalizační kaskády vedoucí k pokračování v mitóze (jsou-li všechny chromozómy napojeny), nebo naopak k inhibici postupu v dělení (pokud chromozómy napojeny nejsou). Ve druhém zmíněném případě trvá pozastavení dělení tak dlouho, dokud se všechny chromozómy správným způsobem nepřipojí k dělicímu vřeténku. Jedním z ústředních činitelů SAC se blíže zabývá následující kapitola.

3.2.1.1 Mad2

Mitotic arrest defficient 2 (zkráceně Mad2) je protein lokalizovaný na kinetochorech chromozómů nepřipojených k dělicímu vřeténku a je nezbytný pro aktivaci proteinů SAC (Stormo *et Fox*, 2016). Mad2 existuje ve dvou konformačních stavech – otevřeném (O-Mad2) a uzavřeném (C-Mad2), přičemž neaktivní otevřená forma se nachází v cytosolu (Joglekar *et Aravamudhan*, 2016). Vazebným partnerem pro C-Mad2 je jiná izoforma tohoto proteinu označovaná Mad1 (Musacchio, 2015; Yang *et al.*, 2014). Vzniklý heterodimer funguje jako katalyzátor přeměny O-Mad2 na C-Mad2 prostřednictvím jejich dimerizace a následné konverze otevřené formy na uzavřenou (Yang *et al.*, 2014). Zvyšující se hladina C-Mad2 vede k vazbě Cdc20 do komplexu s dalšími proteiny tohoto kontrolního bodu (Izawa *et Pines*, 2015; Musacchio, 2015). Cdc20 je tak odebírána z cytosolu, kde by v opačném případě plnila funkci aktivační

podjednotky APC/C neboli anafázi podporujícího komplexu/cyklozomu (Izawa *et Pines*, 2015). Vzniklý proteinový komplex, nazývaný MCC z anglického mitotic checkpoint complex, také váže Cdc20 z již aktivovaných APC/C, čímž dále inhibuje jejich aktivitu (Izawa *et Pines*, 2015). Tímto způsobem vzniká signál pro zastavení buňky před vstupem do anafáze.

Po vazbě mikrotubulu na specifické proteiny kinetochoru přes jejich CH doménu dochází k odstranění enzymu Mps1, nutného k tvorbě aktivního MCC, a tím i k rozpadu MCC (Ji *et al.*, 2015; Musacchio, 2015). Aktivní APC/C pak vede ke vstupu buňky do anafáze. Je však také možné, že Mps1 zůstává navázán na kinetochoru a dochází pouze k jeho oddálení od proteinů MCC, což rovněž vede k aktivaci APC/C a pokračování buněčného dělení (Aravamudhan *et al.*, 2014).

3.2.2 *Acentrozomální mitóza*

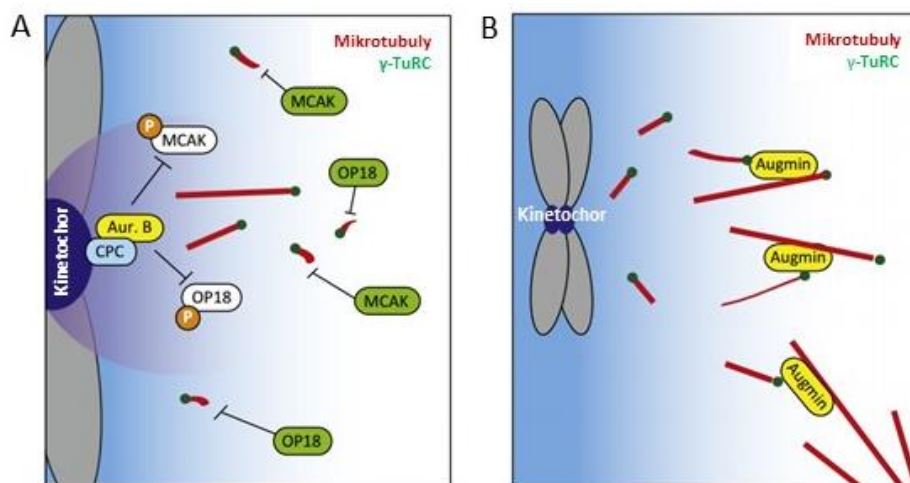
V buňkách bez centrozomu, jako jsou buňky rostlin a některých hub či vajíčka obratlovců, jsou mikrotubuly při vzniku mitotického vřeténka nukleovány dvěma hlavními způsoby – jeden je závislý na chromozómech za přítomnosti RanGTP a CPC proteinových komplexů, druhý pak závisí na již existujících mikrotubulech ve spolupráci s augminem (Meunier *et Vernos*, 2016). Pro účely studia acentrozomálního dělení je hojně využívaným modelem vajíčko žáby rodu *Xenopus* (Carazo-Salas *et al.*, 1999; Kalab *et al.*, 2006; Meunier *et Vernos*, 2016; Radford *et al.*, 2016).

RanGTP gradient s nejvyšší koncentrací v mitotickém chromatinu sám o sobě napomáhá nukleaci mikrotubulů v blízkosti chromozómů, aniž by zde existovaly předem dané mikrotubul-nukleující struktury podobné živočišným centrozómům (Carazo-Salas *et al.*, 1999; Hasegawa *et al.*, 2013; Kalab *et al.*, 2006). Tvorba RanGTP gradientu v dělicích se buňkách je dána zvýšenou hladinou faktoru RCC1 (regulator of chromosome condensation 1) v chromatinu (Hasegawa *et al.*, 2013).

Na nukleaci a stabilizaci mikrotubulů na kinetochorech se také podílí CPC neboli chromosome passenger complex, který se nachází na kinetochorech chromozómů (viz Obr. 6A) a jehož součástí je mj. kináza Aurora B (Samejima *et al.*, 2015). Aktivita tohoto enzymu vede k inhibici některých mikrotubul-destabilizujících faktorů, což vytváří vhodné podmínky pro sestavování mikrotubulů v oblasti kinetochorů (Samejima *et al.*, 2015). CPC také hraje roli při opravách chybného připojení chromozómů na mikrotubuly vřeténka (Chan *et al.*, 2012). Oba tyto systémy – RanGTP- i CPC-dependentní – zřejmě fungují nezávisle na sobě, avšak pravděpodobně se při vzniku

kinetochorových mikrotubulů a mitotického vřeténka podporují a jejich společným rysem je fakt, že jsou oba lokalizovány v jádře a mohou tedy interagovat s mikrotubuly pouze po rozpadu jaderné membrány během buněčného dělení (Meunier *et Vernos*, 2016). Mikrotubulus, který je svým plus-koncem uchycen a stabilizován na kinetochoru, poté roste přidáváním podjednotek na plus-konci a jeho minus-konec je tak odtlačován směrem k pólu vřeténka (Maiato *et al.*, 2004; Meunier *et Vernos*, 2016).

Na rozdíl od výše uvedených nukleačních systémů může augmin-dependentní mechanismus fungovat i v interfázi a byl již zjištěn i v rostlinných buňkách na jejich kortikálních mikrotubulech (Hotta *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2014). Nicméně stále není jasné, kdy začíná být tato dráha aktivní (Meunier *et Vernos*, 2016). Molekuly augminu vytvářejí spolu s dalšími proteiny oktamerický komplex, který interaguje s povrchem již existujících mikrotubulů (viz Obr. 6B) a rekrutuje k nim γ -tubulinové komplexy, jež pak slouží jako nukleační místa pro nové mikrotubuly (Hotta *et al.*, 2012; Kamasaki *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014). Tímto způsobem dochází k rychlému nárůstu mikrotubulární hmoty využitelné pro sestavení dostatečně robustního vřeténka (Hayward *et al.*, 2014; Meunier *et Vernos*, 2016). Obdobně je augmin-dependentní mechanismus nukleace mikrotubulů zapojen do tvorby fragmoplastu při cytokinezi (Hotta *et al.*, 2012).



Obr. 6: Acentrozomální nukleační mechanismy. A) CPC-dependentní mechanismus je lokalizován na kinetochoru. Přítomná Aurora B inhibuje mikrotubul-destabilizující faktory (MCAK a OP18), čímž se oblast kinetochoru stává vhodnou pro stabilizaci mikrotubulů. B) Augminový komplex díky interakci s γ -tubulinovými komplexy umožňuje nukleaci nových mikrotubulů na již existujících mikrotubulech. Upraveno podle Meunier *et Vernos* (2016).

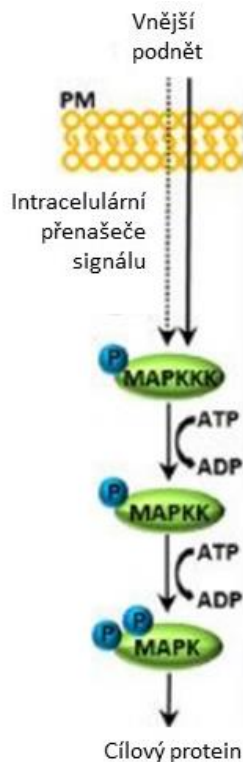
3.3 MAP kinázy

Mitogen-aktivované protein kinázy, zkráceně MAP kinázy nebo jen MAPKs, představují multienzymové komplexy signalizačních kaskád, jež jsou v rámci eukaryotních organismů silně evolučně konzervované (Feng *et al.*, 2016; Marangoni *et al.*, 2015; Pincus *et al.*, 2013). Zvláště významnou roli pak hrají v signalizaci u rostlin, neboť tyto nepohyblivé organismy jimi reagují nejen na látky ze svého vnitřního prostředí, jako jsou hormony či růstové regulátory, ale také na vnější podněty – může se jednat o různé druhy stresu (Ovecka *et al.*, 2014) nebo interakce se symbionty a patogeny (Becker *et al.*, 2015; Jalmi *et al.*, 2016).

MAP kinázové signalizační dráhy fungují na základě reverzibilní posttranslační fosforylace (Ovecka *et al.*, 2014). Na pomyslném vrcholu kaskády stojí MAP kináza kináza (MAP3K) aktivovaná extracelulárním či intracelulárním podnětem a fosforylující MAP kinázu kinázu (MAP2K), která poté fosforyluje MAP kinázu (MAPK). MAP kináza aktivovaná fosforylací pak spouští mechanismus vedoucí k buněčné odpovědi na daný podnět (viz Obr. 7), a to prostřednictvím aktivace/inaktivace transkripčních faktorů, složek cytoskeletu či jiných signalizačních drah (Smekalova *et al.*, 2014).

Mezi MAP3Ks patří například proteiny z rodiny ANP (*Arabidopsis thaliana* homolog of nucleus- and phragmoplast-localized kinase) podílející se na organizaci mikrotubulárního cytoskeletu a na správném průběhu cytokineze (Beck *et al.*, 2011; Takahashi *et al.*, 2010). Jak ukázali Beck *et al.* (2011), dvojitě mutantní rostliny *Arabidopsis thaliana* v genech pro ANP2 a ANP3 vykazovaly narušený růst vegetativních orgánů s neobvykle větvenými kořenovými vlásky. S využitím elektronového mikroskopu Beck *et al.* (2011) v těchto mutantech zjistili silně svazkované mikrotubuly, což bylo zřejmě způsobeno narušenou MAP kinázovou signalizací.

MKK6 (mitogen-aktivovaná protein kináza 6) je protein řazený mezi MAP2Ks a zapojující se rovněž v cytokinezi, při níž je lokalizován v ekvatoriální části fragmoplastu (Takahashi *et al.*, 2010). Jak zjistili Takahashi *et al.* (2010), aktivátorem MKK6 je ANP3 a mutace v genu *mkk6* u *A. thaliana* vede k cytokinetickým defektům a předčasnému zastavení růstu.



Obr. 7: Schéma přenosu extracelulárního signálu prostřednictvím MAP kinázových drah. Skrze intracelulární přenašeče signálu (příp. přímou translokací vnějšího podnětu – hormonu do buňky) je aktivována MAP3K fosforylující a tím aktivující MAP2K. MAP2K fosforyluje a tedy aktivuje MAPK, která svou fosforylační aktivitou aktivuje nebo inaktivuje cílový protein. Upraveno podle Smekalova *et al.* (2014).

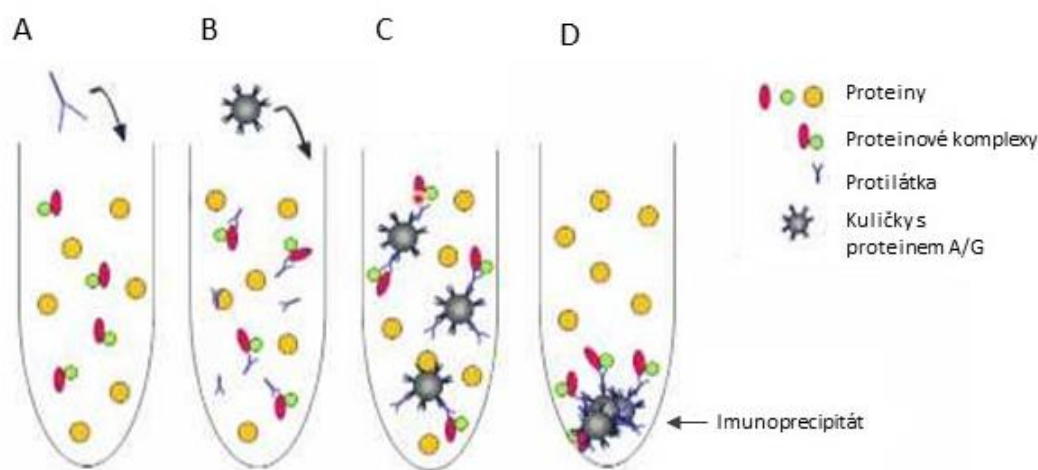
3.4 Stanovení proteinových interakcí

Ve všech živých buňkách je obsaženo velké množství různých proteinů, které spolu interagují a navzájem se ovlivňují ve svých funkcích. Složení proteinových komplexů se může lišit v důsledku buněčné odpovědi na vnější podnět anebo v závislosti na vývojovém stádiu buňky. Studium proteinových interakcí je proto zásadní pro pochopení průběhu buněčných procesů a za jeho účelem byla vyvinuta řada promyšlených metod, z nichž některé budou vysvětleny v této kapitole.

3.4.1 Biochemické metody

Jednou z možností stanovení proteinových interakcí je koimunoprecipitace (co-IP, viz Obr. 8). Tato biochemická metoda je založena na šetrném rozrušení buněk tak, aby nedošlo k porušení nativních proteinových komplexů. K proteinovému extraktu se pak přidává protilátka proti studovanému proteinu, což způsobí jeho precipitaci v komplexu s jeho vazebnými partnery (Lee *et al.*, 2016; Petre *et al.*, 2015; Thiebaut *et al.*, 2016). Pro vychytání vzniklých precipitovaných komplexů jsou určeny agarózové nebo jiné

podobné částice, které na svém povrchu nesou protein A nebo protein G, jenž váže protilátky (Thiebaut *et al.*, 2016). Po odstranění ostatních složek směsi jsou zachycené proteinové komplexy eluovány z agarózových částic a mohou být dále analyzovány, např. s využitím protilátek specifických vůči jednotlivým interakčním partnerům nebo pomocí SDS-PAGE s následnou MS analýzou.

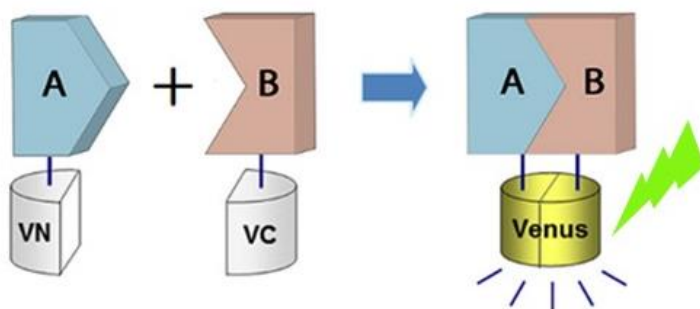


Obr. 8: Schéma koimunoprecipitace. A) Přidání protilátky k proteinovému extraktu. B) Přidání agarózových kuliček s proteinem A/G. C) Agarózové kuličky s navázanými protilátkami a jimi zachycenými proteinovými komplexy. D) Po centrifugaci zůstane imunoprecipitát v peletu a je dále analyzovatelný. Upraveno podle www.abcam.com/webinars.

3.4.2 Mikroskopické metody

Z mikroskopických metod bych ráda uvedla alespoň BiFC neboli bimolekulární fluorescenční komplementaci, kterou jsem využívala v experimentální části své diplomové práce. Princip této metody je velmi podobný kvasinkovému dvouhybridnímu systému (popsanému v kapitole 3.4.3), avšak namísto transkripčního faktoru využívá fluorescenční protein – GFP (green fluorescent protein) nebo jeho deriváty (Kamigaki *et al.*, 2016). Tento je rozdělen na dvě části, které samy o sobě neposkytují fluorescenci a které jsou fúzovány s proteiny, u nichž se předpokládá interakce (Kerppola, 2008). Pokud k interakci opravdu dochází, pak jsou obě části fluorescenčního proteinu lokalizovány velmi blízko u sebe (viz Obr. 9), což vede k vytvoření nativní trojrozměrné struktury fluoroforu a po ozáření světlem o vhodné vlnové délce také k emisi detekovatelného fluorescenčního signálu. Je tak možné nejen zjistit existenci interakce mezi zkoumanými proteiny, ale také určit jejich lokalizaci v živé buňce (Gehl *et al.*, 2009; Kerppola, 2008; Kudla *et al.*, 2016). Díky rekonstituci fluorescenčního

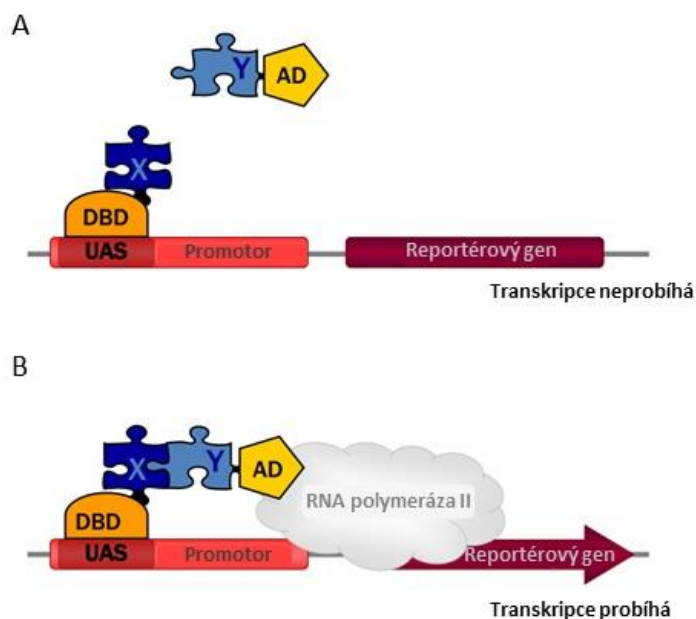
proteinu lze vizualizovat i slabé nebo jen přechodné interakce studovaných proteinů (Kudla *et al.*, 2016). Pro následnou imunolokalizační analýzu může být studovaný protein, fúzovaný s fluoroforem, označený také hemaglutininovou nebo jinou kotvou (Gehl *et al.*, 2009; Kamigaki *et al.*, 2016).



Obr. 9: Schéma BiFC. Při interakci zkoumaných proteinů A a B se C-terminální (VC) i N-terminální (VN) části fluoroforu Venus dostanou do těsné blízkosti a po ozáření světlem o vhodné vlnové délce lze detekovat fluorescenční signál. Upraveno podle <http://us.bioneer.com/products/vn/VN-FusionLibrary-technical.aspx>.

3.4.3 Jiné metody

Kvasinkový dvouhybridní systém (anglicky označovaný yeast two hybrid nebo jen Y2H) je *in vivo* metoda využívající opětovné sestavení transkripčního faktoru kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Transkripční faktor je uměle rozdělen na DNA-vazebnou doménu (DBD z anglického DNA-binding domain), jež umožňuje jeho vazbu na konkrétní místo v DNA, a na aktivační doménu (AD) s katalytickou aktivitou (Bruckner *et al.*, 2009). Každá samostatně jsou tyto domény neaktivní (Obr. 10A). Jestliže však bude DBD fúzována se zkoumaným proteinem X a AD se zkoumaným proteinem Y, tyto konstrukty budou společně exprimovány v kvasince a nastane-li interakce mezi proteiny X a Y, pak se obě oddělené domény transkripčního faktoru dostanou do těsné blízkosti (Obr. 10B), což povede k obnovení funkce transkripčního faktoru a k expresi reportérového genu (Bruckner *et al.*, 2009; Thiebaut *et al.*, 2016). Tímto genem může být např. *lacZ* operon kódující podjednotku enzymu β -galaktosidázy (Bruckner *et al.*, 2009; Trifonov *et al.*, 2016). Na selekčním médiu s obsahem X-gal (chromogenního substrátu pro galaktosidázu) lze pak rozlišit bílé kolonie, u nichž nedošlo k aktivaci transkripčního faktoru, a kolonie modré, u kterých je transkripční faktor aktivní, indukuje expresi podjednotky β -galaktosidázy a funkční β -galaktosidáza pak rozkládá X-gal za vzniku modrého zbarvení kolonie (Trifonov *et al.*, 2016).



Obr. 10: Schéma kvasinkového dvouhybridního systému (Y2H). A) DNA-vazebná doména (DBD) je fúzována se zkoumaným proteinem X, aktivační doména (AD) je fúzována s proteinem Y, který je potenciálním interaktorem proteinu X. Každá samostatně jsou obě domény neaktivní a transkripce neprobíhá. B) Při koexpresi konstruktů pro obě fúzované domény a při interakci proteinů X a Y nastane obnovení funkce transkripčního faktoru složeného s DBD a AD. To vede k zahájení transkripce RNA polymerázou II. UAS = upstream activating sequence je místo nasednutí transkripčního faktoru na DNA. Upraveno podle Bruckner *et al.* (2009).

Existuje mnoho dalších možností pro studium proteinových interakcí. Při použití bifunkčních činidel dochází ke kovalentní stabilizaci vazby mezi proteiny vzdálenými od sebe právě tolik, jako je délka použitého činidla (So *et al.*, 2016). Při prezentaci peptidů fágy je do bakteriofágů vnesena genetická informace pro expresi zkoumaných peptidů (úseků proteinů) v rámci fágových plášťových proteinů – peptidy jsou poté vystaveny na povrch fágových částic a díky tomu mohou být zachyceny na koloně obsahující interakčního partnera zkoumaného proteinu a dále analyzovány (Aghebati-Maleki *et al.*, 2016). Pro dostatečné potvrzení zjištěné interakce se jednotlivé metody často kombinují (Lee *et al.*, 2016; Petre *et al.*, 2015; Thiebaut *et al.*, 2016).

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5 VÝSLEDKY

6 DISKUZE

7 ZÁVĚR

8 LITERATURA

- Aghebati-Maleki, L., Bakhshinejad, B., Baradaran, B., Motallebnezhad, M., Aghebati-Maleki, A., Nickho, H., Yousefi, M., *et* Majidi, J. (2016). Phage display as a promising approach for vaccine development. *J Biomed Sci* 23, 66.
- Akhmanova, A., *et* Steinmetz, M.O. (2008). Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 309-322.
- Alushin, G.M., Lander, G.C., Kellogg, E.H., Zhang, R., Baker, D., *et* Nogales, E. (2014). High-resolution microtubule structures reveal the structural transitions in alphabeta-tubulin upon GTP hydrolysis. *Cell* 157, 1117-1129.
- Aravamudhan, P., Felzer-Kim, I., Gurunathan, K., *et* Joglekar, A.P. (2014). Assembling the protein architecture of the budding yeast kinetochore-microtubule attachment using FRET. *Curr Biol* 24, 1437-1446.
- Aravamudhan, P., Chen, R., Roy, B., Sim, J., *et* Joglekar, A.P. (2016). Dual mechanisms regulate the recruitment of spindle assembly checkpoint proteins to the budding yeast kinetochore. *Mol Biol Cell* 27, 3405-3417.
- Batzenschlager, M., Masoud, K., Janski, N., Houlne, G., Herzog, E., Evrard, J.L., Baumberger, N., Erhardt, M., Nomine, Y., Kieffer, B., *et al.* (2013). The GIP gamma-tubulin complex-associated proteins are involved in nuclear architecture in *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci* 4, 480.
- Beck, M., Komis, G., Ziemann, A., Menzel, D., *et* Samaj, J. (2011). Mitogen-activated protein kinase 4 is involved in the regulation of mitotic and cytokinetic microtubule transitions in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* 189, 1069-1083.
- Becker, Y., Eaton, C.J., Brasell, E., May, K.J., Becker, M., Hassing, B., Cartwright, G.M., Reinhold, L., *et* Scott, B. (2015). The Fungal Cell-Wall Integrity MAPK Cascade Is Crucial for Hyphal Network Formation and Maintenance of Restrictive Growth of *Epichloe festucae* in Symbiosis With *Lolium perenne*. *Mol Plant Microbe Interact* 28, 69-85.
- Bergmuller, E., Gehrig, P.M., *et* Gruissem, W. (2007). Characterization of post-translational modifications of histone H2B-variants isolated from *Arabidopsis thaliana*. *J Proteome Res* 6, 3655-3668.
- Bisgrove, S.R., Lee, Y.R., Liu, B., Peters, N.T., *et* Kropf, D.L. (2008). The microtubule plus-end binding protein EB1 functions in root responses to touch and gravity signals in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20, 396-410.

Bruckner, A., Polge, C., Lentze, N., Auerbach, D., *et* Schlattner, U. (2009). Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology. *Int J Mol Sci* 10, 2763-2788.

Cappell, S.D., Chung, M., Jaimovich, A., Spencer, S.L., *et* Meyer, T. (2016). Irreversible APC(Cdh1) Inactivation Underlies the Point of No Return for Cell-Cycle Entry. *Cell* 166, 167-180.

Carazo-Salas, R.E., Guarguaglini, G., Gruss, O.J., Segref, A., Karsenti, E., *et* Mattaj, I.W. (1999). Generation of GTP-bound Ran by RCC1 is required for chromatin-induced mitotic spindle formation. *Nature* 400, 178-181.

Clough, S.J. (2005). Floral dip: agrobacterium-mediated germ line transformation. *Methods Mol Biol* 286, 91-102.

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

Coulombe, P.A., *et* Wong, P. (2004). Cytoplasmic intermediate filaments revealed as dynamic and multipurpose scaffolds. *Nat Cell Biol* 6, 699-706.

Davis, A.M., Hall, A., Millar, A.J., Darrah, C., *et* Davis, S.J. (2009). Protocol: Streamlined sub-protocols for floral-dip transformation and selection of transformants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Methods* 5, 3.

de Keijzer, J., Mulder, B.M., *et* Janson, M.E. (2014). Microtubule networks for plant cell division. *Syst Synth Biol* 8, 187-194.

De Storme, N., Copenhaver, G.P., *et* Geelen, D. (2012). Production of diploid male gametes in *Arabidopsis* by cold-induced destabilization of postmeiotic radial microtubule arrays. *Plant Physiol* 160, 1808-1826.

Dimitrov, A., Quesnoit, M., Moutel, S., Cantaloube, I., Pous, C., *et* Perez, F. (2008). Detection of GTP-tubulin conformation in vivo reveals a role for GTP remnants in microtubule rescues. *Science* 322, 1353-1356.

Dinarina, A., Pugieux, C., Corral, M.M., Loose, M., Spatz, J., Karsenti, E., *et* Nedelec, F. (2009). Chromatin shapes the mitotic spindle. *Cell* 138, 502-513.

Ding, D., Muthuswamy, S., *et* Meier, I. (2012). Functional interaction between the *Arabidopsis* orthologs of spindle assembly checkpoint proteins MAD1 and MAD2 and the nucleoporin NUA. *Plant Mol Biol* 79, 203-216.

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

Douglas, R.M., *et* Haddad, G.G. (2003). Genetic models in applied physiology: invited review: effect of oxygen deprivation on cell cycle activity: a profile of delay and arrest. *J Appl Physiol* (1985) *94*, 2068-2083; discussion 2084.

Drykova, D., Cenklova, V., Sulimenko, V., Volc, J., Draber, P., *et* Binarova, P. (2003). Plant gamma-tubulin interacts with alphabeta-tubulin dimers and forms membrane-associated complexes. *Plant Cell* *15*, 465-480.

Duellberg, C., Cade, N.I., Holmes, D., *et* Surrey, T. (2016). The size of the EB cap determines instantaneous microtubule stability. *Elife* *5*.

Erlenkamper, C., *et* Kruse, K. (2013). Treadmilling and length distributions of active polar filaments. *J Chem Phys* *139*, 164907.

Feng, K., Liu, F., Zou, J., Xing, G., Deng, P., Song, W., Tong, W., *et* Nie, X. (2016). Genome-Wide Identification, Evolution, and Co-expression Network Analysis of Mitogen-Activated Protein Kinase Kinases in *Brachypodium distachyon*. *Front Plant Sci* *7*, 1400.

Fiserova, J., *et* Goldberg, M.W. (2010). Relationships at the nuclear envelope: lamins and nuclear pore complexes in animals and plants. *Biochem Soc Trans* *38*, 829-831.

Fu, J., Hagan, I.M., *et* Glover, D.M. (2015). The centrosome and its duplication cycle. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *7*, a015800.

Galjart, N. (2010). Plus-end-tracking proteins and their interactions at microtubule ends. *Curr Biol* *20*, R528-537.

Galva, C., Kirik, V., Lindeboom, J.J., Kaloriti, D., Rancour, D.M., Hussey, P.J., Bednarek, S.Y., Ehrhardt, D.W., *et* Sedbrook, J.C. (2014). The microtubule plus-end tracking proteins SPR1 and EB1b interact to maintain polar cell elongation and directional organ growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell* *26*, 4409-4425.

Gaume, X., Tassin, A.M., Ugrinova, I., Mongelard, F., Monier, K., *et* Bouvet, P. (2015). Centrosomal nucleolin is required for microtubule network organization. *Cell Cycle* *14*, 902-919.

Gehl, C., Waadt, R., Kudla, J., Mendel, R.R., *et* Hansch, R. (2009). New GATEWAY vectors for high throughput analyses of protein-protein interactions by bimolecular fluorescence complementation. *Mol Plant* *2*, 1051-1058.

Gleeson, L., Squires, S., *et* Bisgrove, S.R. (2012). The microtubule associated protein END BINDING 1 represses root responses to mechanical cues. *Plant Sci* *187*, 1-9.

Goto, C., Tamura, K., Fukao, Y., Shimada, T., *et* Hara-Nishimura, I. (2014). The Novel Nuclear Envelope Protein KAKU4 Modulates Nuclear Morphology in Arabidopsis. *Plant Cell* 26, 2143-2155.

Graumann, K. (2014). Evidence for LINC1-SUN associations at the plant nuclear periphery. *PLoS One* 9, e93406.

Graumann, K., Runions, J., *et* Evans, D.E. (2010). Characterization of SUN-domain proteins at the higher plant nuclear envelope. *Plant J* 61, 134-144.

Hasegawa, K., Ryu, S.J., *et* Kalab, P. (2013). Chromosomal gain promotes formation of a steep RanGTP gradient that drives mitosis in aneuploid cells. *J Cell Biol* 200, 151-161.

Hayward, D., Metz, J., Pellacani, C., *et* Wakefield, J.G. (2014). Synergy between multiple microtubule-generating pathways confers robustness to centrosome-driven mitotic spindle formation. *Dev Cell* 28, 81-93.

Hirokawa, N., Noda, Y., Tanaka, Y., *et* Niwa, S. (2009). Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 682-696.

Honnappa, S., Gouveia, S.M., Weisbrich, A., Damberger, F.F., Bhavesh, N.S., Jawhari, H., Grigoriev, I., van Rijssel, F.J., Buey, R.M., Lawera, A., *et al.* (2009). An EB1-binding motif acts as a microtubule tip localization signal. *Cell* 138, 366-376.

Horio, T., *et* Murata, T. (2014). The role of dynamic instability in microtubule organization. *Front Plant Sci* 5, 511.

Horstman, A., Tonaco, I.A., Boutilier, K., *et* Immink, R.G. (2014). A cautionary note on the use of split-YFP/BiFC in plant protein-protein interaction studies. *Int J Mol Sci* 15, 9628-9643.

Hotta, T., Kong, Z., Ho, C.M., Zeng, C.J., Horio, T., Fong, S., Vuong, T., Lee, Y.R., *et* Liu, B. (2012). Characterization of the Arabidopsis augmin complex uncovers its critical function in the assembly of the acentrosomal spindle and phragmoplast microtubule arrays. *Plant Cell* 24, 1494-1509.

Hu, M., Pei, B.L., Zhang, L.F., *et* Li, Y.Z. (2014). Histone H2B monoubiquitination is involved in regulating the dynamics of microtubules during the defense response to *Verticillium dahliae* toxins in Arabidopsis. *Plant Physiol* 164, 1857-1865.

Huang, J., Chew, T.G., Gu, Y., Palani, S., Kamnev, A., Martin, D.S., Carter, N.J., Cross, R.A., Oliferenko, S., *et* Balasubramanian, M.K. (2016). Curvature-induced expulsion of actomyosin bundles during cytokinetic ring contraction. *Elife* 5.

- Hussey, P.J., Ketelaar, T., *et* Deeks, M.J. (2006). Control of the actin cytoskeleton in plant cell growth. *Annu Rev Plant Biol* 57, 109-125.
- Chan, Y.W., Jeyaprakash, A.A., Nigg, E.A., *et* Santamaria, A. (2012). Aurora B controls kinetochore-microtubule attachments by inhibiting Ska complex-KMN network interaction. *J Cell Biol* 196, 563-571.
- Chavali, P.L., Peset, I., *et* Gergely, F. (2015). Centrosomes and mitotic spindle poles: a recent liaison? *Biochem Soc Trans* 43, 13-18.
- Chen, N., Xu, Y., Wang, X., Du, C., Du, J., Yuan, M., Xu, Z., *et* Chong, K. (2011). OsRAN2, essential for mitosis, enhances cold tolerance in rice by promoting export of intranuclear tubulin and maintaining cell division under cold stress. *Plant Cell Environ* 34, 52-64.
- Chen, X., Kong, X., Zhuang, W., Teng, B., Yu, X., Hua, S., Wang, S., Liang, F., Ma, D., Zhang, S., *et al.* (2016). Dynamic changes in protein interaction between AKAP95 and Cx43 during cell cycle progression of A549 cells. *Sci Rep* 6, 21224.
- Chen, Y.Y., Lin, Y.M., Chao, T.C., Wang, J.F., Liu, A.C., Ho, F.I., *et* Cheng, C.P. (2009). Virus-induced gene silencing reveals the involvement of ethylene-, salicylic acid- and mitogen-activated protein kinase-related defense pathways in the resistance of tomato to bacterial wilt. *Physiol Plant* 136, 324-335.
- Choi, M.C., Raviv, U., Miller, H.P., Gaylord, M.R., Kiris, E., Ventimiglia, D., Needleman, D.J., Kim, M.W., Wilson, L., Feinstein, S.C., *et al.* (2009). Human microtubule-associated-protein tau regulates the number of protofilaments in microtubules: a synchrotron x-ray scattering study. *Biophys J* 97, 519-527.
- Chomicki, G., Wightman, R., *et* Turner, S.R. (2016). A Specific Class of Short Treadmilling Microtubules Enhances Cortical Microtubule Alignment. *Mol Plant* 9, 1214-1216.
- Izawa, D., *et* Pines, J. (2015). The mitotic checkpoint complex binds a second CDC20 to inhibit active APC/C. *Nature* 517, 631-634.
- Jalmi, S.K., *et* Sinha, A.K. (2016). Functional Involvement of a Mitogen Activated Protein Kinase Module, OsMKK3-OsMPK7-OsWRK30 in Mediating Resistance against *Xanthomonas oryzae* in Rice. *Sci Rep* 6, 37974.
- Ji, Z., Gao, H., *et* Yu, H. (2015). CELL DIVISION CYCLE. Kinetochore attachment sensed by competitive Mps1 and microtubule binding to Ndc80C. *Science* 348, 1260-1264.

Joglekar, A.P., *et* Aravamudhan, P. (2016). How the kinetochore switches off the spindle assembly checkpoint. *Cell Cycle* 15, 7-8.

Jorgensen, P., *et* Tyers, M. (2004). How cells coordinate growth and division. *Curr Biol* 14, R1014-1027.

Kalab, P., Pralle, A., Isacoff, E.Y., Heald, R., *et* Weis, K. (2006). Analysis of a RanGTP-regulated gradient in mitotic somatic cells. *Nature* 440, 697-701.

Kamasaki, T., O'Toole, E., Kita, S., Osumi, M., Usukura, J., McIntosh, J.R., *et* Goshima, G. (2013). Augmin-dependent microtubule nucleation at microtubule walls in the spindle. *J Cell Biol* 202, 25-33.

Kamigaki, A., Nito, K., Hikino, K., Goto-Yamada, S., Nishimura, M., Nakagawa, T., *et* Mano, S. (2016). Gateway Vectors for Simultaneous Detection of Multiple Protein-Protein Interactions in Plant Cells Using Bimolecular Fluorescence Complementation. *PLoS One* 11, e0160717.

Kampourakis, T., Sun, Y.B., *et* Irving, M. (2016). Myosin light chain phosphorylation enhances contraction of heart muscle via structural changes in both thick and thin filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, E3039-3047.

Kerppola, T.K. (2008). Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells. *Annu Rev Biophys* 37, 465-487.

Khozaei, M., Fisk, S., Lawson, T., Gibon, Y., Sulpice, R., Stitt, M., Lefebvre, S.C., *et* Raines, C.A. (2015). Overexpression of plastid transketolase in tobacco results in a thiamine auxotrophic phenotype. *Plant Cell* 27, 432-447.

Kohoutova, L., Kourova, H., Nagy, S.K., Volc, J., Halada, P., Meszaros, T., Meskiene, I., Bogre, L., *et* Binarova, P. (2015). The Arabidopsis mitogen-activated protein kinase 6 is associated with gamma-tubulin on microtubules, phosphorylates EB1c and maintains spindle orientation under nitrosative stress. *New Phytol* 207, 1061-1074.

Kollman, J.M., Zelter, A., Muller, E.G., Fox, B., Rice, L.M., Davis, T.N., *et* Agard, D.A. (2008). The structure of the gamma-tubulin small complex: implications of its architecture and flexibility for microtubule nucleation. *Mol Biol Cell* 19, 207-215.

Komaki, S., Abe, T., Coutuer, S., Inze, D., Russinova, E., *et* Hashimoto, T. (2010). Nuclear-localized subtype of end-binding 1 protein regulates spindle organization in Arabidopsis. *J Cell Sci* 123, 451-459.

Komis, G., Mistrik, M., Samajova, O., Doskocilova, A., Ovecka, M., Illes, P., Bartek, J., *et* Samaj, J. (2014). Dynamics and organization of cortical microtubules as revealed by superresolution structured illumination microscopy. *Plant Physiol* 165, 129-148.

- Kudla, J., *et* Bock, R. (2016). Lighting the Way to Protein-Protein Interactions: Recommendations on Best Practices for Bimolecular Fluorescence Complementation Analyses. *Plant Cell* 28, 1002-1008.
- Kueh, H.Y., *et* Mitchison, T.J. (2009). Structural plasticity in actin and tubulin polymer dynamics. *Science* 325, 960-963.
- Lee, K., Zawadzka, A., Czarnocki, Z., Reiter, R.J., *et* Back, K. (2016). Molecular cloning of melatonin 3-hydroxylase and its production of cyclic 3-hydroxymelatonin in rice (*Oryza sativa*). *J Pineal Res* 61, 470-478.
- Lee, Y.R., Li, Y., *et* Liu, B. (2007). Two Arabidopsis phragmoplast-associated kinesins play a critical role in cytokinesis during male gametogenesis. *Plant Cell* 19, 2595-2605.
- Lehti, M.S., Kotaja, N., *et* Sironen, A. (2015). KIF1-binding protein interacts with KIF3A in haploid male germ cells. *Reproduction* 150, 209-216.
- Li, Y., Shen, Y., Cai, C., Zhong, C., Zhu, L., Yuan, M., *et* Ren, H. (2010). The type II Arabidopsis formin14 interacts with microtubules and microfilaments to regulate cell division. *Plant Cell* 22, 2710-2726.
- Lipka, E., Gadeyne, A., Stockle, D., Zimmermann, S., De Jaeger, G., Ehrhardt, D.W., Kirik, V., Van Damme, D., *et* Muller, S. (2014). The Phragmoplast-Orienting Kinesin-12 Class Proteins Translate the Positional Information of the Preprophase Band to Establish the Cortical Division Zone in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* 26, 2617-2632.
- Liu, T., Tian, J., Wang, G., Yu, Y., Wang, C., Ma, Y., Zhang, X., Xia, G., Liu, B., *et* Kong, Z. (2014). Augmin triggers microtubule-dependent microtubule nucleation in interphase plant cells. *Curr Biol* 24, 2708-2713.
- Ma, H., Song, T., Wang, T., *et* Wang, S. (2016a). Influence of Human p53 on Plant Development. *PLoS One* 11, e0162840.
- Ma, Q., Sun, J., *et* Mao, T. (2016b). Microtubule bundling plays a role in ethylene-mediated cortical microtubule reorientation in etiolated Arabidopsis hypocotyls. *J Cell Sci* 129, 2043-2051.
- Maiato, H., Rieder, C.L., *et* Khodjakov, A. (2004). Kinetochore-driven formation of kinetochore fibers contributes to spindle assembly during animal mitosis. *J Cell Biol* 167, 831-840.
- Marangoni, P., Charles, C., Tafforeau, P., Laugel-Haushalter, V., Joo, A., Bloch-Zupan, A., Klein, O.D., *et* Viriot, L. (2015). Phenotypic and evolutionary implications of modulating the ERK-MAPK cascade using the dentition as a model. *Sci Rep* 5, 11658.

- Marx, A., Muller, J., *et* Mandelkow, E. (2005). The structure of microtubule motor proteins. *Adv Protein Chem* 71, 299-344.
- Maurer, S.P., Cade, N.I., Bohner, G., Gustafsson, N., Boutant, E., *et* Surrey, T. (2014). EB1 accelerates two conformational transitions important for microtubule maturation and dynamics. *Curr Biol* 24, 372-384.
- Meunier, S., *et* Vernos, I. (2016). Acentrosomal Microtubule Assembly in Mitosis: The Where, When, and How. *Trends Cell Biol* 26, 80-87.
- Murata, T., Sano, T., Sasabe, M., Nonaka, S., Higashiyama, T., Hasezawa, S., Machida, Y., *et* Hasebe, M. (2013). Mechanism of microtubule array expansion in the cytokinetic phragmoplast. *Nat Commun* 4, 1967.
- Musacchio, A. (2015). The Molecular Biology of Spindle Assembly Checkpoint Signaling Dynamics. *Curr Biol* 25, R1002-1018.
- Nerusheva, O.O., *et* Akiyoshi, B. (2016). Divergent polo box domains underpin the unique kinetoplastid kinetochore. *Open Biol* 6.
- Nie, S., *et* Xu, H. (2016). Riboflavin-Induced Disease Resistance Requires the Mitogen-Activated Protein Kinases 3 and 6 in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* 11, e0153175.
- Novak, D., Kucharova, A., Ovecka, M., Komis, G., *et* Samaj, J. (2015). Developmental Nuclear Localization and Quantification of GFP-Tagged EB1c in *Arabidopsis* Root Using Light-Sheet Microscopy. *Front Plant Sci* 6, 1187.
- O'Toole, E., Greenan, G., Lange, K.I., Srayko, M., *et* Muller-Reichert, T. (2012). The role of gamma-tubulin in centrosomal microtubule organization. *PLoS One* 7, e29795.
- Oda, Y., *et* Fukuda, H. (2011). Dynamics of *Arabidopsis* SUN proteins during mitosis and their involvement in nuclear shaping. *Plant J* 66, 629-641.
- Ovecka, M., Lang, I., Baluska, F., Ismail, A., Illes, P., *et* Lichtscheidl, I.K. (2005). Endocytosis and vesicle trafficking during tip growth of root hairs. *Protoplasma* 226, 39-54.
- Ovecka, M., Takac, T., Komis, G., Vadovic, P., Bekesova, S., Doskocilova, A., Samajova, V., Luptovciak, I., Samajova, O., Schweighofer, A., *et al.* (2014). Salt-induced subcellular kinase relocation and seedling susceptibility caused by overexpression of *Medicago* SIMKK in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 65, 2335-2350.
- Papageorgiou, D.N., Demmers, J., *et* Strouboulis, J. (2013). NP-40 reduces contamination by endogenous biotinylated carboxylases during purification of biotin tagged nuclear proteins. *Protein Expr Purif* 89, 80-83.

Pawar, V., Poulet, A., Detourne, G., Tatout, C., Vanrobays, E., Evans, D.E., *et* Graumann, K. (2016). A novel family of plant nuclear envelope-associated proteins. *J Exp Bot* 67, 5699-5710.

Pedley, K.F., *et* Martin, G.B. (2004). Identification of MAPKs and their possible MAPK kinase activators involved in the Pto-mediated defense response of tomato. *J Biol Chem* 279, 49229-49235.

Petre, B., Saunders, D.G., Sklenar, J., Lorrain, C., Win, J., Duplessis, S., *et* Kamoun, S. (2015). Candidate Effector Proteins of the Rust Pathogen *Melampsora larici-populina* Target Diverse Plant Cell Compartments. *Mol Plant Microbe Interact* 28, 689-700.

Petrovska, B., Jerabkova, H., Kohoutova, L., Cenklova, V., Pochylova, Z., Gelova, Z., Kocarova, G., Vachova, L., Kurejova, M., Tomastikova, E., *et al.* (2013). Overexpressed TPX2 causes ectopic formation of microtubular arrays in the nuclei of acentrosomal plant cells. *J Exp Bot* 64, 4575-4587.

Piedra, F.A., Kim, T., Garza, E.S., Geyer, E.A., Burns, A., Ye, X., *et* Rice, L.M. (2016). GDP-to-GTP exchange on the microtubule end can contribute to the frequency of catastrophe. *Mol Biol Cell* 27, 3515-3525.

Pincus, D., Ryan, C.J., Smith, R.D., Brent, R., *et* Resnekov, O. (2013). Assigning quantitative function to post-translational modifications reveals multiple sites of phosphorylation that tune yeast pheromone signaling output. *PLoS One* 8, e56544.

Poulet, A., Probst, A.V., Graumann, K., Tatout, C., *et* Evans, D. (2016). Exploring the evolution of the proteins of the plant nuclear envelope. *Nucleus*, 1-14.

Radford, S.J., Nguyen, A.L., Schindler, K., *et* McKim, K.S. (2016). The chromosomal basis of meiotic acentrosomal spindle assembly and function in oocytes. *Chromosoma*.

Rasmussen, C.G., Wright, A.J., *et* Muller, S. (2013). The role of the cytoskeleton and associated proteins in determination of the plant cell division plane. *Plant J* 75, 258-269.

Richardson, D.N., Simmons, M.P., *et* Reddy, A.S. (2006). Comprehensive comparative analysis of kinesins in photosynthetic eukaryotes. *BMC Genomics* 7, 18.

Ringli, C., Baumberger, N., Diet, A., Frey, B., *et* Keller, B. (2002). ACTIN2 is essential for bulge site selection and tip growth during root hair development of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 129, 1464-1472.

Rosa, S., Ntoukakis, V., Ohmido, N., Pendle, A., Abranches, R., *et* Shaw, P. (2014). Cell differentiation and development in *Arabidopsis* are associated with changes in histone dynamics at the single-cell level. *Plant Cell* 26, 4821-4833.

- Rupes, I., Webb, B.A., Mak, A., *et* Young, P.G. (2001). G2/M arrest caused by actin disruption is a manifestation of the cell size checkpoint in fission yeast. *Mol Biol Cell* 12, 3892-3903.
- Rutkowski, R., Hofmann, K., *et* Gartner, A. (2010). Phylogeny and function of the invertebrate p53 superfamily. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a001131.
- Sagor, G.H., Chawla, P., Kim, D.W., Berberich, T., Kojima, S., Niitsu, M., *et* Kusano, T. (2015). The polyamine spermine induces the unfolded protein response via the MAPK cascade in Arabidopsis. *Front Plant Sci* 6, 687.
- Samejima, K., Platani, M., Wolny, M., Ogawa, H., Vargiu, G., Knight, P.J., Peckham, M., *et* Earnshaw, W.C. (2015). The Inner Centromere Protein (INCENP) Coil Is a Single alpha-Helix (SAH) Domain That Binds Directly to Microtubules and Is Important for Chromosome Passenger Complex (CPC) Localization and Function in Mitosis. *J Biol Chem* 290, 21460-21472.
- Sandblad, L., Busch, K.E., Tittmann, P., Gross, H., Brunner, D., *et* Hoenger, A. (2006). The Schizosaccharomyces pombe EB1 homolog Mal3p binds and stabilizes the microtubule lattice seam. *Cell* 127, 1415-1424.
- Shaw, S.L. (2013). Reorganization of the plant cortical microtubule array. *Curr Opin Plant Biol* 16, 693-697.
- Sheremet, Y.A., Yemets, A.I., *et* Blume, Y.B. (2012). Inhibitors of tyrosine kinases and phosphatases as a tool for the investigation of microtubule role in plant cold response. *Tsitol Genet* 46, 3-9.
- Schmit, A.C. (2002). Acentrosomal microtubule nucleation in higher plants. *Int Rev Cytol* 220, 257-289.
- Schuster, M., Kilaru, S., Latz, M., *et* Steinberg, G. (2015). Fluorescent markers of the microtubule cytoskeleton in Zymoseptoria tritici. *Fungal Genet Biol* 79, 141-149.
- Schuyler, S.C., Liu, J.Y., *et* Pellman, D. (2003). The molecular function of Ase1p: evidence for a MAP-dependent midzone-specific spindle matrix. Microtubule-associated proteins. *J Cell Biol* 160, 517-528.
- Schweitzer, S.C., *et* Evans, R.M. (1998). Vimentin and lipid metabolism. *Subcell Biochem* 31, 437-462.
- Smekalova, V., Daskocilova, A., Komis, G., *et* Samaj, J. (2014). Crosstalk between secondary messengers, hormones and MAPK modules during abiotic stress signalling in plants. *Biotechnol Adv* 32, 2-11.

So, E.C., Schroeder, G.N., Carson, D., Mattheis, C., Mousnier, A., Broncel, M., Tate, E.W., *et* Frankel, G. (2016). The Rab-binding Profiles of Bacterial Virulence Factors during Infection. *J Biol Chem* 291, 5832-5843.

Spencer, J.M., Morgan, M.B., Trapp, K.M., *et* Moon, S.D. (2013). Topical formulation engendered alteration in p53 and cyclobutane pyrimidine dimer expression in chronic photodamaged patients. *J Drugs Dermatol* 12, 336-340.

Staiger, C.J., Sheahan, M.B., Khurana, P., Wang, X., McCurdy, D.W., *et* Blanchoin, L. (2009). Actin filament dynamics are dominated by rapid growth and severing activity in the Arabidopsis cortical array. *J Cell Biol* 184, 269-280.

Stepanova, T., Smal, I., van Haren, J., Akinci, U., Liu, Z., Miedema, M., Limpens, R., van Ham, M., van der Reijden, M., Poot, R., *et al.* (2010). History-dependent catastrophes regulate axonal microtubule behavior. *Curr Biol* 20, 1023-1028.

Stewart, K., Gaitan, Y., Shafer, M.E., Aoudjit, L., Hu, D., Sharma, R., Tremblay, M., Ishii, H., Marcotte, M., Stanga, D., *et al.* (2016). A Point Mutation in p190A RhoGAP Affects Ciliogenesis and Leads to Glomerulocystic Kidney Defects. *PLoS Genet* 12, e1005785.

Stoppin, V., Vantard, M., Schmit, A.C., *et* Lambert, A.M. (1994). Isolated Plant Nuclei Nucleate Microtubule Assembly: The Nuclear Surface in Higher Plants Has Centrosome-like Activity. *Plant Cell* 6, 1099-1106.

Styers, M.L., Kowalczyk, A.P., *et* Faundez, V. (2005). Intermediate filaments and vesicular membrane traffic: the odd couple's first dance? *Traffic* 6, 359-365.

Swaffer, M.P., Jones, A.W., Flynn, H.R., Snijders, A.P., *et* Nurse, P. (2016). CDK Substrate Phosphorylation and Ordering the Cell Cycle. *Cell* 167, 1750-1761 e1716.

Tajik, A., Zhang, Y., Wei, F., Sun, J., Jia, Q., Zhou, W., Singh, R., Khanna, N., Belmont, A.S., *et* Wang, N. (2016). Transcription upregulation via force-induced direct stretching of chromatin. *Nat Mater* 15, 1287-1296.

Takahashi, Y., Soyano, T., Kosetsu, K., Sasabe, M., *et* Machida, Y. (2010). HINKEL kinesin, ANP MAPKKs and MKK6/ANQ MAPKK, which phosphorylates and activates MPK4 MAPK, constitute a pathway that is required for cytokinesis in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol* 51, 1766-1776.

Tamura, K., Goto, C., *et* Hara-Nishimura, I. (2015). Recent advances in understanding plant nuclear envelope proteins involved in nuclear morphology. *J Exp Bot* 66, 1641-1647.

Teige, M., Scheikl, E., Eulgem, T., Doczi, R., Ichimura, K., Shinozaki, K., Dangl, J.L., *et Hirt, H.* (2004). The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in *Arabidopsis*. *Mol Cell* 15, 141-152.

Thiebaut, R., Esmiol, S., Lecine, P., Mahfouz, B., Hermant, A., Nicoletti, C., Parnis, S., Perroy, J., Borg, J.P., Pascoe, L., *et al.* (2016). Characterization and Genetic Analyses of New Genes Coding for NOD2 Interacting Proteins. *PLoS One* 11, e0165420.

Tilney, L.G., Bryan, J., Bush, D.J., Fujiwara, K., Mooseker, M.S., Murphy, D.B., *et Snyder, D.H.* (1973). Microtubules: evidence for 13 protofilaments. *J Cell Biol* 59, 267-275.

Trifonov, S., Yamashita, Y., Kase, M., Maruyama, M., *et Sugimoto, T.* (2016). Overview and assessment of the histochemical methods and reagents for the detection of beta-galactosidase activity in transgenic animals. *Anat Sci Int* 91, 56-67.

Uehara, R., Kamasaki, T., Hiruma, S., Poser, I., Yoda, K., Yajima, J., Gerlich, D.W., *et Goshima, G.* (2016). Augmin shapes the anaphase spindle for efficient cytokinetic furrow ingression and abscission. *Mol Biol Cell* 27, 812-827.

Vale, R.D. (2003). The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* 112, 467-480.

Vildanova, M.S., Wang, W., *et Smirnova, E.A.* (2014). Specific organization of Golgi apparatus in plant cells. *Biochemistry (Mosc)* 79, 894-906.

Vleugel, M., Kok, M., *et Dogterom, M.* (2016). Understanding force-generating microtubule systems through in vitro reconstitution. *Cell Adh Migr* 10, 475-494.

von Wangenheim, D., Rosero, A., Komis, G., Samajova, O., Ovecka, M., Voigt, B., *et Samaj, J.* (2015). Endosomal Interactions during Root Hair Growth. *Front Plant Sci* 6, 1262.

Wade, R.H. (2009). On and around microtubules: an overview. *Mol Biotechnol* 43, 177-191.

Wade, R.H., *et Hyman, A.A.* (1997). Microtubule structure and dynamics. *Curr Opin Cell Biol* 9, 12-17.

Wang, H.Y., Yu, Y., Chen, Z.L., *et Xia, G.X.* (2005). Functional characterization of *Gossypium hirsutum* profilin 1 gene (GhPFN1) in tobacco suspension cells. Characterization of in vivo functions of a cotton profilin gene. *Planta* 222, 594-603.

Wasteneys, G.O., *et Ambrose, J.C.* (2009). Spatial organization of plant cortical microtubules: close encounters of the 2D kind. *Trends Cell Biol* 19, 62-71.

- Wickstead, B., *et* Gull, K. (2007). Dyneins across eukaryotes: a comparative genomic analysis. *Traffic* 8, 1708-1721.
- Wilczynska, A., Git, A., Argasinska, J., Belloc, E., *et* Standart, N. (2016). CPEB and miR-15/16 Co-Regulate Translation of Cyclin E1 mRNA during *Xenopus* Oocyte Maturation. *PLoS One* 11, e0146792.
- Woodhouse, F.G., *et* Goldstein, R.E. (2013). Cytoplasmic streaming in plant cells emerges naturally by microfilament self-organization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 14132-14137.
- Yang, C., Hao, J., Kong, D., Cui, X., Zhang, W., Wang, H., Guo, X., Ma, S., Liu, X., Pu, P., *et al.* (2014). ATM-mediated Mad1 Serine 214 phosphorylation regulates Mad1 dimerization and the spindle assembly checkpoint. *Carcinogenesis* 35, 2007-2013.
- Ye, L., Li, L., Wang, L., Wang, S., Li, S., Du, J., Zhang, S., *et* Shou, H. (2015). MPK3/MPK6 are involved in iron deficiency-induced ethylene production in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci* 6, 953.
- Zhang, R., Alushin, G.M., Brown, A., *et* Nogales, E. (2015). Mechanistic Origin of Microtubule Dynamic Instability and Its Modulation by EB Proteins. *Cell* 162, 849-859.
- Zhang, X., Henriques, R., Lin, S.S., Niu, Q.W., *et* Chua, N.H. (2006). *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nat Protoc* 1, 641-646.
- Zhang, Y., Iakovidis, M., *et* Costa, S. (2016). Control of patterns of symmetric cell division in the epidermal and cortical tissues of the *Arabidopsis* root. *Development* 143, 978-982.
- Zhou, M., *et* Wang, Y.L. (2008). Distinct pathways for the early recruitment of myosin II and actin to the cytokinetic furrow. *Mol Biol Cell* 19, 318-326.

Webové stránky:

http://www.abcam.com/webinars/introduction-to-immunoprecipitation-and-troubleshooting-webinar?utm_source=Webinar&utm_medium=Video&utm_term=IP_intro-to-ip-2011_Youtube&utm_campaign=Application-webinar (dostupné 5. 4. 2016)

<http://us.bioneer.com/products/vn/vn-fusionlibrary-overview.aspx>
(dostupné 30. 3. 2017)

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

AD	aktivační doména
ADP	adenosindifosfát
ANP	Arabidopsis NPK1-related protein kinase
ATP	adenosintrifosfát
<i>attB</i>	attachement site B
BiFC	bimolekulární fluorescenční komplementace
BSA	bovinní sérový albumin
Cdc20	cell division cycle 20
Cdk	cyclin-dependent kinase, cyklin-dependentní kináza
cDNA	komplementární DNA
CH	calponin homology
C-Mad2	uzavřená forma Mad2
Co-IP	ko-imunoprecipitace
Col-0	Columbia
CPC	chromosome passenger complex
DAPI	4',6-diamidino-2-fenylindol
DBD	DNA-binding domain, DNA-vazebná doména
DMSO	dimetylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTPs	deoxyribonukleotidtrifosfáty
dsDNA	dvouvláknová DNA
DTT	dithiotreitol
EB	end binding protein
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	kys. etylendiamintetraoctová
EGTA	kys. etylenglykoltetraoctová
E-místo	exchangeable místo
F-aktin	fibrilární aktin
Fw primer	forward primer
G-aktin	globulární aktin
GCP	γ -tubulin complex proteins
GFP	green fluorescent protein

GDP	guanosindifosfát
gDNA	genomická DNA
GTP	guanosintrifosfát
HEPES	N-2-hydroxyetyl piperazin-N'-2-etansulfonová kyselina
HTB1	histon H2B 1
HYG	hygromycin
KAN	kanamycin
kMTs	kortikální mikrotubuly
LB	lysogeny broth
LD	loading dye
MCAK	<i>mitotic centromere-associated kinesin</i>
MKK6	mitogen-aktivovaná proteinkinázakináza 6
Mad2	mitotic arrest deficiency
MAPK	mitogen-aktivovaná proteinkináza
MAPKK (MAP2K)	mitogen-aktivovaná proteinkinázakináza
MAPKKK (MAP3K)	mitogen-aktivovaná proteinkinázakinázakináza
MAP(s)	microtubule-associated protein(s)
MES	4-morfolin-etansulfonová kyselina
MS analýza	mass spektrometry analýza
MS médium	Murashige a Skoog médium
MTOC(s)	microtubule organizing centre(s)
MTSB	microtubule-stabilizing buffer
N-místo	nonexchangeable místo
NP-40	Nonidet P-40
OD	optical density
O-Mad2	otevřená forma Mad2
OP18	onkoprotein 18
PAA	polyakrylamid
PBS	phosphate-buffered saline, fosfátový pufr
PCR	polymerase chain reaction
PIPES	piperazin-N,N'-bis(2-etansulfonová kyselina)
PPB	preprophase band, předprofázní svazek
PVDF	polyvinylidendifluorid
Ran	Ras-related nuclear protein

RCC1	regulator of chromosome condensation 1
Re primer	reverse primer
RFP	red fluorescent protein, červený fluorescenční protein
RNA	ribonukleová kyselina
SAC	spindle assembly checkpoint
SD	směrodatná odchylka
SDS-PAGE	sodium dodecylsulphate PAA gel electrophoresis
TAE	tris-acetate-EDTA buffer, tris-acetát-EDTA pufr
TB	transfer buffer, transferový pufr
TBS	tris-buffered saline
TBS-T	TBS s přísávkem Tween 20
T-DNA	transfer DNA
T0, 1, 2	mateřská, 1., 2. generace transformantů
+TIP	plus-end tracking protein
VC	C-terminální část Venus
VN	N-terminální část Venus
WB	western blotting
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid
YEB	yeast extract beef
YFP	yellow fluorescent protein, žlutý fluorescenční protein
Y2H	yeast 2-hybrid assay, kvasinkový dvouhybridní systém
γ -TuRC	γ -tubulin ring complex