

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Vyhodnocení a validace proteomické analýzy vlivu taxolu na kořeny Arabidopsis

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

| | |
|-------------------|--------------------------------|
| Autor: | Petra Knotková |
| Studijní program: | B1406 Biochemie |
| Studijní obor: | Biochemie |
| Forma studia: | Prezenční |
| Vedoucí práce: | Ing. Tomáš Takáč, Ph.D. |
| Rok: | 2015 |

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

Poděkování

Děkuji především vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Tomášovi Takáčovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a ochotu, věnovaný čas a cenné rady a připomínky. Dále děkuji Mgr. Olze Šamajové, Dr. za pomoc při práci na konfokálním laserovém skenovacím mikroskopu. V neposlední řadě děkuji celému Oddělení buněčné biologie CRH za příjemné pracovní prostředí a ochodu vždy poradit. Tato práce byla podpořena studentským projektem IGA PFF2015_015.

Bibliografická identifikace

| | |
|-------------------------|--|
| Jméno a příjmení autora | Petra Knotková |
| Název práce | Vyhodnocení a validace proteomické analýzy vlivu taxolu na kořeny <i>Arabidopsis</i> |
| Typ práce | Bakalářská |
| Pracoviště | Centrum regionu Haná pro biotechnologický výzkum, Oddělení buněčné biologie |
| Vedoucí práce | Ing. Tomáš Takáč, Ph.D. |
| Rok obhajoby práce | 2015 |

Abstrakt

Mezi životně důležité buněčné struktury se řadí cytoskelet, který představuje síť proteinových vláken lokalizovaných v cytoplazmě. Zajišťuje růst a prodlužování buňky, její dělení a oporu. U rostlin je cytoskelet tvořen dvěma druhy proteinových vláken: mikrotubuly a aktinová filamenta. Stavební složkou mikrotubulů jsou proteiny α -tubulin a β -tubulin, u aktinových filament je to aktin. Pro studium cytoskeletu je možno použít přírodní toxiny, které interagují s cytoskeletem. V této bakalářské práci byl použit diterpenoidní alkaloid taxol. Taxol se váže na β -tubulin a inhibuje depolymerizaci mikrotubulů, čímž narušuje jejich funkci. Proteomická analýza umožňuje zjistit proteinové složení v buňce, pletivu, orgánu nebo celém organismu.

Teoretická část práce je zaměřena na popis rostlinného cytoskeletu s důrazem na mikrotubuly, charakterizaci taxolu, jeho vlivu na růst rostlin a využití pro proteomickou analýzu.

V experimentální části je vyhodnocen vliv taxolu na fenotyp kořenů *Arabidopsis thaliana*, na dynamiku mikrotubulů a dále vyhodnocení proteomické analýzy vlivu taxolu na kořeny *Arabidopsis thaliana*. Na základě výsledků proteomické analýzy byly vybrány proteiny (Beclin 1, Sec14p a profilin), které vykazovaly změnu abundance po ošetření taxolem. Tyto proteiny mohou zajišťovat propojení cytoskeletu s transportem vezikul a také propojení mikrotubulů a aktinových filament. Jejich změna abundance po ošetření taxolem byla ověřena metodou imunoblotování u profilinu nebo pozorováním změny intenzity fluorescence u Beclin 1 a Sec14p fuzních konstruktů s GFP pod kontrolou nativního promotoru ve stabilně transformovaných semenáčcích *Arabidopsis*. Metodou imunoblotování byla také analyzována změna abundance α -tubulinu, β -tubulinu a aktinu po ošetření taxolem v kořenech *Arabidopsis* ekotyp Columbia a změna abundance těchto proteinů u mutanta *Arabidopsis der1-3*, který má nefunkční isovariantu aktin2 pro sledování propojení aktinových filament a mikrotubulů.

Výsledky práce poukázaly nejen na inhibiční účinek taxolu na růst primárních a postranních kořenů, gravitropismus a na zvýšení abundance proteinů Beclin1 a Sec14p, ale i na těsné propojení aktinového cytoskeletu a mikrotubulů.

| | |
|---------------|---|
| Klíčová slova | Cytoskelet, mikrotubuly, taxol, α -tubulin, β -tubulin, proteomická analýza, Beclin 1, Sec14 |
| Počet stran | 86 |
| Počet příloh | 12 |
| Jazyk | Český |

Bibliographical identification

| | |
|--------------------------------|--|
| Autor's first name and surname | Petra Knotková |
| Title | Evaluation and validation of taxol induced changes in <i>Arabidopsis</i> root proteome |
| Type of thesis | Bachelor |
| Department | Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Department of Cell Biology |
| Supervisor | Ing. Tomáš Takáč Ph.D. |
| The year of presentation | 2015 |

Abstract

The cytoskeleton is a very important cellular structure. It represents a network of protein filaments which are localized in cytoplasm. Cytoskeleton allows cell growth, elongation, division and mechanical support. Plant cytoskeleton consists of two protein filaments: microtubules and actin filaments. Structural components of microtubules are α -tubulin and β -tubulin. Actin filaments are composed of protein called actin. Natural toxins which interacts with cytoskeleton can be used for cytoskeleton investigation. In this thesis we used diterpenoid alkaloid taxol. Taxol binds to β -tubulin and inhibits microtubule depolymerization, which alters their function. Proteomics allows the identification of proteins in cell, tissue, organ or in whole organism.

The theoretical part of this thesis focuses on description of plant cytoskeleton, mainly microtubules, characterization of taxol and its effect on plant growth. The current knowledge about the effects of taxol on proteome of organisms is summarised as well.

The experimental part shows evaluation of taxol induced changes in *Arabidopsis thaliana* root proteome, impact of taxol on microtubule dynamics and *Arabidopsis* root phenotype. For validation of proteomic data, we selected Beclin 1, Sec14p and profilin which showed changes in their abundance after taxol treatment. These proteins are promising candidates to play important role in crosstalk between cytoskeleton and vesicular trafficking, as well as between actin and microtubules. The change in their abundance was verified using immunoblotting (for profilin) or by microscopic observation of stably transformed *Arabidopsis* plants expressing Beclin 1 and Sec14p-GFP fusion constructs under their native promoter. Moreover, the actin-tubulin interaction was studied by immunoblotting-based monitoring of α -tubulin, β -tubulin and actin abundance after taxol treatment in *Arabidopsis* Columbia ecotype and *Arabidopsis der1-3* mutant which express nonfunctional actin2 isovariant.

Results showed not only that taxol inhibits growth of primary and lateral roots, gravitropism and cause increase of Beclin1 and Sec14p abundance, but also that actin filaments and microtubules are tightly connected in their functions.

| | |
|----------------------|---|
| Keywords | Cytoskeleton, microtubules, taxol, α -tubulin, β -tubulin, proteomic analysis, Beclin 1, Sec14 |
| Number of pages | 86 |
| Number of appendices | 12 |
| Language | Czech |

OBSAH

| | | |
|--------|--|----|
| 1 | ÚVOD | 1 |
| 2 | SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY | 2 |
| 2.1 | Cytoskelet u rostlin | 2 |
| 2.1.1 | Mikrotubuly | 2 |
| 2.1.2 | Aktinová filamenta | 11 |
| 2.2 | Taxol | 11 |
| 2.2.1 | Struktura | 11 |
| 2.2.2 | Účinky taxolu na rostliny | 12 |
| 2.3 | Proteomická analýza vlivu taxolu | 17 |
| 2.3.1 | Příprava vzorku | 17 |
| 2.3.2 | Separace proteinů | 18 |
| 2.3.3 | Detekce, kvantifikace a identifikace proteinů | 18 |
| 2.3.4 | Příklady výsledků gelové proteomické analýzy | 19 |
| 2.4 | Charakterizace proteinu Beclin 1 u rostlin | 19 |
| 2.5 | Charakterizace proteinu Sec14p u rostlin | 20 |
| 2.6 | Charakterizace proteinu profilin u rostlin | 20 |
| 3 | EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 21 |
| 3.1 | Materiál | 21 |
| 3.1.1 | Biologický materiál | 21 |
| 3.1.2 | Chemikálie | 21 |
| 3.1.3 | Roztoky a média | 23 |
| 3.1.4 | Přístroje | 25 |
| 3.1.5 | Programy a databáze | 25 |
| 3.2 | Metody | 26 |
| 3.2.1 | Sterilizace semen | 26 |
| 3.2.2 | Příprava kultivačního média | 26 |
| 3.2.3 | Sázení, ovlivňování a homogenizace rostlin | 26 |
| 3.2.4 | Extrakce proteinů | 27 |
| 3.2.5 | Měření obsahu proteinů ve vzorku metodou Bradfordové | 27 |
| 3.2.6 | Denaturující polyakrylamidová elektroforéza | 27 |
| 3.2.7 | Imunoblotování | 28 |
| 3.2.8 | Vliv taxolu na fenotyp kořenů Arabidopsis | 30 |
| 3.2.9 | Konfokální fluorescenční mikroskopie | 31 |
| 3.2.10 | Bioinformatické vyhodnocení proteomické analýzy vlivu taxolu na kořeny Arabidopsis | 31 |
| 4 | VÝSLEDKY A DISKUSE | 33 |

| | | |
|-------|--|----|
| 4.1 | Vliv taxolu na fenotyp kořenů Arabidopsis | 33 |
| 4.1.1 | Délka a rychlost růstu primárního kořene | 33 |
| 4.1.2 | Počet a délka postranních kořenů..... | 35 |
| 4.1.3 | Délka, počet kořenových vlásků a další rozdíly..... | 36 |
| 4.1.4 | Vliv taxolu na gravitropismus kořene Arabidopsis..... | 38 |
| 4.2 | Pozorování dynamiky mikrotubulů po vlivu taxolu | 39 |
| 4.3 | Vyhodnocení proteomické analýzy vlivu taxolu na kořeny Arabidopsis .. | 40 |
| 4.3.1 | Proteiny související s cytoskeletem | 43 |
| 4.3.2 | Proteiny ovlivněné taxolem důležité pro membránový transport | 45 |
| 4.4 | Vliv taxolu na abundanci α-, β-tubulinu, aktinu a profilinu (imunoblotování) | 47 |
| 4.5 | Analýza abundance α-, β-tubulinu a aktinu u mutantu <i>der1-3</i> | 51 |
| 4.6 | Pozorování lokalizace Beclin 1, Sec14p | 54 |
| 4.7 | Mikroskopické pozorování vlivu taxolu na abundanci proteinů Beclin 1 a Sec14p | 56 |
| 5 | ZÁVĚR | 60 |
| 6 | LITERATURA | 61 |
| 7 | SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK | 68 |
| 8 | PŘÍLOHY | 70 |

CÍLE PRÁCE

Cílem teoretické části bakalářské práce je vypracování literární rešerše na téma:

- rostlinný cytoskelet a jeho funkce
- charakterizace taxolu a jeho vlivu na růst rostlin
- proteomika a taxol

Cíle experimentální části práce:

- pozorování vlivu taxolu na fenotyp kořenů *Arabidopsis thaliana*
- pozorování vlivu taxolu na dynamiku mikrotubulů
- vyhodnocení proteomické analýzy vlivu taxolu na kořeny *Arabidopsis thaliana*
- analýza abundance α -tubulinu, β -tubulinu a aktinu v kořenech *Arabidopsis thaliana* po ošetření taxolem
- analýza abundance α -tubulinu, β -tubulinu a aktinu v kořenech aktinového mutantu *Arabidopsis thaliana der1-3*
- analýza abundance proteinů Beclin 1, Sec14p a profilin v kořenech *Arabidopsis thaliana* po ošetření taxolem

1 ÚVOD

Cytoskelet, buněčná kostra, u rostlin stejně jako u všech dalších organismů patří mezi struktury nezbytné pro život buňky. Svými unikátními vlastnostmi jako je např. dynamická nestabilita, umožňuje vývoj, růst, rozmnožování buňky a všechny další procesy a funkce s tímto spojené (transport organel a vezikul, mechanická opora, vnitřní buněčná organizace, tvorba dělicího vřeténka). U rostlin se setkáváme s dvěma druhy cytoskeletálních vláken (mikrotubuly a aktinová filamenta), živočišné buňky obsahují navíc ještě intermediální filamenta. Mikrotubuly jsou složeny z isoform proteinů α -tubulinu a β -tubulinu, aktinová filamenta obsahují isovarianty aktinu (Alberts *et al.*, 2008). U *Arabidopsis* existuje 8 aktinových isovariant, mutant *Arabidopsis der1-3* tvoří nefunkční isovariantu aktin2 (Ringli *et al.*, 2002).

Přírodní toxiny produkované různými rostlinami, houbami atd. se často váží právě na mikrotubuly nebo aktin. Tento mechanismus zajistí narušení dynamiky cytoskeletálních vláken a ohrožení života zasaženého organismu. Efekt některých těchto toxinů je využíván pro objasnění funkce cytoskeletálních vláken v různých buněčných procesech. Další využití je také v lékařství pro nádorovou léčbu. Mezi tyto toxiny patří i taxol vážící se na mikrotubuly (konkrétně na β -tubulin) a způsobující jejich stabilizaci, tím i inhibici depolymerizace a porušení dynamické nestability. Diterpenoidní alkaloid taxol byl objeven v kůře tisu tichomořského (Alberts *et al.*, 2008; Freedman *et al.*, 2009).

V této bakalářské práci byl hodnocen vliv taxolu na kořeny rostlin *Arabidopsis thaliana*. Zhodnocení vlivu může být dosaženo přímým nebo mikroskopickým pozorováním fenotypu kořenů *Arabidopsis* ošetřených taxolem a určením rozdílů abundance cytoskeletálních proteinů (tubulinů a aktinu) metodou imunoblotování mezi kontrolními rostlinami a rostlinami ošetřenými taxolem. Pro komplexní posouzení vlivu taxolu je možné srovnat změny v proteomu mezi kontrolními a taxolem ošetřenými rostlinami (proteomická analýza). Proteomická analýza vlivu taxolu na kořeny *Arabidopsis* ukázala mj. změnu abundance u proteinů: Beclin 1, Sec14p a profilin. A abundance těchto proteinů po ošetření taxolem byla v rámci této práce analyzována metodou imunoblotování a pozorováním intenzity fluorescence v transgenních rostlinách *Arabidopsis* nesoucích GFP fuzní konstrukt s Beclin 1 a Sec14p pod nativním promotorem konfokálním laserovým skenovacím mikroskopem.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

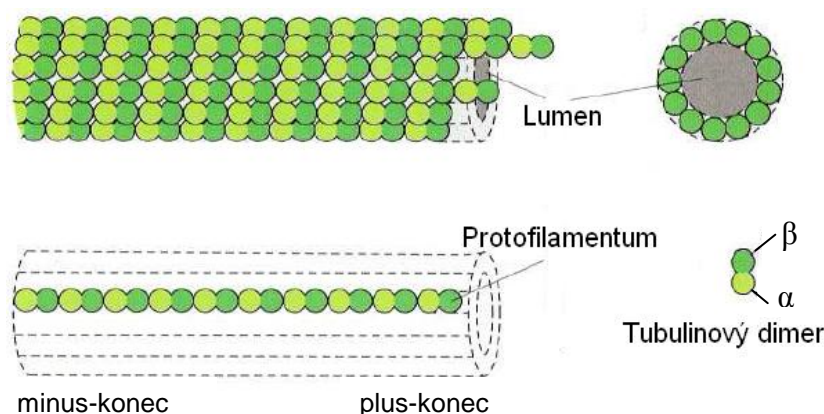
2.1 CYTOSKELET U ROSTLIN

Rostlinný cytoskelet je tvořen složitým systémem proteinových vláken, která jsou obsažena v cytoplazmě všech buněk. Cytoskelet je životně důležitou strukturou, neboť zajišťuje správný tvar buňky, správnou vnitřní organizaci, rozestup chromozomů při mitóze, rozdělení buňky a její růst. Je zodpovědný za reakci na měnící se vnější podmínky, pohyb organel a vezikul uvnitř buňky, podílí se na tvorbě buněčné stěny a na mechanické opoře. Tyto funkce jsou umožněny především díky dynamické nestabilitě cytoskeletálních vláken (schopnosti jejich neustálé polymerizace a depolymerizace), jedná se tedy o velmi dynamický útvar (Alberts *et al.*, 2008).

Existují tři typy proteinových vláken tvořících cytoskelet: mikrotubuly, aktinová filamenta (mikrofilamenta) a intermediální filamenta, přičemž poslední jmenované jsou charakteristické pro živočišné buňky, kde se nacházejí například pod vnitřní jadernou membránou nebo v místech mezibuněčných spojů a vytvářejí provazovitá vlákna složená z různorodých proteinů (Alberts *et al.*, 2008; Herrmann a Strelkov, 2011).

2.1.1 Mikrotubuly

Mikrotubuly jsou dlouhé, duté a nepříliš ohebné trubice o průměru 25 nm tvořené z proteinů α -tubulinu a β -tubulinu, které se spojují v tubulinový dimer. Každý mikrotubulový válec je tvořen 13 protofilamenty, v nichž se opakují α -tubulinové a β -tubulinové jednotky (Obr. 1).



Obr. 1: Znárodnění složení mikrotubulu z α -tubulinu a β -tubulinu tvořících tubulinové dimery, které se opakují v protofilamentu a umožňují polaritu mikrotubulu (plus-konec a minus-konec). Každý mikrotubul je tvořen 13 protofilamenty uspořádanými do kruhu (vpravo nahoře). Upraveno dle Alberts *et al.*, 2001.

Jeden konec mikrotubulu je tak zakončen α -tubulinem (tzv. „minus-konec“), kdežto druhý je zakončen β -tubulinem (tzv. „plus-konec“) (Alberts *et al.*, 2001). Při vykonávání svých funkcí musí mikrotubuly interagovat s množstvím proteinů označovaných jako proteiny asociované s mikrotubuly (MAP) (Hirokawa *et al.*, 1998).

2.1.1.1 α -tubulin a β -tubulin

Tyto dva proteiny, jak již bylo uvedeno, jsou složkami mikrotubulů. V buňkách se mohou vyskytovat v několika různých isoformách a počet těchto isoform se mezi organismy liší. U *Arabidopsis thaliana* bylo objeveno devět genů kódujících β -tubulin, ovšem dva tyto geny kódují stejnou isoformu, proto existuje pouze osm isoform β -tubulinu. Těchto osm isoform má aminokyselinovou sekvenci shodnou z 89–96 %. Isoformy obsahují 444–450 aminokyselin (Snustad *et al.*, 1992). Dále bylo objeveno šest genů kódujících 4 různé isoformy α -tubulinu. Všechny isoformy obsahují 450 aminokyselin (Kopczak *et al.*, 1992). Isoformy se liší především aminokyselinami lokalizovanými na C-konci (Wiche *et al.*, 1981).

Aminokyselinová sekvence α -tubulinu a β -tubulinu je shodná přibližně z 50 % a molární hmotnost obou tubulinů je přibližně 50 000 Da (Desai a Mitchison, 1997).

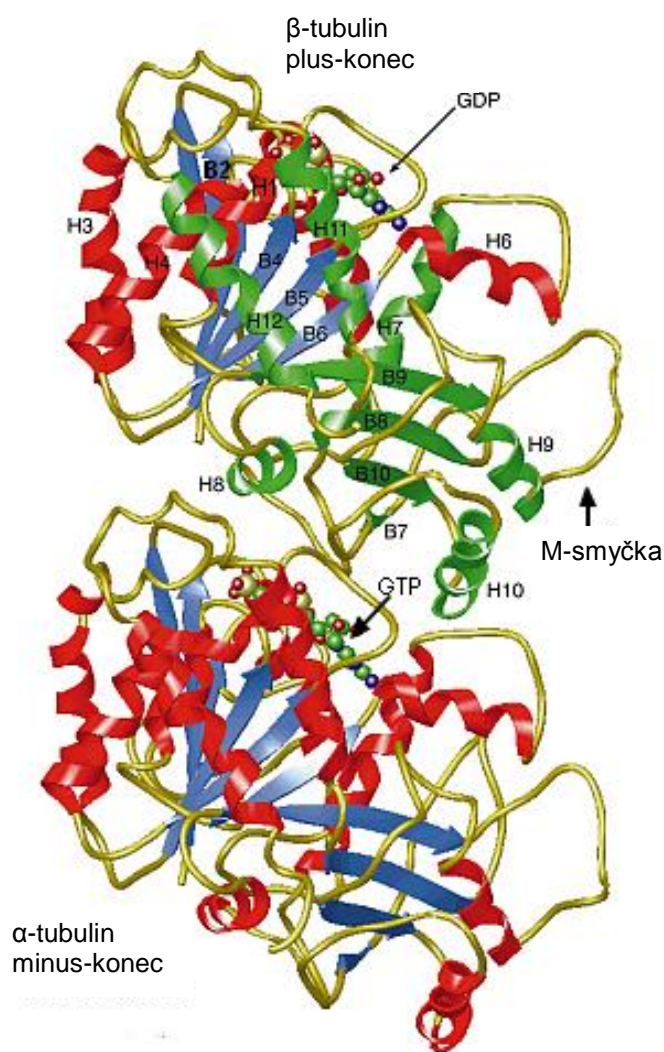
Struktura

Struktury α -tubulinu a β -tubulinu jsou si velmi podobné (Obr. 2). Ve střední části se nachází 2 β -skládané listy tvořené celkem 10 β -vláknů a kolem nich je umístěno 12 α -helixů. Struktura jednotlivých tubulinů se dělí na tři části: N-koncová doména, která obsahuje vazebné místo pro GTP nebo GDP, střední doména a C-koncová doména, která se nachází na vnější straně mikrotubulů a má zde proto možnost interagovat s molekulárními motory a dalšími proteiny asociovanými s mikrotubuly (Nogales *et al.*, 1998).

N-koncová doména je tvořena z 205 aminokyselin. Obsahuje tři α -helixy (H3, H4, H5), které se nacházejí na jedné straně tubulinu a dva α -helixy (H1 a H2) lokalizované na opačné straně. Dále ji tvoří pět β -vláken (B1–B5) (Nogales *et al.*, 1998). Jak α -tubulin, tak β -tubulin obsahují ve svých molekulách vazebné místo pro GTP. U α -tubulinu je molekula GTP silně vázána a proto nedochází k její výměně ani hydrolyze, kdežto nukleotid u β -tubulinu je vyměnitelný a hydrolyzovatelný na GDP. Tato skutečnost je způsobena tím, že vazebné místo pro GTP/GDP u β -tubulinu je vystaveno na povrchu a dochází zde tedy snadno k hydrolyze i výměně nukleotidu. U α -tubulinu je

vazebné místo pro GTP zakryto dalšími strukturami a tedy málo přístupné (Alberts *et al.*, 2008; Nogales *et al.*, 1998). Vlákno B6 a α -helix H6 se nachází na rozhraní mezi N-koncovou a střední doménou. Střední doména je tvořena aminokyselinami označenými 206–381. Obsahuje čtyři α -helixy (H7–H10) a čtyři β -vlákna (B7–B10). C-koncová doména obsahuje dva α -helixy (H11 a H12) (Nogales *et al.*, 1998).

V mikrotubulech se uplatňují jednak vazby mezi vrchními a spodními částmi tubulinových dimerů a mezi tubuliny v rámci jednoho dimeru a jednak boční vazby mezi stejnými tubulinovými proteiny (α - α , β - β). Tyto postranní vazby jsou příčinou nízké ohebnosti mikrotubulů (Alberts *et al.*, 2001).



Obr. 2: Struktura α -tubulinu a β -tubulinu se znázorněnými β -vláknými (modře) a α -helixy (červeně). β -vlákna a α -helixy tvořící C-koncovou a střední doménu jsou znázorněny zeleně u molekuly β -tubulinu (nahore). Žlutě jsou znázorněny smyčky mezi β -vláknými a α -helixy. GDP u β -tubulinu (nahore) a GTP u α -tubulinu (dole) jsou znázorněny zeleně. Písmenem H jsou označeny α -helixy a písmenem B β -vlákna. Pohled na tubulinový dimer z vnější strany mikrotubulu. Upraveno dle Erickson, 1998.

Podélné kontakty uvnitř tubulinového dimeru i mezi dvěma dimery jsou si velmi podobné. Smyčka mezi α -helixy H7 a H8 a i sám α -helix H8 vytvářejí kontakty s nukleotidem vazebného partnera. Do postranních kontaktů je zapojena M-smyčka (smyčka mezi α -helixem H9 a β -vlákem B9) na jedné straně a smyčka mezi α -helixem H1 a β -vlákem B2 a α -helix H3 na protější straně (Nogales *et al.*, 1999).

Polymerizace

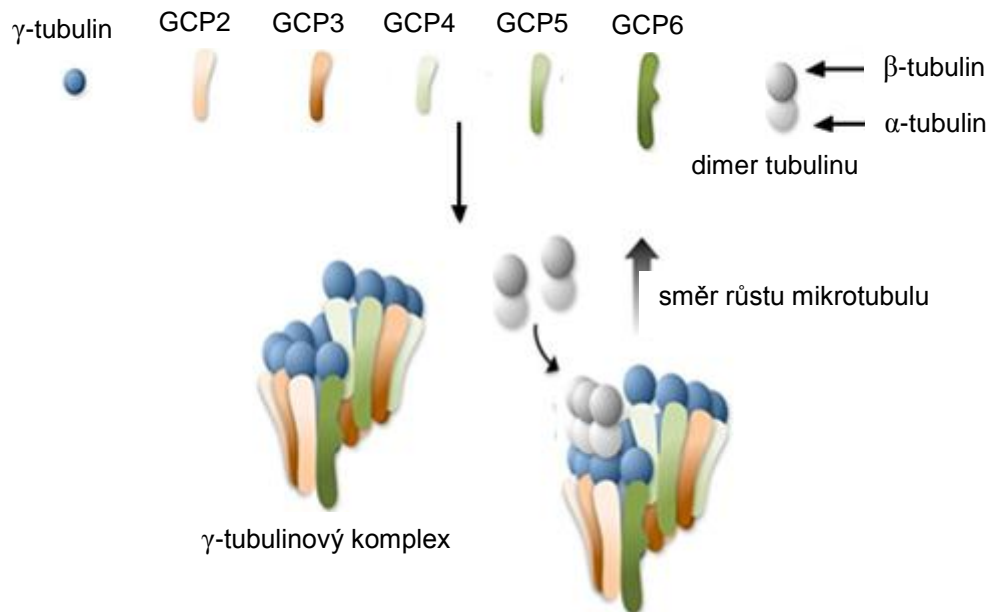
Nově syntetizované molekuly α -tubulinu a β -tubulinu se váží na cytoplazmatický chaperonin označovaný jako CCT (Gao *et al.*, 1992; Llorca *et al.*, 1999). Zde dochází k jejich částečnému složení do funkčních tvarů a poté interagují s pěti specifickými chaperony označovanými jako kofaktory A–E. Tyto kofaktory napomáhají vytvoření vazebné interakce mezi α -tubulinem a β -tubulinem a po hydrolýze GTP na β -tubulinu dojde k oddisociování kofaktorů a uvolnění tubulinového dimeru. GDP je poté nahrazen GTP (Lewis *et al.*, 1997; Tian *et al.*, 1997).

Nukleace (vznik zárodku nového vlákna) mikrotubulů

V *in vivo* podmínkách nedochází k nukleaci, tedy ke vzniku zárodku nového vlákna mikrotubulů samovolně (tubulinové dimery nedokážou vytvořit první prstenec mikrotubulu, mohou se připojovat až na již existující prstenec), ale je pro tento děj zapotřebí γ -tubulinový komplex (Obr. 3) tvořený γ -tubulinem a dalšími proteiny: GCP2 (γ -tubulin complex protein 2), GCP3, GCP4, GCP5, GCP6 (Wiese a Zheng, 2006). U některých organismů mohou některé z těchto proteinů chybět a komplex přesto vykazuje nukleační aktivitu, u *Arabidopsis thaliana* je však nutná přítomnost všech vyjmenovaných proteinů (Jaspersen a Winey, 2004; Murata *et al.*, 2007). Kromě nich se zde uplatňuje také další protein NEDD1 zajišťující lokalizaci γ -tubulinového komplexu do nukleačních míst (Lüders *et al.*, 2006).

γ -tubulinový komplex

Kromě α -tubulinu a β -tubulinu se mezi tubulinové proteiny řadí také γ -tubulin, který se nezabudovává do mikrotubulového válce, ale nachází se v místech, kde dochází k tvorbě nových mikrotubulů (mikrotubulová organizační centra) a jeho výskyt byl potvrzen u všech eukaryot (Job *et al.*, 2003). U *Arabidopsis thaliana* byly objeveny dva geny (*TubG1* a *TubG2*) kódující dva γ -tubuliny (γ 1-tubulin a γ 2-tubulin) mající aminokyselinovou sekvenci shodnou z 98 %, s α -tubulinem a β -tubulinem z 30 % (Oakley, 1992; Liu *et al.*, 1994).



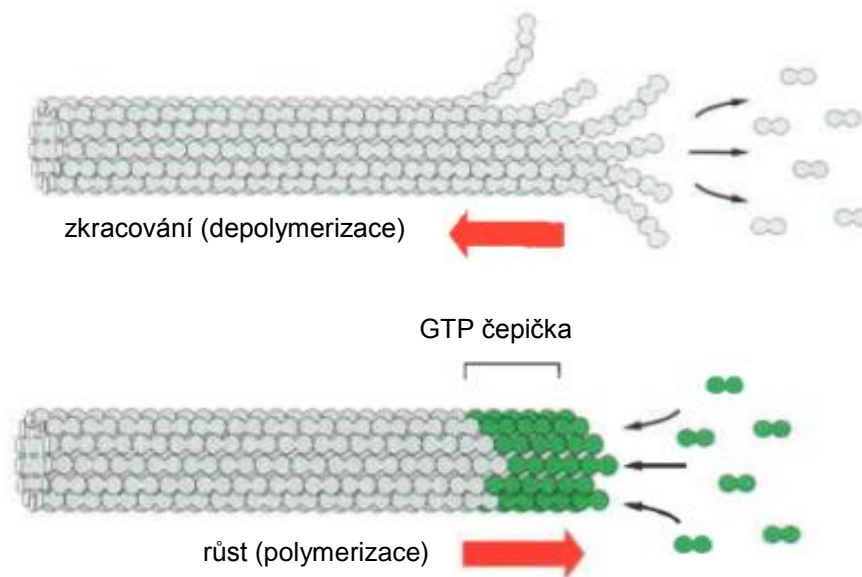
Obr. 3: Model γ -tubulinového komplexu skládajícího se z γ -tubulinu a dalších proteinů (GCP2–GCP6) se znázorněným připojováním dimeru α -tubulinu a β -tubulinu ke komplexu. Upraveno dle Teixidó-Travesa *et al.*, 2012.

Některé další proteiny γ -tubulinového komplexu umožňují připojení komplexu ke straně existujícího mikrotubulu pod správným úhlem (Nakamura a Hashimoto, 2009; Kong *et al.*, 2010).

Komplex má prstencový tvar a slouží jako předloha pro výstavbu mikrotubulů (Zheng *et al.*, 1995). Každý prstenek je po okraji lemován proteiny γ -tubulinu, na které se napojuje α -tubulin při výstavbě mikrotubulu, takže se z jednoho prstence tvoří vždy jeden mikrotubul připojený ke γ -tubulinu svým minus-koncem. K počátečnímu kruhu, který obsahuje 13 tubulinových dimerů se postupně napojují další tubulinové dimery k plus-konci, až se vytvoří struktura dutého mikrotubulu (Alberts *et al.*, 2001).

Dynamická nestabilita

Jako dynamická nestabilita je označována polymerizace mikrotubulů rychle se střídající s jejich depolymerizací (Obr. 4). Hydrolýza GTP vázaného na β -tubulin probíhá snadněji po zabudování tubulinu do mikrotubulu než na volném tubulinu. Proto krátce po zabudování tubulinu do mikrotubulu dochází k hydrolýze GTP. Tělo mikrotubulů skládající se z GDP-tubulinových jednotek je ale nestabilní, jeho stabilizaci zajišťuje čepička z GTP-tubulinu. Ztráta této čepičky vede k depolymerizaci (Mitchison a Kirschner, 1984).



Obr. 4: Znárodnění růstu (polymerizace) a zkracování (depolymerizace) mikrotubulů. Upraveno dle Alberts *et al.*, 2008.

Při polymerizaci se tubulinové dimery napojují na existující mikrotubul. Pouze dimery s navázaným GTP mohou polymerizovat (Mitchison a Kirschner, 1984). Pokud je jejich připojování rychlejší, než hydrolyza GTP na GDP, jsou konce mikrotubulů kryty GTP-čepičkou (β -tubuliny s navázaným GTP). Vazby mezi tubulinovými jednotkami jsou silnější, pokud je na β -tubulinu navázán GTP. Pokud je připojování nových dimerů rychlejší než hydrolyza GTP, mikrotubulus roste. Avšak v případě, že rychlost hydrolyzy GTP na GDP překročí rychlost vázání nových jednotek, v důsledku oslabení vazeb mezi těmito jednotkami, dojde k jejich uvolňování a tento proces se označuje jako depolymerizace mikrotubulů a vede k jejich zkracování. GDP vázaný na uvolněných β -tubulinových podjednotkách se poté vymění za GTP a slouží jako zásoba jednotek pro výstavbu dalších mikrotubulů. Tato dynamika mikrotubulů se projevuje jejich neustálým nárůstem a zkracováním (Alberts *et al.*, 2001). Při dostatečné koncentraci tubulinu s GTP, bude čepička přítomna a mikrotubuly se budou nacházet v růstové fázi. Při vymizení monomerů, dojde k vymizení čepičky (Mitchison a Kirschner, 1984).

Hydrolyza GTP vázaného v mikrotubulech ovlivňuje strukturu protofilament. Jednotky s navázaným GTP zajišťují rovnou konformaci protofilament nutnou k vytvoření mikrotubulu. Hydrolyza GTP na GDP je spojena se zakřivením protofilament, která nemohou vytvářet mikrotubuly (Melki *et al.*, 1989). Rovná konformace je pravděpodobně zajištěna postranními kontakty mezi protofilamety, které

se po hydrolyze GTP oslabují a tím dochází k zakřivení tvaru jednotlivých mikrofilament a toto zakřivení je pozorovatelné u konců mikrotubulů, které se zkracují (depolymerizují) (Obr. 4; Jánosi *et al.*, 1998).

Kromě dynamické nestability je u mikrotubulů znám ještě další jev, při kterém dochází k připojování tubulinových dimerů k plus-konci a zároveň k odpojování dimerů z minus-konce. Tímto je zajištěno posouvání mikrotubulů, aniž by došlo ke změně jejich délky (Alberts *et al.*, 2008).

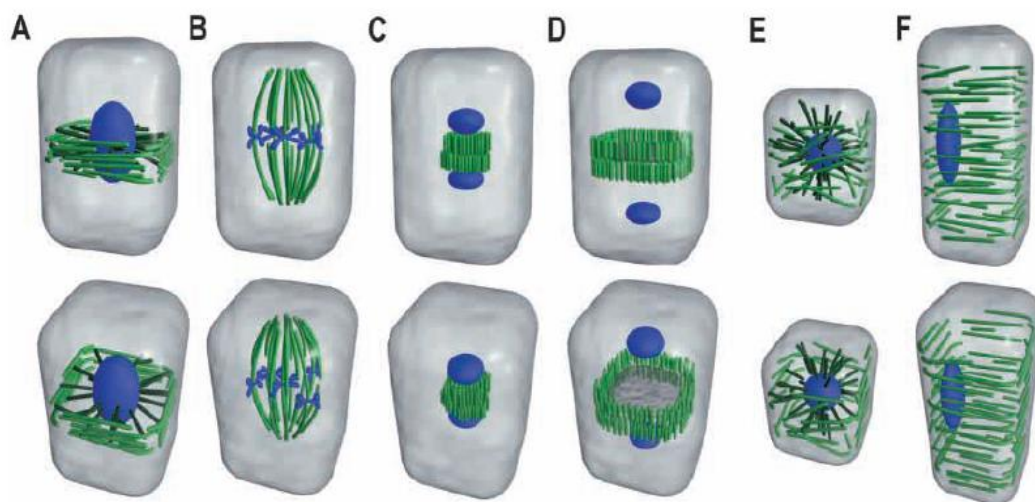
2.1.1.2 Uspořádání mikrotubulů v buňce v různých fázích buněčného cyklu

Celkové uspořádání i funkce mikrotubulů v buňce se mění v průběhu buněčného cyklu, rozlišujeme kortikální a endoplazmatické mikrotubuly, preprofázní prstenec, mikrotubuly tvořící dělicí vřeténko a fragmoplast (Obr. 5; Wasteneys, 2002).

Kortikální mikrotubuly

V interfázi jsou mikrotubuly organizovány pod cytoplazmatickou membránou a označují se jako kortikální mikrotubuly (Fishel a Dixit, 2013). Uspořádání v buňce je závislé na jejím umístění v těle rostliny, tak například kortikální mikrotubuly v prodlužujících se buňkách hypokotylu a kořene jsou seřazeny příčně pod sebe. Naopak u buněk, kde došlo ke zpomalení prodlužování, jsou mikrotubuly seřazeny podélně vedle sebe (Buschmann a Lloyd, 2008; Wasteneys a Ambrose, 2009). Kortikální mikrotubuly určují tvar buňky a řídí směr transportu materiálu pro výstavbu buněčné stěny (Lloyd, 2011).

Bylo zjištěno, že γ -tubulinový komplex je rozptýlen pod cytoplazmatickou membránou, kde je napojen na postranní stěny existujících kortikálních mikrotubulů a právě z těchto bodů se vytvářejí nové mikrotubuly prodlužující se nejčastěji pod ostrým úhlem 40° ($20\text{--}60^\circ$) od existujícího mikrotubulu (Chan *et al.*, 2009; Murata a Hasebe, 2007). Méně často se prodlužují paralelně s existujícím mikrotubulem (úhel 0°) (Chan *et al.*, 2009; Nakamura *et al.*, 2010). V případě prodlužování pod ostrým úhlem je γ -tubulinový komplex vázán slaběji než v případě paralelního prodlužování (Fishel a Dixit, 2013).



Obr. 5: Schematická ilustrace znázorňující uspořádání mikrotubulů v různých fázích buněčného cyklu. Preprofázní prstenec s vyznačeným připojením k jádru mikrotubuly a aktinovými filamenti (A), dělicí vřeténko (B), fragmoplast (C), fragmoplast v pozdější fázi cytokineze (D), endoplazmatické mikrotubuly (E), kortikální mikrotubuly (F). Převzato z Wasteneys, 2002

Prodlužování pod ostrým úhlem vede ke změně organizace kortikálních mikrotubulů, kdežto paralelní prodlužování zachovává a podporuje stávající uspořádání (Wasteneys a Ambrose, 2009). V obou případech dochází k prodlužování ve směru k plus-konci původního již existujícího mikrotubulu (Chan *et al.*, 2009). Nové kortikální mikrotubuly mohou vznikat také bez přítomnosti již existujících mikrotubulů pravděpodobně na základě náhodné aktivace γ -tubulinové komplexu (*de novo* nukleace). Takto vzniká pouze asi 1–2 % všech mikrotubulů (Chan *et al.*, 2009; Nakamura *et al.*, 2010; Shaw *et al.*, 2003).

Z nukleačních míst jsou mikrotubuly asi po 60 s uvolněny (Nakamura *et al.*, 2010). Ambrose a Wasteneys (2009) pozorovali lokalizaci nukleačních komplexů na okrajích nově vytvořených buněk kořenů *Arabidopsis thaliana* a proto je možné, že tato centra doplňují nové mikrotubuly po rozdělení buněk. Dále je možné, že mikrotubuly vyrůstající z jaderné membrány mohou být pod plazmatickou membránu transportovány a vytvářejí zde kortikální mikrotubuly (Cyr a Palevitz, 1995).

Endoplazmatické mikrotubuly

Endoplazmatické mikrotubuly se prodlužují od jaderné membrány k plazmatické membráně přes cytoplazmu. Vznik tohoto uspořádání závisí na typu buňky i organismu, u některých organismů je přítomné po celou dobu trvání interfáze, ale u jiných se místo něj vytváří kortikální uspořádání (Murata a Hasebe, 2011). Díky tomu,

že endoplazmatické mikrotubuly spojují jadernou membránu s plazmatickou membránou, se pravděpodobně podílejí na detekci změn ve vnitřním i vnějším prostředí a předávají tyto informace jádru (Baluška *et al.*, 1997).

Nukleační místa pro endoplazmatické mikrotubuly se nacházejí na povrchu jaderné membrány a jejich tvorba probíhá nejspíše *de novo* za přítomnosti γ -tubulinových komplexů (Erhardt *et al.*, 2002; Stoppin *et al.*, 1994).

Preprofázní prstenec

V G2 fázi vzniká pod plazmatickou membránou preprofázní prstenec v místě, kde se později při cytokinezi vytvoří buněčná deska rozdělující mateřskou buňku na dvě dceřiné. Prstenec tak rozhoduje, ve kterém místě se buňka rozdělí. Preprofázní prstenec je připojen k jádru pomocí mikrotubulů a aktinových filament. Před začátkem mitózy preprofázní prstenec mizí (Wasteney, 2002).

Mikrotubuly preprofázního prstence vznikají pravděpodobně z γ -tubulinových komplexů lokalizovaných na existujících mikrotubulech nebo *de novo* (Liu *et al.*, 1993; Murata a Wada, 1991)

Dělicí vřeténko

V průběhu G2 fáze dojde ke zvýšení intenzity tvorby endoplazmatických mikrotubulů, které se později shromažďují u protilehlých pólů buňky a vytvářejí dělicí vřeténko umožňující rozestup chromozomů v metafázi (Smirnova a Bajer, 1998).

Při mitóze se mikrotubuly sdružují svými minus-konci na protilehlých buněčných pólech a plus-konce se paprscitě prodlužují směrem k centru buňky, kde interagují s kinetochory, což jsou proteinové komplexy nacházející se v oblasti centromery chromozomů. Na rozdělení chromozomů v anafázi na jednotlivé chromatidy a jejich shromáždění na opačných pólech buňky se podílejí molekulární motory kineziny a dyneiny, které se pohybují po mikrotubulech, dále depolymerizace mikrotubulů na plus-konci a protahování buňky spojené s oddalováním obou dělicích vřetének od sebe (Alberts *et al.*, 2008).

Fragmoplast

Při cytokinezi se mikrotubuly organizují podélně vedle sebe do dvou prstenců nacházejících se mezi novými dceřinými jádry. Mikrotubuly se zde účastní transportu váčků obsahujících molekuly pro výstavbu nové buněčné stěny (Jürgens, 2005). V průběhu cytokineze se prstence původně lokalizované v centru buňky rozšiřují směrem k cytoplazmatické membráně (Wasteney, 2002).

2.1.2 Aktinová filamenta

Aktinová filamenta jsou vlákna o průměru asi 7 nm, pružnější a kratší než mikrotubuly. Jedinou stavební jednotkou jsou kruhové molekuly aktinu, které se na sebe napojují a vytvářejí vlákna. Aktinová filamenta jsou tvořena dvěma těmito vlákny obtočenými kolem sebe do šroubovice. Některé vlastnosti jsou podobné jako u mikrotubulů, například dynamická nestabilita, rozlišení vlákna na plus-konec a minus-konec, polymerizace také probíhá podobným mechanismem, neuplatňuje se zde ale hydrolyza GTP, nýbrž ATP. Aktinových vláken je v buňce více než mikrotubulů a nacházejí se v celé cytoplazmě, ale především těsně pod plazmatickou membránou. Zajišťují pevnost a mechanickou odolnost (Alberts *et al.*, 2001).

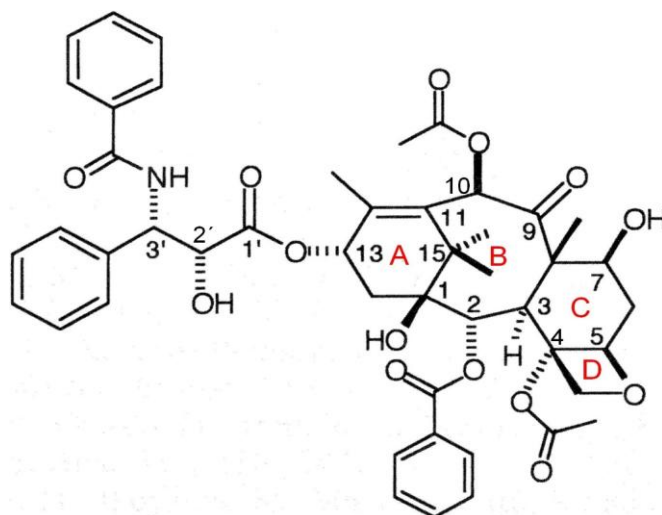
U *Arabidopsis thaliana* bylo nalezeno 8 isovariant aktinu (Laval *et al.*, 2002). Mutant *der1* (deformované kořenové vlásky), který vytváří nefunkční aktin2 vykazuje narušení vývoje kořenových vlásků a iniciace jejich tvorby. Existují tři alely genu kódujícího aktin2: *der1-1* mutant vykazuje rozšířenou spodní polovinu vlásků, kdežto horní polovina se vyvíjí normálně, *der1-2* tvoří krátké kořenové vlásky a *der1-3* tvoří kratší vlásky s rozšířenou základnou. Aktin2 představuje největší část aktinových isovariant (Ringli *et al.*, 2002).

2.2 TAXOL

Taxol (paclitaxel) patří mezi diterpenoidní taxany (alkaloidy nacházející se v rostlinách rodu *Taxus*). Taxol byl izolován z kůry tisu tichomořského (*Taxus brevifolia*) na konci 50. let 20. století v rámci hodnocení a zkoumání rostlinných extraktů pro posouzení jejich vhodnosti k léčbě nádorů organizací National Cancer Institute (Wani *et al.*, 1971; Guénard *et al.*, 1993).

2.2.1 Struktura

Strukturu taxolu (Obr. 6) je možno rozdělit na hlavní kostru a postranní řetězec. Kostru taxolu tvoří čtyři kruhy (ABCD): šestiuhlíkatý s dvojnou vazbou, osmiuhlíkatý, šestiuhlíkatý a oxetanový kruh. Taxol obsahuje množství funkčních skupin: tři hydroxylové skupiny, benzoylovou skupinu, dvě karbonylové skupiny a dvě acetátové skupiny, čtyři methylové skupiny, fenylovou skupinu a benzamidovou skupinu. Postranní řetězec je k hlavní kostře připojen esterovou vazbou (Ghosh a Sarkar, 1994).



Obr. 6: Strukturální vzorec taxolu. Upraveno dle Gupta *et al.*, 2003.

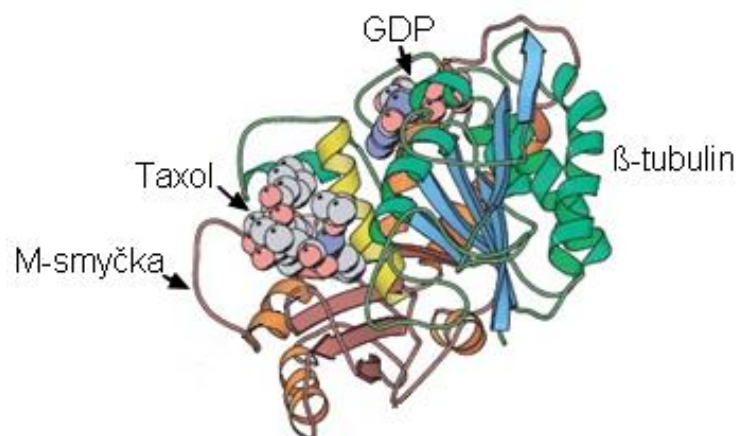
2.2.2 Účinky taxolu na rostliny

2.2.2.1 Mechanismy působení taxolu

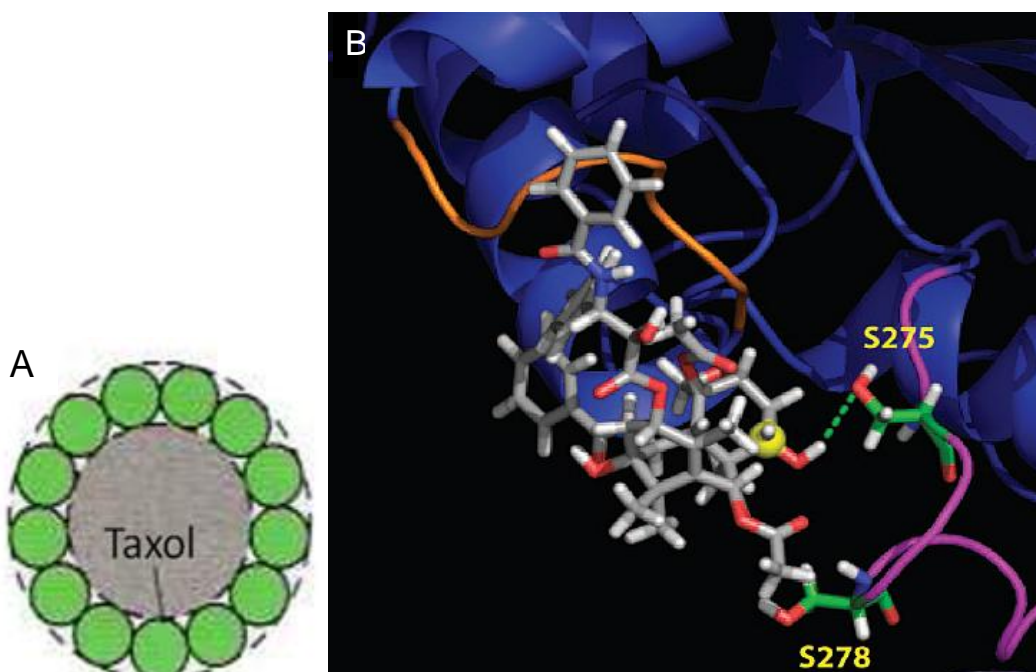
Taxol je mitotický jed, váže se na mikrotubuly, kde je jeho vazebné místo na β -tubulinové jednotce (Obr. 7) dimeru (Freedman *et al.*, 2009). Způsobuje zastavení mitózy a buněčnou smrt (Xiao *et al.*, 2006).

Nepředpokládá se, že se molekula taxolu dostává k vazebnému místu na β -tubulinu otevřenými konci mikrotubulů, ale prochází přímo stěnou mikrotubulů. Vazebné místo je lokalizováno na vnitřní straně mikrotubulu (Obr. 8A). Taxol pravděpodobně difunduje k vazebnému místu přes nanopóry ve stěně mikrotubulů a v průběhu této cesty se přechodně váže na určité místo v nanopórech (Obr. 8B), z něhož poté přechází přímo ke svému vazebnému místu. Při transportu taxolu k vazebnému místu na β -tubulinu se jako stabilizační prvek uplatňují vodíkové vazby (zapojuje se OH skupina na C7 taxolu). Bylo zjištěno, že na tvorbě těchto vodíkových vazeb se u některých β -tubulinových isoformech podílí serin 275 na M-smyčce (Obr. 8B), kdežto u jiných isoformech je to alanin (Freedman *et al.*, 2009).

Při zkracování mikrotubulů, které je důležité pro správný průběh procesů v buňce, nastává depolymerizace dimeru na α -tubulin a β -tubulin (Mitchison a Kirschner, 1984). Pokud se ale taxol naváže na β -tubulin, stabilizuje dimer a zabraňuje jeho depolymerizaci (Jordan *et al.*, 1996).



Obr. 7: Struktura β -tubulinu s navázaným taxolem. Upraveno dle Löwe a Amos, 1999.



Obr. 8A: Znázornění vazebného místa taxolu na vnitřní straně mikrotubulu, průřez vláknem mikrotubulu, zeleně jsou znázorněna jednotlivá mikrofilamenta. Upraveno dle Alberts *et al.*, 2001; Löwe a Amos, 1999.

Obr. 8B: Přechodné vazebné místo taxolu při cestě nanopóry, znázorněny jsou stabilizační vazby mezi OH skupinou na C7 taxolu a serinem 275 na M-smyčce (růžové zbarvení) mikrotubulu a také mezi serinem 278 na mikrotubulu a acetylovou skupinou na C10 taxolu. Molekula taxolu je znázorněna šedou barvou. Upraveno dle Freedman *et al.*, 2009.

Tato stabilizace je nejspíš způsobena zvýšením síly spojení mezi sousedními protofilamenty v mikrotubulech. Taxol interaguje s M-smyčkou přítomnou na β -tubulinu a tím ji udržuje v poloze zajišťující posílení spoje mezi sousedními protofilamenty i mezi sousedními dimery v podélném směru (Xiao *et al.*, 2006).

Taxol snižuje počet protofilament tvořících válec mikrotubulu z 13 na 12. To naznačuje, že vazba taxolu zmenšuje vzdálenost mezi M-smyčkou a smyčkou mezi α -helixem H1 a β -vlákem B2 a snižuje úhly mezi dimery v sousedních protofilamentech z $152,3^\circ$ na 150° (Andreu *et al.*, 1994).

2.2.2.2 Vliv taxolu na organizaci mikrotubulů

Baskin *et al.* (1994) pozorovali vliv taxolu na 6 dnů staré rostliny *Arabidopsis thaliana*. Taxol v koncentraci $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ vyvolává (po 12 h, 24 h i 48 h působení) zvýšení hustoty kortikálních mikrotubulů v kořenových buňkách. Jejich příčné uspořádání zůstává zachováno v buňkách primární kůry (cortex) a pokožky (rhizodermis). V buňkách středového válce dochází k výraznějším poruchám organizace kortikálních mikrotubulů (změna příčného uložení v podélné). V buňkách rhizodermis dochází ke spojování mikrotubulů do svazků, ale pouze v dělicí zóně kořene.

Taxol v koncentraci $30 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ působící na buňky kořenů kukuřice (*Zea mays*) po dobu 24 h vyvolává v těchto buňkách zvýšení počtu kortikálních mikrotubulů a jejich spojování do svazků. Původní příčná orientace kortikálních mikrotubulů je také porušena (Baluška *et al.*, 1997).

Taxol také chrání endoplazmatické mikrotubuly před účinkem látek, které způsobují jejich depolymerizaci např. kolchicin a oryzalin (Baluška *et al.*, 1997).

2.2.2.3 Vliv taxolu na velikost jádra a strukturu chromatinu

Po 6 h působení taxolu o koncentraci $30 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ na buňky kořenů kukuřice (*Zea mays*) v interfázi u apikálního meristému v kořenové špičce dochází ke zmenšení jádra i ke zvýšení kondenzace jaderného chromatinu. Po 24 h působení taxolu o stejné koncentraci bylo ale u těchto buněk pozorováno zvětšení velikosti jádra a snížení kondenzace chromatinu. Taxol u buněk primární kůry a rhizodermis způsobuje inhibici mitotického dělení. Ale u buněk endodermis a středového válce zůstává schopnost mitotického dělení zachována, také u nich dochází ke zmenšení jádra a zvýšení kondenzace chromatinu a to i po delším působení taxolu (i po 24 h). Zvýšení kondenzace chromatinu je pravděpodobně odpovědné za sníženou genovou expresi a následně i za zmenšení velikosti buněk. Buňky kořenů kukuřice, které byly vystaveny vlivu taxolu, vykazovaly skutečně zmenšení svého objemu (Baluška *et al.*, 1997).

Taxol vyvolává tyto změny tím, že působí na endoplazmatické mikrotubuly, které se dotýkají jaderné membrány a vyplňují cytoplazmu až k plazmatické membráně (Baluška *et al.*, 1997).

2.2.2.4 Vliv taxolu na růst kořene

Taxol v koncentraci $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ inhibuje elongaci kořene u kukuřice už po 4 h od aplikace a efekt přetrvává i po 24 h. Dochází také ke zmenšení objemu buněk (Baluška *et al.*, 1997).

Při $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ koncentraci taxol vyvolává rozsáhlé zduření kořene v prodlužovací zóně (u rostlin ovlivňovaných taxolem po dobu dvou dnů), poškození epidermálních buněk kořene a struktury kořenových vlásků (Obr. 9). Taxol v koncentraci $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ způsobuje pouze mírné zduření (Baskin *et al.*, 1994).

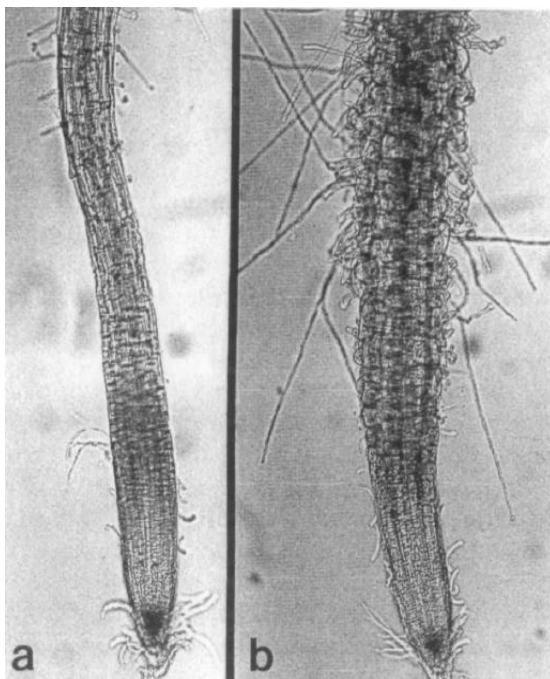
2.2.2.5 Antikarcinogenní účinky taxolu

Rakovinové buňky se vyznačují zrychlením buněčného cyklu, což vyvolává trvalé a nekontrolovatelné dělení buněk a vznik nádoru. Tyto buňky se vymykají regulačním mechanismům organismu. Taxol je v léčbě rakoviny využíván jako chemoterapeutikum pro své stabilizační vlivy na mikrotubuly. Stabilizací dochází k zastavení mitózy a k buněčné smrti. Taxol má uplatnění zejména v léčbě rakoviny prsu, plic, vaječníků a jícnu (Yvon *et al.*, 1999).

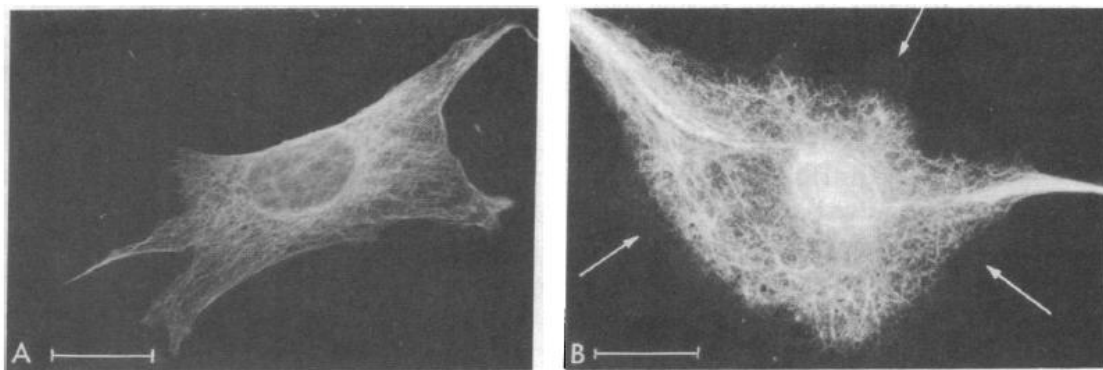
Schiff *et al.* (1979) prozkoumali mechanismy antikarcinogenního působení taxolu na buňkách HeLa (buněčná linie nádorových buněk schopných stálého dělení poprvé izolovaných z nádoru děložního hrdla). Taxol zcela potlačil dělení těchto buněk už v nízké koncentraci $0,25 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, buňky zůstaly v M nebo G₂ fázi buněčného cyklu. Výstavba mikrotubulů byla výrazně urychlena. Taxol v koncentraci $0,25 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ vyvolal u buněk HeLa po 20 h působení také sdružování mikrotubulů do svazků. I přestože se asi 70 % sledovaných buněk po aplikaci taxolu nacházelo v M fázi buněčného cyklu (došlo ke zformování chromozomů a k vymizení jaderné membrány), nebyl u nich vytvořen normální mitotický aparát (Schiff a Horwitz, 1980).

Vlivem taxolu byla také potlačena replikace myších fibroblastů a inhibována jejich migrace (Schiff a Horwitz, 1980). Fibroblasty mají významnou roli při růstu, vývoji a rozšiřování rakovinových buněk, poskytují jim například růstové faktory (Kalluri a Zeisberg, 2006). Taxol v koncentraci $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ i $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ u buněk fibroblastů vyvolal sdružování mikrotubulů do svazků. Buňky ovlivněné taxolem se lišily

od kontrolních buněk také nepřítomností mikrotubulů v oblasti přiléhající k cytoplazmatické membráně (Obr. 10) (Schiff a Horwitz, 1980).



Obr. 9: Kořen *Arabidopsis thaliana* (stáří 8 dnů) po 2denním ovlivňování taxolem v koncentraci $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (a) a $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (b). Fotografie z mikroskopického pozorování při zvětšení 64x. Převzato z Baskin *et al.*, 1994.



Obr. 10: Snímek z nepřímé imunofluorescenční mikroskopie s použitím protilátky proti tubulinu. Kontrolní buňka fibroblastu (A) a buňka fibroblastu po 22 h působení taxolu v koncentraci $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (B). Šipky vyznačují okraj plazmatické membrány. Měřítko $20 \mu\text{m}$. Upraveno dle Schiff a Horwitz, 1980.

2.3 PROTEOMICKÁ ANALÝZA VLIVU TAXOLU

Proteomika je vědní disciplína zabývající se identifikací proteinů přítomných v určité buňce, pletivu, orgánu nebo v celém organismu. Umožňuje nejen identifikaci proteinů ve vzorku, ale také srovnání proteomu (souboru proteinů, které se v buňce nachází) v různých fázích vývoje buňky a organismu, mezi různými buňkami organismu a dále mezi buňkami vystavenými účinkům některých látek (léčiv, drog) a buňkami, které těmto látkám vystaveny nebyly (Westermeier a Naven, 2002). Je také efektivním nástrojem pro identifikaci posttranslačních modifikací proteinů (Černý *et al.*, 2013). Přístupy v proteomické analýze se rozdělují na bezgelové a gelové. Doposud byly publikovány dvě práce o proteomické analýze vlivu taxolu na buňky dermální papily (nachází se uprostřed vlasové pochvy) a HeLa buňky. V obou pracích byl použit gelový přístup a metodický postup skládající se ze čtyř kroků: příprava vzorku, isoelektrická fokusace (separace v prvním rozměru), SDS elektroforéza (separace v druhém rozměru) a detekce, kvantifikace a identifikace proteinů (Rabilloud a Lelong, 2011; Chen *et al.*, 2011).

2.3.1 Příprava vzorku

Ošetření taxolem je prováděno aplikováním taxolu naředěného na požadovanou koncentraci kultivačním médiem na buněčnou kulturu, tkáň nebo organismus. Chen *et al.* (2011) aplikovali taxol ($1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) rozpuštěný v kultivačním médiu na buňky dermální papily (12 hodin). Bull *et al.* (2010) ošetřovali taxolem (koncentrace $5,8 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) HeLa buňky po dobu 24, 48 a 72 hodin.

Pro porovnání je třeba pracovat také s kontrolním materiálem, který nebyl vystaven účinkům taxolu. Expozice je stanovena na určitou dobu v závislosti na biologickém materiálu.

K extrakci proteinů mohou být použity různé postupy. Např. k buňkám dermální papily byl přidán pufr o složení: močovina ($7 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), thiomočovina ($2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), 4% (w/v) CHAPS, 0,5% (v/v) IPG pufr pH 3–10, poté následovala homogenizace sonikačním homogenizátorem a centrifugace při odstředivém zrychlení 15000 g po dobu 10 minut pro oddělení peletu (Chen *et al.*, 2011).

Druhá studie uvádí extrakci proteinů pufrém o složení: Tris-HCl ($25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), KCl ($50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), EDTA ($3 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), 1% (v/v) Triton X-100, β -merkaptoethanol ($5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), pH = 7,1, inhibitory proteas (benzamidin ($3 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), leupeptin

(10 mmol·l⁻¹) a PMSF (1 mmol·l⁻¹) a fosfatas (NaF (30 mmol·l⁻¹), Na₃VO₄ (1 mmol·l⁻¹) a Na₄P₂O₇ (20 mmol·l⁻¹)). Následovala mechanická homogenizace, centrifugace při odstředivém zrychlení 16 000 g po dobu 10 minut a při 4 °C. Koncentrace proteinů v supernatantu po oddělení peletu byla měřena spektrofotometricky (Bull *et al.*, 2010).

Při přípravě vzorku je třeba dbát na to, aby nedošlo ke změně náboje proteinů, proto se pro extrakci, denaturaci a rozpuštění proteinů používají nenabitě chaotropní látky narušující trojrozměrnou strukturu proteinů (např. močovina nebo thiomočovina) a nenabitě detergenty sloužící k rozpuštění lipidů (např. CHAPS). Dále je třeba přidat inhibitory proteas a redukční činidla zabráňující vytvoření disulfidových vazeb (např. DTT, β-merkaptoethanol) (Rabilloud a Lelong, 2011).

2.3.2 Separace proteinů

Pro separaci proteinů se využívá dvourozměrná (2D) elektroforéza. Separaci v prvním rozměru zajišťuje metoda izoelektrické fokusace, při které jsou proteiny děleny na základě rozdílného izoelektrického bodu. Fokusace probíhá na gelových prouzcích s pH gradientem, na které se nanáší vzorky. Pohyb proteinu prouzcem se zastaví v zóně, kde pH odpovídá izoelektrickému bodu (Westermeier a Naven, 2002).

Gelové proužky (stripy) se před nanáškou vzorků inkubují ve stejném pufru, ve kterém jsou rozpuštěny proteiny (tzv. rehydratační pufr) (Rabilloud a Lelong, 2011). Elektrické napětí je při zahájení fokusace nižší, a poté se zvyšuje, např. 50 V po dobu 12 hodin, 500 V po 1 hodinu, 1000 V po 1 hodinu a poté při 8000 V (Chen *et al.*, 2011). Nebo při 200 V po dobu 40 minut, 450 V po 40 minut, 750 V po 30 minut a 2000 V po 70 minut. Po tomto kroku jsou stripy přeneseny do ekvilibračních roztoků (Bull *et al.*, 2010).

SDS-PAGE elektroforéza se využívá pro separaci proteinů ve druhém rozměru na základě jejich rozdílné molekulové hmotnosti. Stripy se upevní na vrchní část polyakrylamidového gelu a elektroforéza probíhá např. 6 hodin při 20 mA/gel (Chen *et al.*, 2011).

2.3.3 Detekce, kvantifikace a identifikace proteinů

Detekce proteinů na polyakrylamidovém gelu se provádí několika způsoby: barvení gelu barvivem Coomassie Brilliant Blue, barvení stříbrem anebo fluorescenční detekce (Rabilloud a Lelong, 2011). Srovnává se intenzita detekovaných skvrn proteinů ze vzorku ovlivněného taxolem a z kontrolního vzorku. Skvrny proteinů, u kterých je

rozdíl významný, se z gelu vyříznou a rozloží se proteolytickými enzymy (např. trypsinem) a vzniklé peptidy jsou poté analyzovány hmotnostní spektrometrií, nejčastěji MALDI-TOF. Získají se tak molekulové hmotnosti peptidů a s využitím databází lze poté identifikovat jednotlivé peptidy (Westermeier a Naven, 2002).

Metoda MALDI-TOF je založena na smíchání vzorku s matricí (malé organické kyseliny) a nanesení směsi na kovovou destičku, která se umístí do hmotnostního spektrometru, kde na ni působí laserový paprsek vyvolávající sublimaci matrice společně se vzorkem. Molekuly vzorku se přitom ionizují a jsou poté urychleny v elektrickém poli. V TOF analyzátoru jsou ionty rozděleny podle poměru jejich hmotnosti a náboje na základě rozdílné doby letu analyzátozem (Cobo, 2013).

2.3.4 Příklady výsledků gelové proteomické analýzy

Chen *et al.* (2011) studovali vliv taxolu na proteom v buňkách dermální papily. V této studii bylo detekováno asi 972 skvrn proteinů a celkem u 11 proteinů byla potvrzena snížená nebo zvýšená tvorba v porovnání s kontrolním vzorkem. Šlo o proteiny účastnící se vezikulárního transportu a skládání proteinů (např. Rab-3b), metabolismu (např. enolasa, fosfoglycerátmutasa 1), detoxikace (karbonyl reduktasa) a procesů regulovaných Ca^{2+} ionty (annexin A2).

Při studiu vlivu taxolu na buňky HeLa byly zjištěny významné rozdíly abundance mezi kontrolními a taxolem ošetřenými vzorky u 87 proteinů. Podle doby, kdy u nich došlo ke změně abundance (0, 24, 48 a 72 h po aplikaci taxolu) byly proteiny rozděleny do čtyř kategorií: proteiny zapojené v zadržení buněk v mitotické fázi (např. annexin, calumenin, aktin, 60 kDa heat shock protein, stathmin), proteiny zapojené v procesech odehrávajících se mezi zadržením mitózy a apoptózou (např. lamin a vigilin), proteiny účastnící se apoptózy (např. 40S ribosomální protein SA, 60 kDa heat shock protein, elongační faktor 1 a miosin-9) a pozdní apoptózy (např. aktin a elongační faktor 1) (Bull *et al.*, 2010).

2.4 CHARAKTERIZACE PROTEINU BECLIN 1 U ROSTLIN

Beclin 1 (také označován jako ATG6) se účastní imunitní reakce rostlin na infekci vyvolanou patogenem a autofagie. Bylo zjištěno, že během infekce je zvýšen přepis genu pro Beclin 1 do mRNA (Patel a Dinesh-Kumar, 2008). Infekce vyvolaná patogenem vede u rostlin k hypersenzitivní reakci, jejímž cílem je programovaná buněčná smrt pouze napadených buněk s cílem zabránění šíření patogenu

(Greenberg, 1997). Beclin 1 zajišťuje, aby hypersenzitivní reakce byla soustředěna pouze na napadené buňky a nezasahovala i zdravé buňky v okolí místa infekce (Liu *et al.*, 2005). Rostliny *Arabidopsis thaliana* se sníženou expresí genu pro Beclin 1 vykazovaly předčasnou senescenci, zvýšenou citlivost na nedostatek živin, zakrněný růst a fenotypové abnormality (Patel a Dinesh-Kumar, 2008). Beclin 1 je také nezbytný pro klíčení pylového zrna (Fujiki *et al.*, 2007).

2.5 CHARAKTERIZACE PROTEINU SEC14p U ROSTLIN

Protein Sec14p-like phosphatidylinositol transfer family protein (At1g74170; v této práci uváděn jako Sec14p) patří do skupiny proteinů Sec14, které byly poprvé izolovány z kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (Curwin *et al.*, 2009). U rostlin byly objeveny proteiny podobné Sec14, které patří mezi přenašeče fosfolipidů, účastní se metabolismu fosfolipidů a podílí se na přenosu fosfatidylinositolu mezi buněčnými organelami ohraničenými buněčnou membránou (Bankaitis *et al.*, 2010). Proteiny ze skupiny Sec14 jsou nezbytné pro biosyntézu fosfatidylinositolu a tvorbu sekrečních váčků z Golgiho komplexu. Účastní se i transportu fosfatidylcholinu (Curwin *et al.*, 2009).

2.6 CHARAKTERIZACE PROTEINU PROFILIN U ROSTLIN

Profilin patří mezi proteiny, které se váží na aktin a ovlivňují aktinová filamenta (Wang *et al.*, 2009) Především aktivuje aktin tím, že umožní výměnu ADP za ATP, takže se podílí na polymerizaci aktinových cytoskeletálních vláken (Ahern-Djamali *et al.*, 1999). U *Arabidopsis* existuje 5 profilinových isoform a není zřejmé, zda se liší svými funkcemi. Profilin1, profilin2 a profilin3 se nachází převážně ve vegetativních orgánech *Arabidopsis*, kdežto profilin4 a profilin5 jsou pylově specifické (Kandasamy *et al.*, 2002). Molekulová hmotnost profilinu je 12–15 kDa (Wang *et al.*, 2009).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 MATERIÁL

3.1.1 Biologický materiál

- rostliny *Arabidopsis thaliana* ekotyp Columbia (Col-0)
- rostliny *Arabidopsis thaliana* nesoucí GFP fuzní konstrukt s Beclin 1 (At3g61710) a Sec14p (At1g55690) pod nativním promotorem (Křenek *et al.*, nepublikováno)
- rostliny *Arabidopsis thaliana* nesoucí GFP fuzní konstrukt 35S-MAP4-GFP, jako markr pro detekci mikrotubulů (Marc *et al.*, 1998)
- mutant *Arabidopsis der1-3* (Ringli *et al.*, 2002)

3.1.2 Chemikálie

- 2-propanol, Sigma Aldrich
- 4x Laemmli Sample Buffer, Bio-Rad
- aceton, Sigma Aldrich
- akrylamid, Sigma Aldrich
- Complete (EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets), Roche
- Coomassie Brilliant Blue G250, Serva
- činidlo Bradfordové, Sigma Aldrich
- dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma Aldrich
- dithiothreitol (DTT), Sigma Aldrich
- dodecylsírán sodný (SDS), Sigma Aldrich
- ECL Clarity Western Substrate, Bio-Rad
- ethanol 96%, lihovar Kojetín
- glycerol, Sigma Aldrich
- glycin, Sigma Aldrich
- hovězí sérový albumin (BSA), Sigma Aldrich
- hydroxid draselný (KOH), Sigma Aldrich
- hydroxid sodný (NaOH), Sigma Aldrich
- CHAPS, Sigma Aldrich
- chlorid draselný (KCl), Sigma Aldrich
- chlorid sodný (NaCl), Sigma Aldrich

- imerzní olej, Zeiss
- kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA), Sigma Aldrich
- kyselina fosforečná (H_3PO_4), Sigma Aldrich
- kyselina chlorovodíková (HCl), Sigma Aldrich
- kyselina octová (CH_3COOH), Sigma Aldrich
- methanol, Sigma Aldrich
- močovina, Sigma Aldrich
- MS (Murashige a Skoog) medium, Duchefa Biochemie
- odtučněné mléko, Laktino
- persíran amonný ($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, APS), Sigma Aldrich
- phytigel, Sigma Aldrich
- Ponceau S, Sigma Aldrich
- Precision Plus Protein Dual Color Standards, Bio-Rad
- primární protilátka mouse anti-aktin, Sigma Aldrich (kat. č. A0480)
- primární protilátka mouse anti-alfa tubulin (DM1A), Abcam (kat. č. ab7291)
- primární protilátka mouse anti-beta tubulin (TUB2,1), Sigma Aldrich (kat. č. T5201)
- primární protilátka mouse anti-profilin, Sigma Aldrich (kat. č. P8498)
- sacharosa, Sigma Aldrich
- sekundární protilátka rabbit anti-mouse IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology (kat. č. 036SC-358914)
- síran amonný ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), Sigma Aldrich
- taxol, Sigma Aldrich
- TEMED, Sigma Aldrich
- thiomčovina, Sigma Aldrich
- Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethan), Sigma Aldrich
- Tris-HCl (tris(hydroxymethyl)aminomethan hydrochlorid), Sigma Aldrich
- Triton X-100, Sigma Aldrich
- Tween 20, Sigma Aldrich
- β -merkptoethanol, Sigma Aldrich

3.1.3 Roztoky a média

1/2 MS médium

- sacharosa ($10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$)
- MS ($2,15 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$)
- phytigel ($8 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$)
- pH = 5,8 (úprava pomocí KOH)

12% dělicí gel

- 43,5 % (v/v) H_2O
- 25 % (v/v) Tris-HCl ($1,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), pH = 8,8
- 30 % (v/v) 40% (w/v) akrylamid (37,5:1)
- 1 % (v/v) 10% (w/v) SDS
- 0,05 % (v/v) TEMED
- 0,5 % (v/v) 10% (w/v) APS

4x Laemliho roztok

- $277,8 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl
- 4,4 % (w/v) SDS
- 44,4 % (w/v) glycerol
- 0,02 % bromfenolová modř
- pH = 6,8

4% zaostřovací gel

- 63,6 % (v/v) H_2O
- 25,2 % (v/v) Tris-HCl ($0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), pH = 6,8
- 10 % (v/v) 40% (w/v) akrylamid (37,5:1)
- 1 % (v/v) 10% (w/v) SDS
- 0,125 % (v/v) TEMED
- 0,5 % (v/v) 10% (w/v) APS

Blokovací roztok

- 4% (w/v) BSA v TBS-T
- 4% (w/v) sušené odtučněné mléko v TBS-T

Colloidal Coomassie barvivo (barvení elektroforetického gelu)

- roztok A: 2% (v/v) H_3PO_4 + 10% (w/v) $(\text{NH})_2\text{SO}_4$ v H_2O
- roztok B: 5% (w/v) CBB G50 v H_2O

- roztok C: 8 ml roztoku B + 8 ml roztoku A
- výsledný roztok: 20% (v/v) methanol v roztoku C

Tris-glycin-SDS elektroforetický pufr

- 0,25 mol·l⁻¹ Tris
- 1,92 mol·l⁻¹ glycin
- 1 % (w/v) SDS
- H₂O
- pH = 8,3

Ponceau S

- 0,1% (w/v) Ponceau S v 5% (v/v) kyselině octové

Přenosový pufr (Tris-glycinový)

- 0,25 mol·l⁻¹ Tris
- 1,92 mol·l⁻¹ glycin
- H₂O
- pH = 8,3

TBS 10x

- 0,5 mol·l⁻¹ Tris-HCl
- 1,5 mol·l⁻¹ NaCl
- H₂O
- pH = 7,4

TBS-T

- 9 % (v/v) TBS 10x
- 9 % (v/v) methanol
- 0,09 % (v/v) Tween

Tekuté 1/2 MS médium

- sacharosa (10 g·l⁻¹)
- MS (2,15 g·l⁻¹)
- pH = 5,8 (úprava pomocí KOH)

Tris-HCl pufr, pH 8,3 (30 mmol·l⁻¹)

- 0,3 % (w/v) Tris, úprava pH na 8,3 pomocí HCl
- 0,86 % (w/v) NaCl
- 2 % (v/v) EDTA

3.1.4 Přístroje

- analytické váhy XA110/2X, Radwag (Polsko)
- binokulární mikroskop M165FC, LEICA (Německo)
- centrifuga Scan Speed 1730 MR, Scala Scientific (Nizozemí)
- digestoř, Merci (Česká Republika)
- dokumentační zařízení pro dokumentaci gelů a blotů Chemidoc, Bio-Rad (USA)
- fytotron, WEISS Gallenkamp (Německo)
- konfokální laserový mikroskop s „live“ detekcí a rotačním diskem Cell Observer SD, Zeiss (Německo)
- konfokální laserový skenovací mikroskop ZEISS LSM 710, Zeiss (Německo)
- laboratorní předvážky, BEL (Itálie)
- laminární box, Biohazard (Itálie)
- míchačka elektromagnetická, Boeco (Německo)
- mikrocentrifuga s vortexem, Biosan (Lotyšsko)
- mikrocentrifuga, Bio-Rad (USA)
- mikrovlnná trouba, Hitachi (Japonsko)
- pH metr, Eutech Instruments (Singapur)
- skener Image Scanner III, GE Healthcare (Švédsko)
- spektrofotometr, Beckman Coulter (USA)
- termoblok, Bioer Technology (Čína)
- třepačka výkyvná, Biosan (Lotyšsko)
- třepačka, Hofer Scientific Instruments (San Francisco)
- vortex, Genie (Nizozemí)
- zdroj napětí, Bio-Rad (USA)

3.1.5 Programy a databáze

- Aramemnon (<http://aramemnon.uni-koeln.de/>)
- Blast2GO (<https://www.blast2go.com/>; Conesa a Götz, 2008)
- DAS - Transmembrane Prediction server (<http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/>; Cserző *et al.*, 1997)
- ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>)
- ImageLab (Bio-Rad)
- MS Excel

- MS Powerpoint
- NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)
- TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>)
- TargetP 1.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>)
- UniProt (<http://www.uniprot.org/>)
- Zeiss Zen 2012 Blue a Black software

3.2 METODY

3.2.1 Sterilizace semen

Sterilizace semen byla prováděna v laminárním boxu. Semena *Arabidopsis thaliana* byla v mikrozkuhavce protřepávána s 1 ml 70% ethanolu po dobu 5 min. Po usazení semen na dně zkumavky byl ethanol odpipetován a k semenům byl přidán 1 ml 96% ethanolu a protřepávání probíhalo po dobu 3 min. Po usazení semen a odebrání ethanolu, byl k semenům přidán 1 ml sterilní destilované H₂O, protřepávání 3 min (postup s H₂O byl opakován 5x a při posledním opakování byla semena nabrána špičkou pipety a přenesena rovnoměrně na filtrační papír v Petriho misce). Po uschnutí filtračního papíru byla Petriho miska se semeny uzavřena parafilmem a uschována pro další použití do lednice na 4 °C.

3.2.2 Příprava kultivačního média

Pro kultivaci rostlin *Arabidopsis thaliana* bylo používáno 1/2 MS médium (Murashige a Skoog, 1962). Médium bylo připraveno smícháním 10 g sacharosu, 2,15 g MS (Duchefa) a 1000 ml H₂O, poté bylo upraveno pH na hodnotu 5,8 pomocí KOH (0,1 mol·l⁻¹). Roztok byl rozlit po 250 ml do čtyř skleněných nádob a do každé byly přidány 2 g phytagelu. Médium bylo sterilizováno v autoklávu.

Při experimentech bylo také využíváno tekuté 1/2 MS médium, jehož složení a příprava jsou stejné jako u tuhého 1/2 MS média, ale neobsahuje phytagel, který zajišťuje ztuhnutí média.

3.2.3 Sazení, ovlivňování a homogenizace rostlin

Sazení rostlin bylo prováděno v laminárním boxu. Pro biochemické analýzy byla na povrch 1/2 MS média ve čtvercové Petriho misce (14 cm) přenesena semena *Arabidopsis thaliana* (20 semen) asi 1 cm od horního okraje misky. Misky byly zalepeny parafilmem a uloženy horizontálně na 1–2 dny na 4 °C pro stratifikaci. Poté

byly misky se semeny umístěny (ve vertikální poloze) do fytostronu. Podmínky ve fytostronu byly následující: 22 °C, 71% vlhkost vzduchu, osvětlení 16 h a 8 h tma.

Rostliny byly po 14 dnech od umístění do fytostronu ovlivňovány taxolem. Na rostliny v Petriho miskách bylo aplikováno 10 ml 1/2 tekutého MS média s taxolem rozpuštěným v DMSO. Výsledná koncentrace taxolu v 1/2 tekutém MS médiu byla: 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a 15 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. K rostlinám sloužícím jako kontrola bylo přidáno 10 ml 1/2 tekutého MS média s DMSO tak, že objem přidávaného DMSO v jednotlivých případech byl stejný jako objem přidávaného taxolu rozpuštěného v DMSO. Pro zabránění hypoxie byly Petriho misky s rostlinami umístěny vertikálně na třepačku a ovlivňování taxolem takto probíhalo po 2 h.

Po 2 h byly kořeny rostlin odděleny skalpelem a mechanicky homogenizovány ve třecí misce s použitím tekutého dusíku. Homogenát byl umístěn do mikrozkušavek a uložen na -80 °C.

3.2.4 Extrakce proteinů

Pro extrakci byl používán Tris-HCl pufr (pH = 8,3; 30 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) s DTT (1 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) a inhibitor proteas (Complete EDTA free protease tablets; 20 μl na 1 ml). Pufr byl přidán do mikrozkušavky k homogenátu z kořenů, následovalo vortexování, 15 min inkubace na ledě, 15 min centrifugace (13 000 g, 4°C) a odpipetování supernatantu. Dále byl měřen obsah proteinů v supernatantu.

3.2.5 Měření obsahu proteinů ve vzorku metodou Bradfordové

Obsah proteinů ve vzorku byl měřen metodou Bradfordové (Bradford, 1967). Do mikrotitrační destičky bylo napipetováno do jamek 89 μl destilované vody, 10 μl činidla Bradfordové a 1 μl vzorku (proteinového extraktu), směs byla promíchána a inkubována 10 min při laboratorní teplotě, poté byla měřena absorbance na spektrofotometru při vlnové délce 595 nm oproti blanku (89 μl destilovaná voda, 10 μl činidla Bradfordové, 1 μl extrakční roztok). Absorbance pro každý vzorek byla odečtena z kalibrační křivky ve 3 opakováních. Kalibrační křivka byla zhotovena pomocí známých koncentrací albuminu z hovězího séra (Bovine serum Albumine).

3.2.6 Denaturující polyakrylamidová elektroforéza

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s detergentem dodecylsíránem sodným (SDS) byla použita pro separaci proteinů podle jejich molekulové hmotnosti.

Vzorky byly připravovány tak, aby v každém z nich bylo stejné množství proteinů (pro různá biologická opakování se tento obsah lišil, ale v rámci jednoho opakování byl stejný). Objem proteinového extraktu odpovídající tomuto množství byl napipetován do mikrozkušavky a byl přidán původní extrakční roztok pro vyrovnání objemů jednotlivých vzorků.

Ke vzorkům byl dále přidán β -merkaptoethanol (5 % v/v) a 4x Laemmli Sample Buffer (25 % v/v). Vzorky byly poté zahřívány 5 min na 95 °C.

Byl používán 12% dělicí gel a 4% zaostřovací gel. Nanáška vzorků do jamek byla pro různá opakování taková, aby bylo přítomno stejné množství proteinů. Na gel byly vždy dávkovány 3 μ l standardu. Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 180 V přibližně 45 min. Byl používán Tris-glycin-SDS elektroforetický pufr. Proteinové bandy byly vizualizovány barvením barvivem Coomassie Brilliant Blue, které působilo na gel přibližně 1–2 h. Poté byly gely odbarveny minimálně 1 den v destilované vodě. Dokumentace byla prováděna na Chemidoc MP (Bio-Rad) dokumentačním systémem.

3.2.7 Imunoblotování

Metoda byla využita pro stanovení abundance aktinu, α -tubulinu, β -tubulinu a proteinu profilin ve vzorcích kořenů. V prvním kroku proběhla denaturující polyakrylamidová elektroforéza podle postupu popsaného v předchozí podkapitole. Membrána PVDF (9x6 cm) byla aktivována ponořením do methanolu na 20 s a poté inkubována 10 min v přenosovém pufru společně s gelem z SDS PAGE. Poté byla složena aparatura (Mini Trans Blot, Bio-Rad) a spuštěn přenos proteinů z gelu na membránu při napětí 100 V po dobu 1,5 h (nebo při napětí 24 V přes noc) a 4 °C. Byl používán přenosový pufr (Tris-glycinový pufr s methanolem).

Pro kontrolu, zda byl přenos proteinů úspěšný, byla membrána opláchnuta v H₂O a barvena v roztoku Ponceau S. Následovaly tyto kroky:

- opláchnutí membrány v H₂O
- omývání membrány roztokem TBS-T na třepačce (3x 10 min, pokojová teplota)
- blokování nespecifických míst membrány blokovacím roztokem na třepačce (1 h, pokojová teplota)
- opláchnutí membrány v TBS-T
- aplikace primární protilátky naředěné v roztoku TBS-T s 1% BSA (inkubace membrány s roztokem protilátky přes noc při 4 °C nebo 1,5 h při pokojové teplotě na třepačce)

- promývání membrány roztokem TBS-T na třepačce (3x 10 min, pokojová teplota)
- aplikace sekundární protilátky naředěné v roztoku TBS-T s 1% BSA na membránu (inkubace membrány s roztokem protilátky 1,5 h při pokojové teplotě na třepačce)
- promývání membrány roztokem TBS-T na třepačce (3x 10 min, pokojová teplota)
- detekce signálu Chemidoc MP dokumentačním systémem (program ImageLab) po aplikaci roztoku ECL na 2 min na membránu

Roztoky protilátek byly připraveny naředěním protilátky roztokem TBS-T s 1% BSA. Ředění pro jednotlivé protilátky bylo následující:

- primární protilátka mouse anti-aktin (1:5000)
- primární protilátka mouse anti-alfa tubulin (DM1A) (1:5000)
- primární protilátka mouse anti-beta tubulin (TUB2,1) (1:5000)
- primární protilátka mouse anti-profilin (1:1500)
- sekundární protilátka rabbit anti-mouse IgG-HRP (1:5000).

Po vyvolání signálu byly membrány ještě jednou použity pro aplikaci odlišné primární protilátky a detekci jiného proteinu. Původní primární a sekundární protilátka byla z membrány odstraněna následujícím způsobem:

- promývání membrány H₂O na třepačce (3x 5 min, pokojová teplota)
- promývání membrány roztokem NaOH na třepačce (0,5 mol·l⁻¹, 3x 15 min, pokojová teplota)
- promývání membrány roztokem TBS-T na třepačce (3x 10 min, pokojová teplota)
- následuje blokování membrány a opakuje se postup popsáný výše

Analýza abundance α -, β -tubulinu a aktinu ve vzorcích kořene mutantu *Arabidopsis der1-3* (tyto vzorky nebyly ovlivněny taxolem) byla provedena ve třech biologických opakováních.

Analýza abundance α -, β -tubulinu, aktinu a profilinu byla prováděna u vzorků kořenů *Arabidopsis Col-0*, které byly ovlivňovány taxolem v těchto koncentracích: 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a 15 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. U kontrolních rostlin byl použit DMSO v odpovídajícím objemu přidávaného taxolu. Kvantifikace abundance proteinů byla provedena v programu ImageLab pouze pro vzorky ovlivňované taxolem/DMSO

v koncentraci $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Pro kvantifikaci byla použita dvě biologická opakování u proteinů α -, β -tubulin a profilin a tři biologická opakování u proteinu aktin.

3.2.8 Vliv taxolu na fenotyp kořenů *Arabidopsis*

Na pevné 1/2 MS médium v Petriho misce bylo vysázeno 60 semen *Arabidopsis thaliana* (Col-0). Petriho misky se semeny byly uloženy na 1 den na 4°C (horizontální poloha) a poté vyloženy do fytotronu na 5 dnů (vertikální poloha). Dále byly rostliny přeneseny na pevné 1/2 MS médium s taxolem (10 rostlin) nebo DMSO (10 rostlin). Médium s taxolem bylo připraveno smícháním taxolu rozpuštěného v DMSO s tekutým 1/2 MS médiem, tento roztok byl filtrován přes injekční sterilizační filtr (pro zabránění kontaminace média) a poté byl smíchán s nezpevněným 1/2 MS médiem. Roztok o celkovém objemu 20 ml a koncentraci taxolu $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ byl nalit na Petriho misku s průměrem 90 mm. Médium s DMSO sloužící jako kontrola bylo připraveno přidáním taxolu-ekvivalentního množství DMSO do 1/2 MS média. Poté byly Petriho misky s rostlinami umístěny do fytotronu ve vertikální poloze.

Pro pozorování fenotypu byly rostliny skenovány přístrojem Image Scanner III v den přenesení (nultý den), 3., 4. a 5. den po přenesení. Pátý den byly rostliny také pozorovány binokulárním mikroskopem (pro dokumentaci délky a počtu kořenových vlásků).

Pro měření délky primárního kořene a postranních kořenů, délky kořenových vlásků a šířky kořene byl používán program ImageJ. Šířka kořene byla měřena v oblasti začátku tvorby kořenových vlásků. Pro ověření, zda jsou rozdíly ve fenotypu mezi kontrolními a taxolem ovlivněnými rostlinami významné byl použit dvouvýběrový t-test ($p \leq 0,05$).

3.2.8.1 Gravistimulace

Po 5 dnech od přenesení rostlin na médium s taxolem nebo DMSO byly Petriho misky s rostlinami natočeny o 90° oproti původní poloze a umístěny takto do fytotronu ve vertikální poloze. Další den byly rostliny skenovány a otočeny znovu o 90° nazpět do původní polohy a skenovány následující den.

Pro vyhodnocení byly měřeny úhly mezi směrem původního kořenového růstu a růstu po otočení o 90° .

3.2.9 Konfokální fluorescenční mikroskopie

Konfokálním laserovým mikroskopem byla pozorována dynamika mikrotubulů, lokalizace proteinů Beclin 1 a Sec14p a vliv taxolu na abundanci těchto dvou proteinů. Pro emisi GFP byla používána vlnová délka 488 nm a pro detekci vlnové délky mezi 500 a 535 nm.

Experiment pozorování vlivu taxolu na dynamiku mikrotubulů byl realizován pro přímé ověření stabilizačního účinku taxolu na mikrotubuly. Pětidenní transgenní rostliny *Arabidopsis* nesoucí GFP fuzní konstrukt MAP4-GFP pro vizualizaci mikrotubulů (Marc *et al.*, 1998) rostoucí na 1/2 MS médiu, byly přeneseny na podložní sklo do kapky 1/2 tekutého MS média. Podložní sklo bylo po stranách ohraničeno proužky oboustranné lepicí pásky a na ni bylo přiloženo krycí sklo. Rostliny byly inkubovány nejméně 1 hodinu ve vlhké komůrce vytvořené z Petriho misky s navlhčenými ubrousky. Takto připravený preparát byl infiltrován roztokem tekutého 1/2 MS média s taxolem ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) nebo se stejným objemem DMSO (kontrola), po 2h od infiltrace byl preparát pozorován konfokálním laserovým mikroskopem s rotujícím diskem (ZEISS SD).

Pro mikroskopické pozorování lokalizace proteinů Beclin 1 Sec14p byly používány rostliny *Arabidopsis* nesoucí GFP fuzní konstrukt s proteiny Beclin 1 a Sec14p pod nativním promotorem rostoucí na 1/2 MS médiu, stáří 4 d. Preparát byl připraven způsobem popsaným výše. Lokalizace proteinů v buňce i v rostlinných orgánech byla sledována konfokálním laserovým skenovacím mikroskopem (podle lokalizace fluorescenčního signálu). Pro pozorování vlivu taxolu na abundanci proteinů Beclin 1 a Sec14p byly preparáty infiltrovány tekutým 1/2 MS médiem s taxolem ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) nebo s DMSO pro kontrolu ($10 \mu\text{l}$ DMSO v 1 ml média). Pozorování buněk rostlin konfokálním laserovým skenovacím mikroskopem bylo provedeno před infiltrací, 10 min po infiltraci a poté za 2 h. Intenzita fluorescence byla měřena softwarem Zen v jedné vybrané linii vždy u dvou sousedících buněk. Naměřené intenzity byly zprůměrovány a porovnány.

3.2.10 Bioinformatické vyhodnocení proteomické analýzy vlivu taxolu na kořeny *Arabidopsis*

Cílem bakalářské práce bylo také vyhodnocení proteomických dat které byly dříve získány gelovou a bezgelovou analýzou kořenů *Arabidopsis* ovlivněných taxolem. Proteomická analýza byla provedena se dvěma vzorky (kontrolou a vzorkem z rostlin

ovlivněných taxolem), přičemž z každého vzorku byly zhotoveny 3 repliky. Výsledkem bezgelové analýzy byly identifikované a kvantifikované proteiny ve 3 replikách (Takáč *et al.*, nepublikovaná data). V rámci analýzy byla tato data statisticky vyhodnocena pomocí One way Anova testu a proteiny se změněnou abundancí po vlivu taxolu s hladinou významnosti $p \leq 0,05$ byly společně s daty z gelové proteomické analýzy podrobeny bioinformatické analýze. Dále byly vybrány proteiny, které byly detekovány pouze v kontrolních vzorcích nebo pouze ve vzorcích ovlivněných taxolem v jedné nebo ve dvou z celkem tří replik.

Selektované proteiny byly klasifikovány podle lokalizace, molekulární funkce a zapojení v biologických procesech pomocí softwaru Blast2GO (Conesa a Götz, 2008), do kterého byly vloženy aminokyselinové sekvence proteinů získané z databází UniProt nebo NCBI. S využitím tohoto softwaru byly také identifikovány proteiny mající souvislost s cytoskeletem.

Do vyhodnocení byly zahrnuty proteinové sekvence z úrovně 8 v Blast2Go u lokalizace, z úrovně 6 u biologických procesů a pouze u těch procesů, kde bylo detekováno více než 5 proteinů se změněnou abundancí a z úrovně 5 u molekulárních funkcí a pouze u funkcí, kde byly detekovány více než 2 proteiny se změněnou abundancí. V rámci anotace sekvencí „Gene ontology annotation“ byly pomocí Blast2go vyhledány homologické (identické) sekvence z databáze NCBI (*Arabidopsis thaliana*), poté proběhlo mapování a anotace sekvencí za použití následujících parametrů: E Value Hit filter: 1.0E-6; Annotation cut off: 55; GO weight: 5. Anotace byly vyexportovány do formátu programu MS Excel a vyhodnoceny do grafů.

Pro zjištění, zda proteiny obsahují transmembránové domény, byl použit DAS - Transmembrane Prediction server (<http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/>).

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

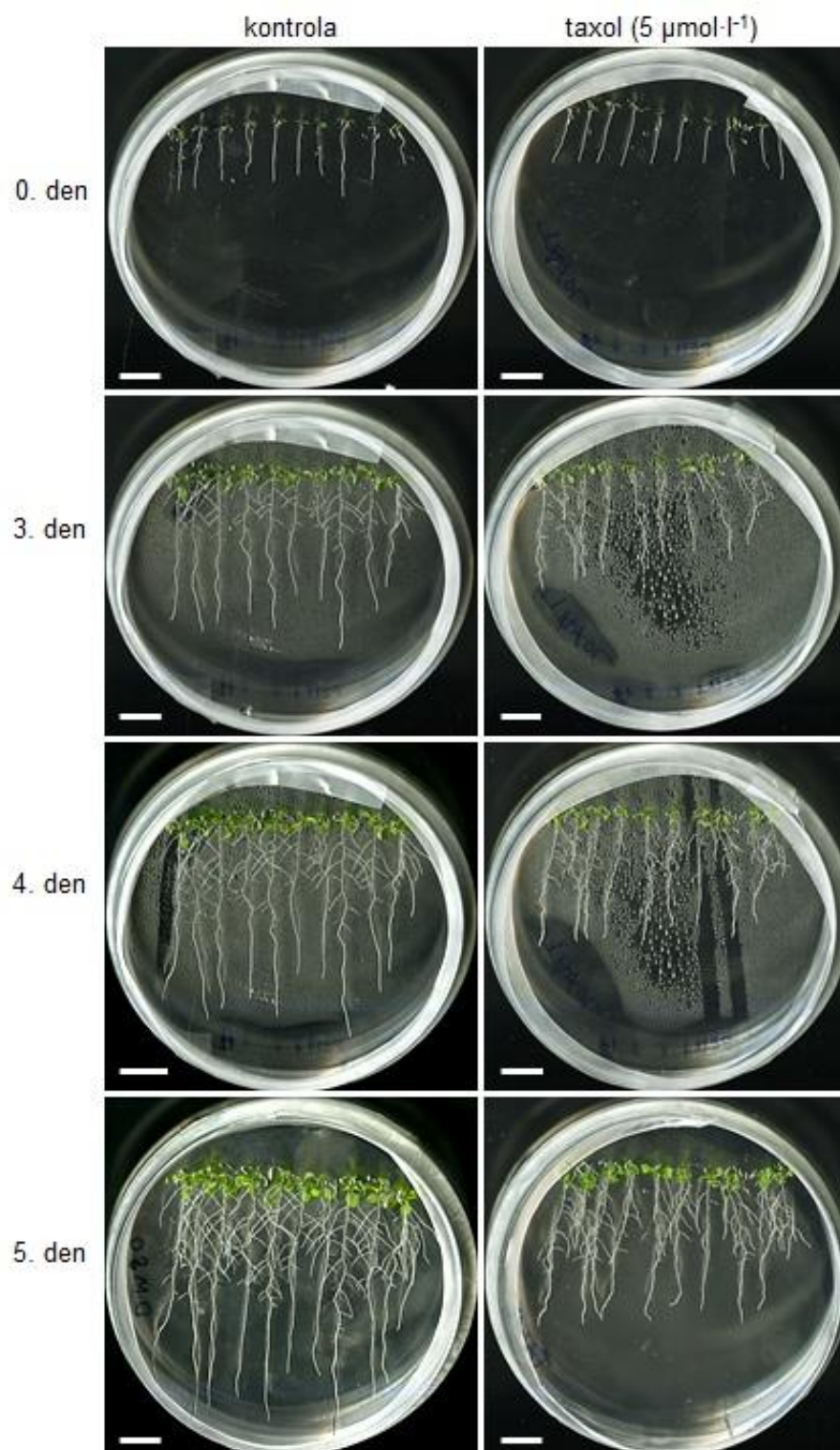
4.1 VLIV TAXOLU NA FENOTYP KOŘENŮ ARABIDOPSIS

Tento experiment byl proveden s cílem zjistit, jak se efekty vyvolané taxolem uvnitř buňky (stabilizace mikrotubulů a zpomalení jejich dynamiky) projevují ve fenotypu kořenů. Kořeny rostlin rostoucích na médiu s taxolem a kontrolních rostlin rostoucích na médiu s DMSO byly porovnávány v následujících parametrech: délka primárních kořenů, počet a délka postranních kořenů, rychlost růstu primárních kořenů, počet a délka kořenových vlásků, vliv gravitace na růst primárních kořenů a popsány byly i další významné rozdíly.

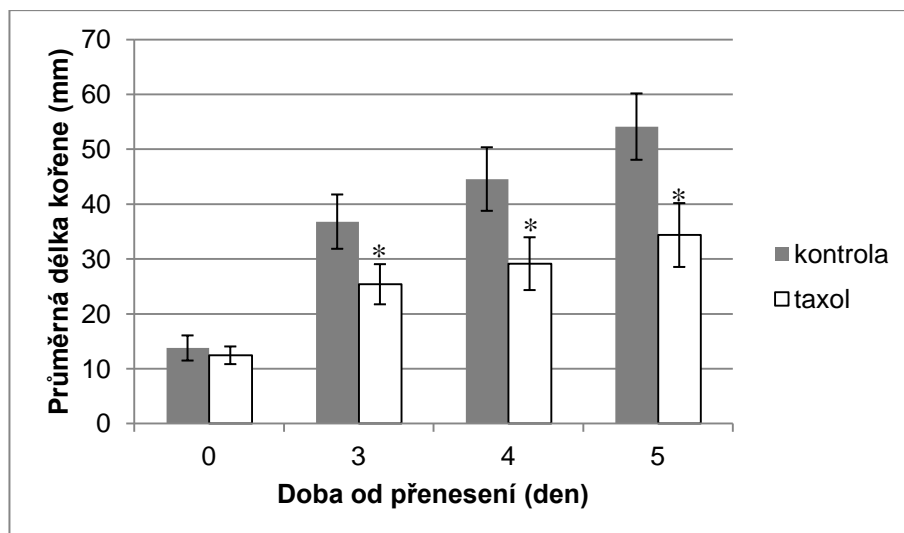
4.1.1 Délka a rychlost růstu primárního kořene

Taxol významně zpomalil růst primárního kořene *Arabidopsis thaliana* (Obr. 11 a 12). Délky kořenů rostlin rostoucích na médiu s DMSO a na médiu s taxolem byly měřeny programem ImageJ v den přenesení rostlin, 3., 4., a 5. den po přenesení a výsledky všech měření jsou uvedeny v příloze (Tab. 4, 5, 6, 7). Průměrná rychlost růstu kořenů na médiu s taxolem ($4,43 \pm 0,61$ mm/den) byla oproti kontrolním rostlinám ($8,33 \pm 0,87$ mm/den) menší téměř o polovinu (Tab. 1).

Výsledky se shodují s očekáváním, že taxolem vyvolaná stabilizace mikrotubulů a především mikrotubulů dělicího vřeténka vedoucí k zastavení buněčného dělení (Jordan *et al.*, 1993), může být příčinou zpomalení růstu kořenů rostlin ovlivněných taxolem (Baskin *et al.*, 1994, Baluška *et al.*, 1997). A také, že s rostoucí dobou působení taxolu na rostliny jsou jeho účinky výraznější a intenzivnější. Skutečnost, že taxol inhibuje růst primárních kořenů rostlin kukuřice, pozorovali Baluška *et al.* (1997).



Obr. 11: Kontrolní rostliny *Arabidopsis* rostoucí na médiu s DMSO (vlevo) a rostliny rostoucí na médiu s taxolem ($5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) (vpravo) 0. den, 3., 4. a 5. den od přenesení na tuto média. Celkové stáří rostlin je 5, 8, 9 a 10 d. Měřítko 10 mm.



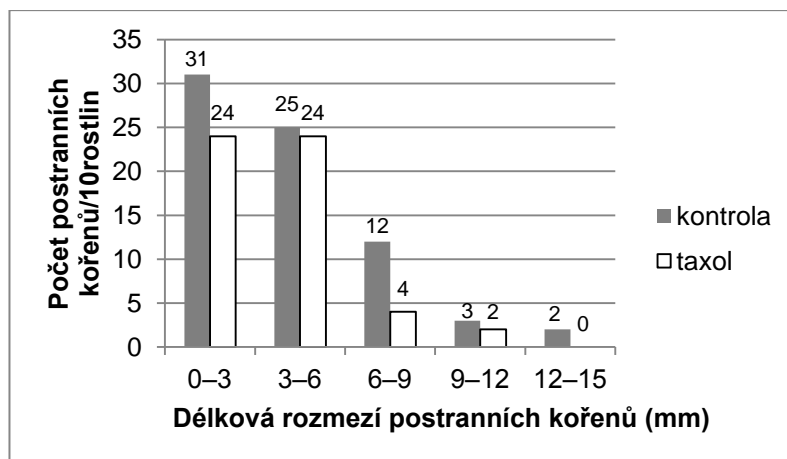
Obr. 12: Porovnání průměrné délky primárního kořene kontrolních rostlin *Arabidopsis*, ekotyp Col-0 a rostlin ovlivněných taxolem 0., 3., 4. a 5. den od přenesení na médium s DMSO (kontrola) nebo s taxolem (celkové stáří rostlin je 5, 8, 9 a 10 d). Sloupce znázorňují průměr délky (\pm směrodatná odchylka) z 10 měřených rostlin. Statisticky významné rozdíly mezi kontrolními a ovlivněnými rostlinami jsou označeny hvězdičkou (t-test, $p \leq 0,05$).

Tab. 1: Průměrná rychlost růstu primárních kořenů kontrolních rostlin *Arabidopsis*, ekotyp Col-0 umístěných na médiu s DMSO a rostlin ovlivňovaných na médiu s taxolem a průměrný kořenový přírůstek u těchto rostlin 3., 4. a 5. den od přenesení na média (celkové stáří rostlin je 5, 8, 9 a 10 d). Průměr byl počítán z 10 rostlin pro kontrolu i pro taxolem ovlivněné rostliny.

| Doba od přenesení rostlin (den) | Průměrný kořenový přírůstek od přenesení na médium s taxolem (mm) | |
|--|---|------------------------|
| | kontrola | taxol |
| 3 | 23,03 | 12,95 |
| 4 | 30,79 | 16,70 |
| 5 | 40,35 | 21,92 |
| Průměrná rychlost růstu kořene: | $8,33 \pm 0,87$ mm/den | $4,43 \pm 0,61$ mm/den |

4.1.2 Počet a délka postranních kořenů

Počet a délka postranních kořenů u kontrolních rostlin a taxolem ovlivněných rostlin byly měřeny 3. den od přenesení rostlin na médium s DMSO nebo s taxolem. Postranní kořeny byly poté rozříděny podle délky (0–3, 3–6, 6–9, 9–12 a 12–15 mm) a porovnával se počet kořenů v jednotlivých rozmezích délek (Obr. 13). Délky postranních kořenů všech rostlin jsou uvedeny v příloze (Tab. 8, 9).



Obr. 13: Porovnání počtu postranních kořenů u kontrolních a taxolem ovlivněných rostlin v jednotlivých délkových rozmezích postranních kořenů. Hodnoty byly získány změřeným všem postranních kořenů u 10 kontrolních a 10 taxolem ovlivněných rostlin, u rostlin starých 8 dnů, rostoucích na médiu s taxolem/DMSO 3. den.

Celkový počet postranních kořenů kontrolních rostlin (73) převyšoval počet kořenů u taxolem ovlivněných rostlin (54) a stejná situace se opakovala i v jednotlivých délkových intervalech postranních kořenů. Délky větší než 6 mm dosáhlo 17 postranních kořenů kontrolních rostlin, ale pouze 6 postranních kořenů taxolem ovlivněných rostlin. Podle našich vědomostí, v dosavadních literárních pramenech vliv taxolu na růst postranních kořenu sledován nebyl. Lze říci, že taxol vyvolává snížení počtu i délky postranních kořenů, což je možné vysvětlit tím, že tvorba postranních kořenů je regulována hormonem auxinem a správná dynamika a organizace kortikálních mikrotubulů je nezbytná pro transport auxinu a tedy i pro růstové procesy kontrolované auxinem (Casimiro *et al.*, 2001; Abu-Abied *et al.*, 2015).

4.1.3 Délka, počet kořenových vlásků a další rozdíly

Pozorování délky a počtu kořenových vlásků bylo prováděno binokulárním mikroskopem 5. den od přenesení rostlin na médium s DMSO nebo s taxolem. Pro stanovení počtu vlásků byla vybrána jedna reprezentativní kontrolní rostlina a jedna reprezentativní taxolem ovlivněná rostlina (Obr. 14A, B). Snímky dalších kořenů s kořenovými vlásky jsou uvedeny v příloze (Obr. 34). Bylo změřeno 10 vlásků z oblasti vyznačené složenou závorkou na Obrázku 14A, B. Výsledky měření jsou uvedeny v příloze (Tab. 10).

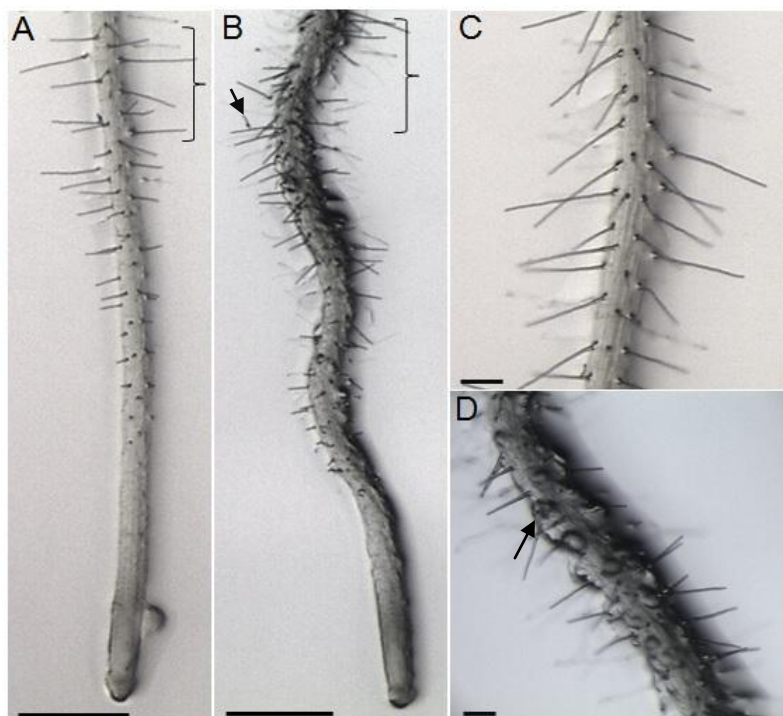
Bylo zjištěno, že kořenové vlásky rostlin ovlivněných taxolem (62 kořenových vlásků na 2,4 mm délky kořene) jsou početnější než kořenové vlásky u kontrolních

rostlin (44 kořenových vlásků na 2,4 mm délky kořene). Avšak průměrná délka kořenových vlásků kontrolních rostlin ($247 \pm 57 \mu\text{m}$) převyšuje průměrnou délku vlásků taxolem ovlivňovaných rostlin ($144 \pm 42 \mu\text{m}$).

Šířky kořenů měřené na začátku zóny růstu kořenových vlásků se u kontrolní rostliny ($135 \mu\text{m}$ u kořene na Obr. 14A) a taxolem ovlivněné rostliny ($150 \mu\text{m}$ u kořene na Obr. 14B) od sebe mírně lišily. U taxolem ovlivněných rostlin byla viditelná radiální expanze kořene (Obr. 14).

Dále bylo u kořenů taxolem ovlivněných rostlin místy pozorováno větvení (branching) kořenových vlásků (Obr. 14B), kdy z jedné rhizodermální buňky vyrůstaly dva vlásky místo jednoho, nebo k větvení docházelo během růstu jednoho kořenového vlásku. U těchto rostlin bylo patrné také zduření rhizodermálních buněk (Obr. 14D).

Baskin *et al.* (1994) pozorovali stejné účinky taxolu na kořeny *Arabidopsis* (radiální expanze, zduření, porušení tvaru rhizodermálních buněk a kořenových vlásků). Radiální expanzi a zduření dávali do souvislosti s poruchou organizace kortikálních mikrotubulů způsobenou taxolem. Větvení může být vysvětleno tím, že neporušená funkce mikrotubulů je potřebná pro zajištění polarity prodlužování vlásku bez větvení (Bibikova *et al.*, 1999).



Obr. 14: Kořen kontrolní rostliny *Arabidopsis* (A) a jeho detail (C), kořen rostliny rostoucí 3 dny na médiu s taxolem (B) a jeho detail (C), svorkami je znázorněna oblast, ve které byly měřeny délky kořenových vlásků. Šipkou je znázorněno zduření rhizodermálních buněk a větvení kořenových vlásků. Stáří rostlin je 8 d. Měřítka 0,5 mm.

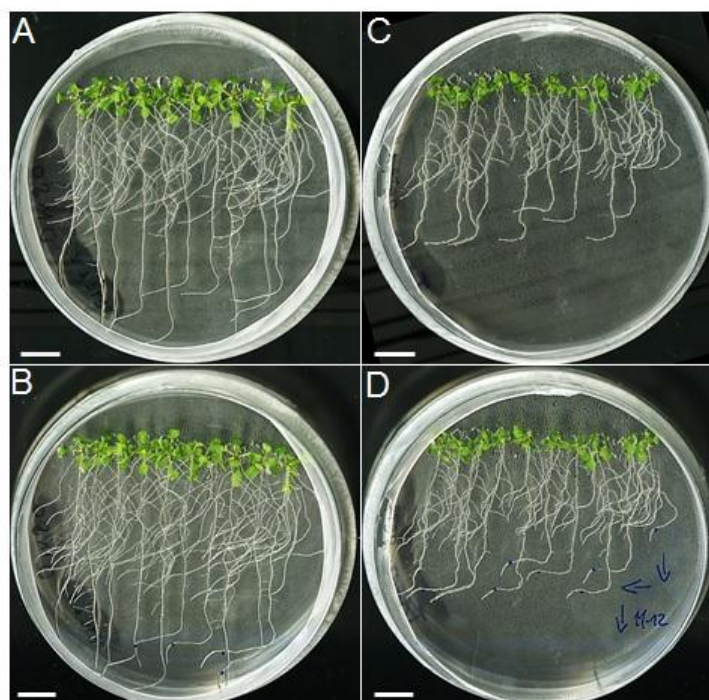
Taxol v tomto experimentu tedy způsobil zvýšení počtu kořenových vlásků, zkrácení jejich délky, větvení vlásků, zduření rhizodermálních buněk a radiální expanzi kořene.

4.1.4 Vliv taxolu na gravitropismus kořene *Arabidopsis*

Byl také sledován vliv taxolu na gravitropismus a gravistimulaci kořenů *Arabidopsis thaliana*. Gravitropismus kořenů byl sledován u 5 kontrolních rostlin a 5 rostlin ovlivněných taxolem po prvním otočení Petriho misky o 90° (vzhledem ke gravitaci), po druhém otočení o 90° zpět byly pro měření vybrány 4 rostliny z každé Petriho misky (Obr. 15). V prvním případě se průměrné úhly mezi původním směrem růstu primárního kořene a novým směrem u kontrolních ($107,77 \pm 7,90^\circ$) a taxolem ovlivněných rostlin ($103,33 \pm 3,68^\circ$) příliš nelišily. Statisticky významné rozdíly byly zaznamenány po druhém otočení o 90° do původní polohy, u kontrolních rostlin $99,94 \pm 12,75^\circ$ a u taxolem ovlivněných rostlin $134,63 \pm 3,56^\circ$. Všechny naměřené úhly jsou uvedeny v příloze (Tab. 11 a 12).

Jev, při kterém se kořeny rostlin orientují ve směru působení gravitace, se označuje jako gravitropismus a jeho podstatou je působení zemské tíže na statolity nacházející se v buňkách kořene čepičky. Pokud je kořen ve vertikální poloze, statolity jsou umístěny ve spodní (bazální) části buněk kořene čepičky a to zajišťuje rovnoměrnou distribuci auxinu transportovaného do kořene čepičky z nadzemní části rostliny cévními svazky (Nakamura *et al.*, 2011). Poté je auxin transportován do elongační zóny kořene, kde řídí jeho prodlužování. Transport a polární distribuci auxinu zajišťují tzv. auxin influx a eflux carriers (Friml *et al.*, 2002). Při změně polohy rostliny po jejím otočení netlačí statolity na bazální část buňky, ale na jednu z jejích stran a distribuce auxinu je na této straně hojnější než na opačné straně. Tím je zajištěna větší koncentrace auxinu na jedné straně elongační zóny a buněčné prodlužování je v této straně inhibováno, kdežto na opačné straně je intenzivnější, čímž dojde k zakřivení kořene (Sato *et al.*, 2014).

Z výsledků experimentu v této práci, by se dalo předpokládat, že mikrotubuly budou hrát roli v transportu auxinů do kořene čepičky nebo v transportu statolitů. I když byla první možnost vyvrácena ve studii Hasenstein *et al.* (1999), nedávná studie potvrdila tuto hypotézu (Abu-Abied *et al.*, 2015). Hou *et al.* (2003) zjistili, že na transportu statolitů se podílí především aktinová vlákna.



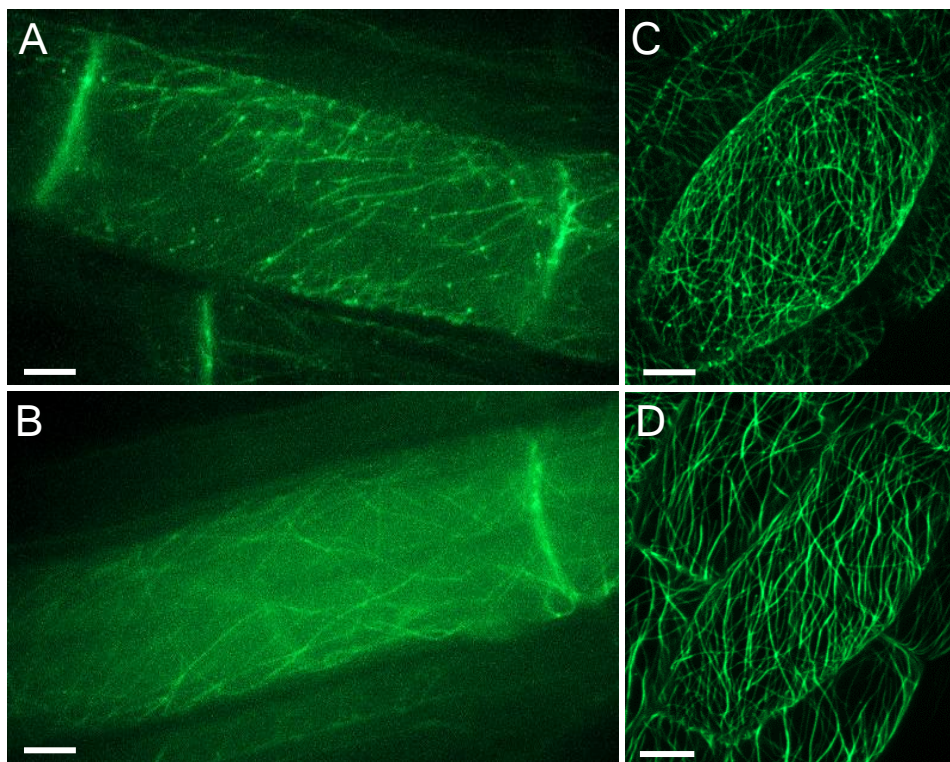
Obr. 15: Porovnání reakce na gravistimulaci. Kontrolní rostliny *Arabidopsis* rostoucí na médiu s DMSO (A, B) a rostliny rostoucí na médiu s taxolem ($5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) (C, D) 6. den (A, C) a 7. den (B, D) od přenesení na tato média. Po otočení o 90° (A, C) a o 90° zpět do původní polohy (B, D). Celkové stáří rostlin je 11 a 12 d. Měřítko 10 mm.

V odborných publikacích byla popsána jak situace, kdy taxol neměl na gravitropismus žádný vliv (Hasenstein *et al.*, 1999), tak situace kdy bylo naopak pozorováno negativní ovlivnění gravitropismu taxolem (Park *et al.*, 1996). Výsledky v této bakalářské práci naznačují, že správná dynamika mikrotubulů je důležitá pro gravitropismus *Arabidopsis thaliana*.

4.2 POZOROVÁNÍ DYNAMIKY MIKROTUBULŮ PO VLIUVU TAXOLU

Pozorování dynamiky mikrotubulů bylo provedeno na pětidenních transgenních rostlinách *Arabidopsis* nesoucích GFP fuzní konstrukt MAP4-GFP po aplikaci taxolu ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) po dobu 2 hodin pomocí konfokální laserové mikroskopie s rotujícím diskem (spinning disc microscopy).

U kontrolních rostlin bylo pozorováno dynamické chování mikrotubulů, jejich rychlé prodlužování nebo zkracování (polymerizace i depolymerizace), kdežto u rostlin ovlivňovaných 2 h taxolem došlo k výraznému snížení, až zastavení jejich pohybu a to u kořenových i hypokotylových buněk.



Obr. 16: Mikroskopické pozorování dynamiky mikrotubulů u transgenních rostlin *Arabidopsis* nesoucí GFP fuzní konstrukt MAP4-GFP pro vizualizaci mikrotubulů u buněk kořenů (A, B) a hypokotyly (C, D) před aplikací taxolu (A, C) a po 2 h působení taxolu v koncentraci $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (B, D). Stáří rostlin je 5 d. Měřítka $10 \mu\text{m}$. Projekce všech snímaných fokálních rovin v jednom snímku.

Podobně jako Baluška *et al.* (1997) jsme pozorovali také nárůst intenzity difuzního signálu MAP4-GFP po taxole u kořenů (Obr. 16B). Výsledky v této práci potvrdily inhibici dynamiky mikrotubulů v kořenech a hypokotylech *Arabidopsis* (Baskin *et al.*, 1994).

4.3 VYHODNOCENÍ PROTEOMICKÉ ANALÝZY VLIVU TAXOLU NA KOŘENY ARABIDOPSIS

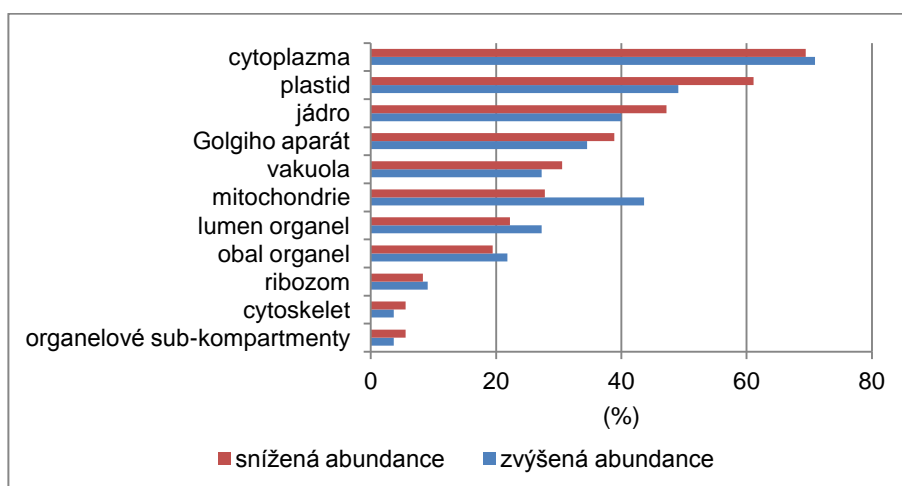
Cílem této části práce bylo vyhodnocení proteomických dat získaných proteomickou analýzou kořenů *Arabidopsis* ovlivněných taxolem ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, 2h, Takáč *et al.*, nepublikovaná data).

Proteomická analýza signifikantně ovlivnila celkem 97 proteinů, 62 z nich bylo získáno gelovou proteomickou analýzou, přičemž 35 poskytla bezgelová proteomika. Z celkového počtu proteinů mělo 39 statisticky významně sníženou abundanci po taxolu a 58 statisticky významně zvýšenou (Tab. 12, 13 v příloze).

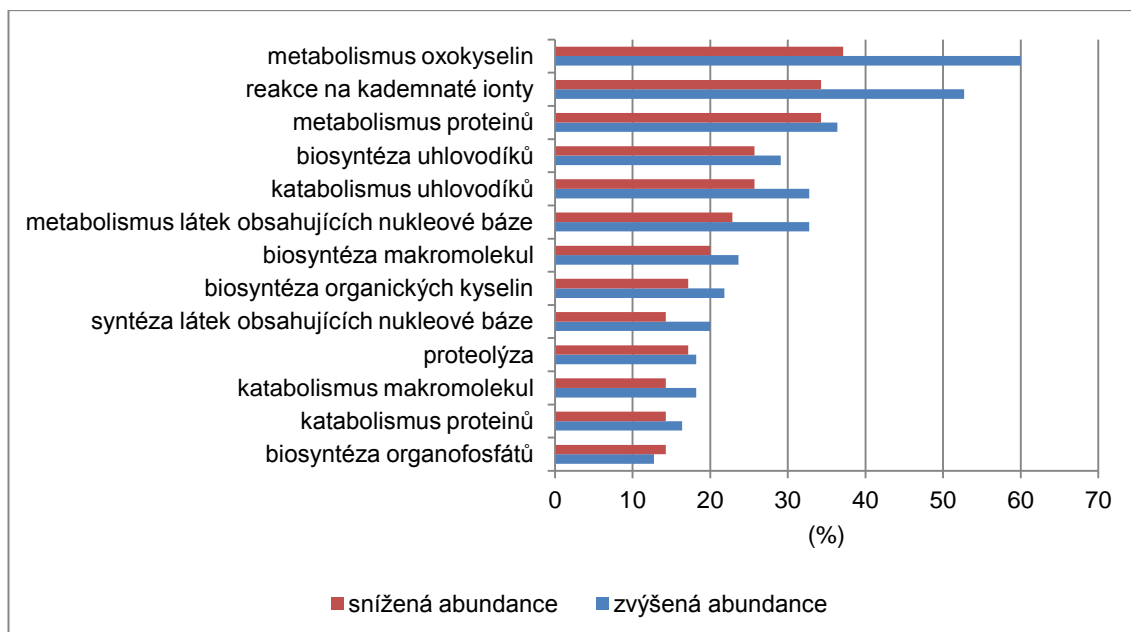
Taxol vyvolal statisticky významné změny abundance u 11 proteinů (8 se sníženou a 3 se zvýšenou abundancí) buněk dermální papily ve studii Chen *et al.* (2011). Změněná abundance některých těchto proteinů byla detekována i proteomickou analýzou vyhodnocenou v rámci této bakalářské práce. Jedná se o annexin, jehož abundance byla snížena, a který se váže na membrány, reguluje organizaci membrán, vezikulární transport a signalizaci a účastní se také regulace apoptózy (Clark *et al.*, 2012). Dále proteiny patří mezi Rab-GTPasy, které se účastní vezikulárního transportu, heat shock proteiny udržující správnou konformaci proteinů a enolasa (Chen *et al.*, 2011, Tab. 13 a 14).

U buněk HeLa taxol významně ovlivnil abundance 87 proteinů, přičemž počet proteinů se zvýšenou abundancí po taxolu přesahoval počet proteinů se sníženou abundancí, stejně jako ve výsledku proteomické analýzy této bakalářské práce (Bull *et al.*, 2010)

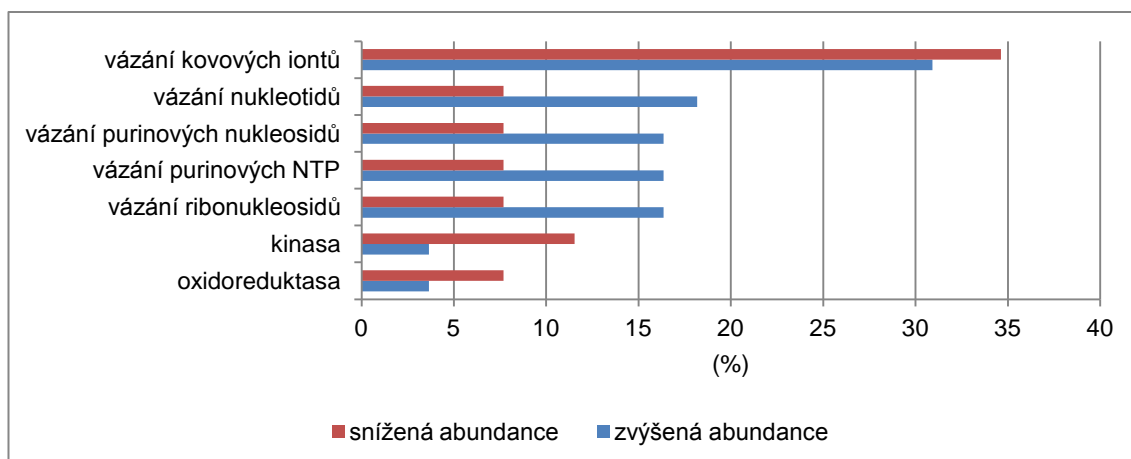
Pro vyhodnocení proteomu bylo využito několika bioinformatických metod. Nejprve byly proteiny funkčně rozříděny podle tzv. Gene ontology annotation. Gene ontology annotation přiřazuje funkci k sekvenci (aminokyselinové nebo nukleotidové) na základě známých homologických sekvencí pomocí složitého algoritmu který zohledňuje podobnost, míru homologie, databázi, hierarchii GO a kvalitu originálních anotací (Ashburner *et al.*, 2000). Pomocí této analýzy byly proteiny klasifikovány podle lokalizace (Obr. 17), biologického procesu (Obr. 18) a molekulární funkce (Obr. 19).



Obr. 17: Porovnání lokalizace proteinů kořene *Arabidopsis thaliana* (podle Gene Ontology annotation) se zvýšenou nebo sníženou abundancí po ošetření taxolem. V procentech je vyjádřen počet proteinů se sníženou/zvýšenou abundancí.



Obr. 18: Porovnání zastoupení proteinů kořene *Arabidopsis thaliana* (podle Gene Ontology annotation) se zvýšenou nebo sníženou abundancí po ošetření taxolem v biologických procesech. V procentech je vyjádřen počet proteinů se sníženou/zvýšenou abundancí



Obr. 19: Porovnání zastoupení proteinů se zvýšenou nebo sníženou abundancí po ošetření taxolem v molekulárních funkcích. V procentech je vyjádřen počet proteinů se sníženou/zvýšenou abundancí.

Největší počet proteinů se změněnou abundancí byl podle této bioinformatické analýzy v cytoplazmě, dále pak v plastidech a v jádře. Výrazné rozdíly mezi počtem proteinů se sníženou a zvýšenou abundancí byly zaznamenány v plastidech (převažovaly proteiny se sníženou abundancí), v jádru (převaha proteinů se sníženou abundancí) a v mitochondriích (převaha proteinů se zvýšenou abundancí). Méně výrazné rozdíly byly v Golgiho aparátu a v lumenu organel (Obr. 17). Tato klasifikace

ukázala, že taxol inhibičně působí na procesy probíhající v plastidech, jádru, Golgiho aparátu a vakuole, naopak procesy v mitochondriích (respirace) byly patrně stimulovány.

Největší počet proteinů se změněnou abundancí se v rámci biologických procesů účastní metabolismu oxokyselin, reakce na kadmnaté ionty a metabolismu proteinů. Rozdíly mezi sníženou a zvýšenou abundancí byly nejpatrnější u proteinů podílejících se na metabolismu oxokyselin, reakci na kadmnaté ionty, metabolismu látek obsahujících nukleové báze a katabolismu uhlovodíků (Obr. 18).

Je zajímavé, že taxol ovlivnil abundanci proteinů důležitých pro odpověď na vliv kadmia. Toxické působení kadmia je spojeno, kromě jiných procesů, s rozpadem mikrotubulů na menší fragmenty a poruchou jejich organizace (Dovgalyuk *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2009). Výsledky této práce mohou naznačovat hypotézu, že taxol simuluje účinky kadmia a tudíž taxol může modulovat odpověď buněk na vliv kadmia. Tento efekt musí být ale experimentálně potvrzen.

V případě molekulárních funkcí se nejvíce proteinů se změněnou abundancí účastní vázání kovových iontů a největší rozdíly mezi počtem proteinů se zvýšenou a sníženou abundancí bylo u proteinů, které jsou zapojeny v procesu vázání nukleotidů, vázání purinových nukleosidů, vázání purinových NTP a vázání ribonukleosidů (Obr. 19). Tato klasifikace naznačuje, že taxol nejvíce ovlivňoval tvorbu proteinů zapojených do těchto vazebných interakcí. V porovnání s našimi výsledky anotace pomocí Gene ontology annotation, proteomická analýza lidských rakovinových buněk po vlivu taxolu ukázala zejména změny v cytoskeletálních proteinech, proteinech zapojených v translaci a transkripci, metabolických procesech a u jaderných ribonukleoproteinů (Bull *et al.*, 2010). Rozdíl ve funkční charakterizaci spočívá zejména v rozdílech analyzovaného materiálu, protože rakovinové buňky jsou intenzivně se dělící, zatím co dělící buňky u kořene *Arabidopsis* tvoří jenom nepatrnou část.

4.3.1 Proteiny související s cytoskeletem

Proteiny jejichž abundance byla ovlivněna taxolem a které jsou strukturálními prvky cytoskeletu, anebo se podílejí na jeho regulaci, jsou uvedeny v Tab. 2. Tyto proteiny byly vybrány na základě jejich zařazení do GO kategorií GO:0007010 (cytoskeleton organization), GO:0030865 (cortical cytoskeleton organization), GO:0030036 (actin cytoskeleton organization), GO:0000226 (microtubule cytoskeleton organization). Důležitým poznatkem této analýzy je, že taxol významně změnil abundanci proteinů

spojených s aktinovým cytoskeletem. Mezi tyto proteiny patří např. aktin7 a aktin11, oba vykazovaly sníženou abundanci po taxolu.

Aktin7 byl detekován ve vyvíjejících se mladých rostlinných orgánech jako je hypokotyl, kotyledon, to naznačuje jeho důležitost pro vývoj těchto orgánů. Je také potřebný pro správný vývoj kořene (Gilliland *et al.*, 2003; McDowell *et al.*, 1996). Aktin11, nezbytný pro rostlinný vývoj, vykazuje vysokou aktivitu v rychle se prodlužujících tkáních a v pupenech. Hraje roli při vývoji embrya a endospermu (Huang *et al.*, 1997).

Zvýšená abundance po taxolu byla zaznamenána u proteinů profilin2 a villin2. Profilin2 se účastní polymerizace aktinových filament, je lokalizován v cytoplazmě v blízkosti ER (Wang *et al.*, 2009). Villin2 sdružuje aktinová vlákna do svazků, které jsou důležité pro růst buňky v různých buněčných orgánech (van der Honing *et al.*, 2012).

Tato data jsou důkazem úzkého propojení aktinového a mikrotubulového cytoskeletu. Z těchto důvodů byla dále studována také abundance aktinu a tubulinu v kořenech *Arabidopsis* po ovlivnění taxolem (kapitola 4.4) a abundance aktinu v mutantu *Arabidopsis der1-3*, který exprimuje nefunkční isovariantu aktin 2 (kapitola 4.5) pomocí imunoblotování.

Tab. 2: Proteiny se změněnou abundancí po ošetření taxolem mající souvislost s cytoskeletem podle klasifikace pomocí „Gene ontology annotation“. Změna abundance vyjadřuje poměr mezi abundancí proteinu v taxolem ovlivněném vzorku a kontrolním vzorku.

| SNÍŽENÁ ABUNDANCE | | |
|-------------------|---------------------------------|-----------------|
| Databázový kód | Název proteinu | Změna abundance |
| NP_196543.1 | actin-7 | 0,75 |
| NP_187818.1 | actin-11 | 0,62 |
| NP_178151.1 | ATPase katanin p60 | 0,65 |
| ZVÝŠENÁ ABUNDANCE | | |
| Databázový kód | Název proteinu | Změna abundance |
| NP_177729.1 | V-type proton ATPase subunit B1 | 1,6 |
| NP_198035.2 | threonyl-tRNA synthetase | 1,47 |
| NP_194664.1 | profilin 2 | 1,93 |
| NP_565958.1 | villin 2 | 10,03 |

4.3.2 Proteiny ovlivněné taxolem důležité pro membránový transport

Dalším záměrem byla predikce přítomnosti proteinů s transmembránovými doménami a vyhodnocení vlivu taxolu na proteiny membránového transportu. Membránový transport je úzce propojen s cytoskeletem, který je jeho klíčovým regulátorem (Šamaj *et al.*, 2006). Přítomnost transmembránové domény byla předpovězena na základě aminokyselinové sekvence pomocí aplikace DAS - Transmembrane Prediction server (<http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/>) u proteinů uvedených v Tab. 3. Tato doména upevňuje protein v membráně, takže proteiny obsahující transmembránovou doménu jsou lokalizovány na membránách, nebo interagují s membránami. Ovlivnění těchto proteinů může indikovat jejich propojení s cytoskeletálním (mikrotubulárním) systémem.

U některých z predikovaných proteinů byla již jejich membránová lokalizace experimentálně dokázána.

Luminal binding protein (BiP) nacházející se v lumen ER je nezbytný pro správné skládání proteinů a rozpoznání špatně složených nebo nesložených proteinů a zajištění jejich degradace, jde o molekulární chaperon s ATP-asovou aktivitou (Ma a Hendershot, 2004; Rothman 1989).

Proteiny ze skupiny RabE (RAB GTPase homolog E1b) se účastní transportu vezikul z Golgiho aparátu k cytoplazmatické membráně (Rutherford a Moore, 2002; Camacho *et al.*, 2009).

Protein SLY1 (SEC1 family transport protein SLY1) se podílí na transportu vezikul z ER do Golgiho komplexu (Peterson *et al.*, 1996). U živočichů se vyskytuje v cytoplazmě (Beer *et al.*, 2005).

Elongační faktor EF-1 umožňující posun aminoacyl-tRNA na ribozomu v průběhu proteosyntézy, obsahuje podjednotku A, což je G-protein a podjednotku B, která zajišťuje výměnu nukleotidu. Druhá jmenovaná podjednotka je tvořena proteinem EF-1B γ , která kromě výměny nukleotidu umožňuje správné prostorové uspořádání dalších proteinů v podjednotce B, její transport do cílových míst a připojení na cytoskeletální vlákna. Faktor se nachází v ER a v cytoplazmě (Le Sourd *et al.*, 2006).

Všechny popsané membránové proteiny měnily svou abundanci po ošetření taxolem, což indikuje, že stabilita mikrotubulů je důležitá pro jejich funkci ve spojení s membránovým transportem, stabilitou nebo signalizací. Tyto výsledky

ve všeobecnosti indikují, že stabilita mikrotubulů významně ovlivňuje membránový transport. Podobná zjištění byla publikována i v publikaci Chen *et al.* (2011).

Tab. 3: Proteiny s předpověděnou transmembránovou doménou, jejich databázový kód a poloha transmembránové domény v aminokyselinové sekvenci proteinu.

| SNÍŽENÁ ABUNDANCE | | |
|--------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|
| Databázový kód | Název proteinu | Poloha TMD v sekvenci AMK |
| NP_181715.1 | 40S ribosomal protein S2-3 | 189–192 |
| NP_171821.1 | aspartyl protease-like protein | 58–71 |
| NP_568808.1 | universal stress protein PHOS32 | 131–138; 248–251 |
| BAA12348.1 | luminal binding protein (BiP) | 60–74; 477–483 |
| NP_568125.1 | monodehydroascorbate reductase (NADH) | 316–319 |
| NP_187818.1 | actin-11 | 169–173; 377–379 |
| NP_974269.1 | adenosine kinase 1 | 38–41; 168–169 |
| NP_001030712.1 | JA-responsive protein 1 | 137–138; 182–186; 291–292 |
| NP_198206.1 | Luminal-binding protein 1 | 56–71; 474–479 |
| NP_851119.1 | Luminal-binding protein 2 | 56–70; 473–479 |
| NP_178073.1 | phosphoglycerate kinase | 266–273 |
| NP_178299.1 | DNAse I-like superfamily protein | 215–222 |
| NP_196543.1 | actin 7 | 168–173; 377–379 |
| NP_190861.1 | fructose-bisphosphate aldolase | 120–122; 313–317 |
| AAM61686.1 | adenylosuccinate synthetase | 376 |
| NP_190894.1 | phenylalanine ammonia-lyase 2 | 337–340; 566–569 |
| NP_568781.1 | thylakoid lumenal protein 2 | 105–117 |
| NP_176802.1 | beta-glucosidase 22 | 48–63; 194 |

| ZVÝŠENÁ ABUNDANCE | | |
|--------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|
| Databázový kód | Název proteinu | Poloha TMD v sekvenci AMK |
| NP_567346.1 | nucleoside diphosphate kinase 1 | 55–64; 137–142 |
| NP_195504.2 | heat shock protein 70-1 | 477–485 |
| NP_178140.1 | cytochrome c oxidase subunit 5b-2 | 101–102 |
| NP_001118718.1 | succinate dehydrogenase | 76–80 |
| NP_850541.1 | ADP,ATP carrier protein 1 | 246–248; 302–309; 337–341 |
| NP_565958.1 | villin 2 | 259–262 |
| NP_191274.1 | putative pseudouridine synthase NAP57 | 278–288 |
| NP_182103.1 | phosphomannomutase | 53 |
| NP_001031305.1 | heat shock protein 91 | 183–185 |
| NP_188713.1 | protein ethylene insensitive 3 | 241–242 |
| NP_193769.1 | RAB GTPase homolog E1b | 143–148; 286–287; 490 |
| NP_001030914.1 | autophagy protein 6 | 343–353 |
| NP_001031202.1 | elongation factor EF-1 gamma subunit | 53–56; 212–221; 223 |

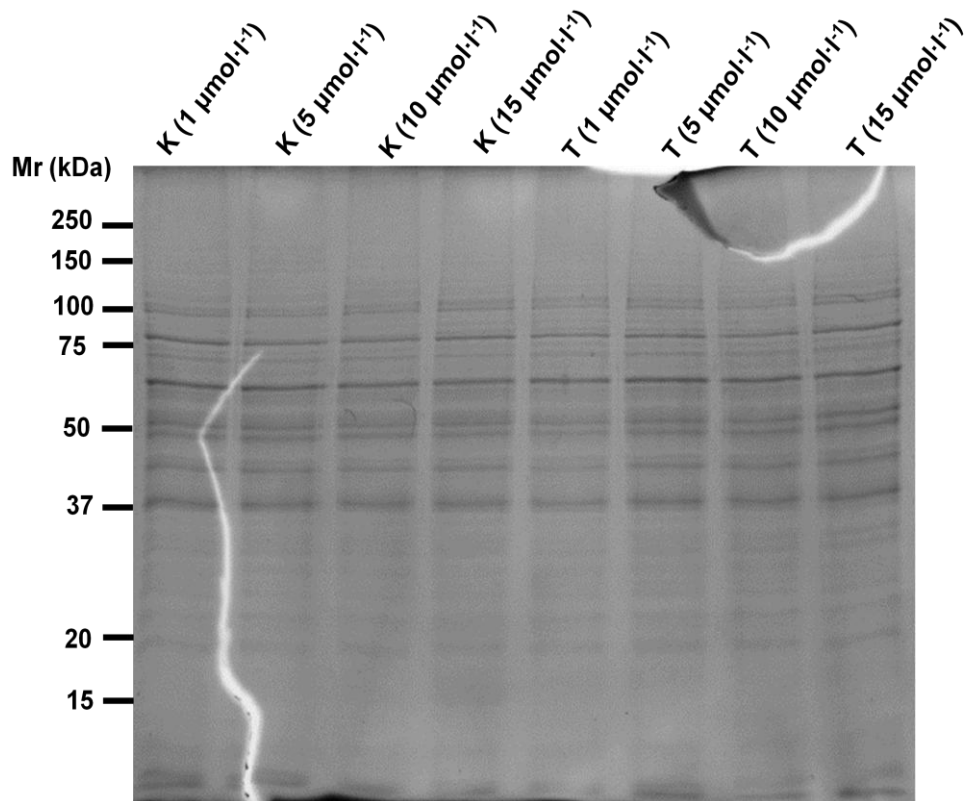
Tab. 3: Proteiny s předpověděnou transmembránovou doménou, jejich databázový kód a poloha transmembránové domény v aminokyselinové sekvenci proteinu. (*pokračování*).

| | | |
|-------------|--|------------------|
| AAM12985.1 | enolase (2-phospho-D-glycerate hydroylase) | 176–184 |
| NP_201477.1 | succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit 1 | 527–528 |
| NP_193224.1 | O-acetylserine (thiol) lyase (OAS-TL) isoform A1 | 171–177 |
| NP_190861.1 | fructose-bisphosphate aldolase | 120–122; 313–317 |
| NP_179389.1 | SEC1 family transport protein SLY1 | 236–249 |
| AAF02837.1 | AC009894_8 elongation factor EF-2 | 177 |
| AED92487.1 | 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase | 244–250 |
| NP_188876.1 | alternative oxidase 1A | 291–302 |
| NP_195252.1 | Isocitrate dehydrogenase [NAD] regulatory subunit 1 | 382–383 |

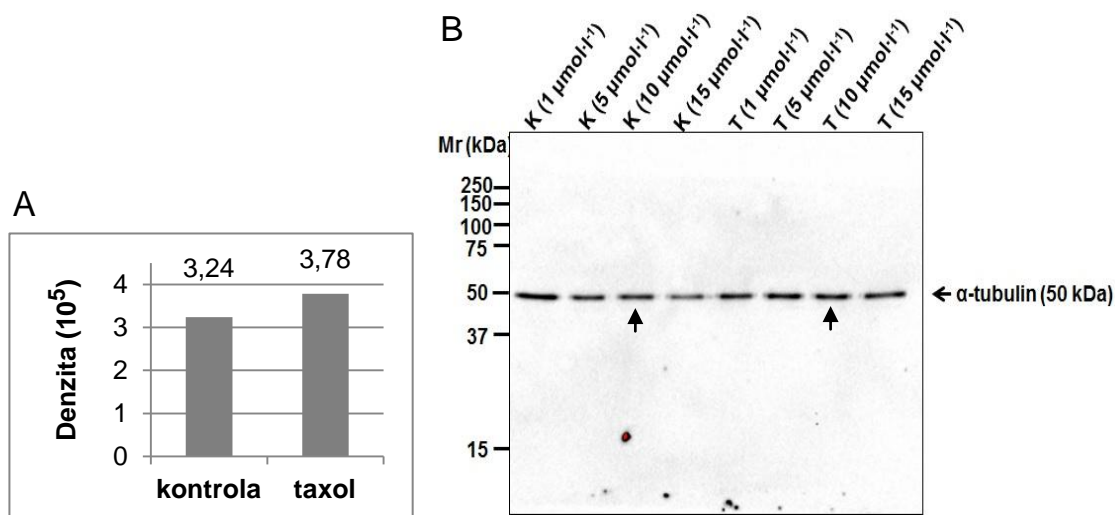
4.4 ANALÝZA VLIVU TAXOLU NA ABUNDANCI α -, β -TUBULINU, AKTINU A PROFILINU (IMUNOBLOTOVÁNÍ)

Validace proteomických dat je nevyhnutnou částí proteomické analýzy z důvodu komplexnosti (složitosti) metodického postupu a vysoké variability mezi technickými a biologickými replikami (Takáč a Šamaj, 2015). Pro validaci změny abundance aktinu a profilinu po ovlivnění taxolem a také pro zjištění abundance α -tubulinu a β -tubulinu byla použita metoda imunoblotování pomocí primárních protilátek. Abundance těchto proteinů byla analyzována po vlivu různých koncentrací taxolu (pro aktin a tubulin) a po $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ koncentraci pro profilin. Pro kvantifikaci signálu proteinů po imunoblotování byly vybrány vzorky kořenů ovlivněné taxolem/DMSO v koncentraci $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ protože stejná koncentrace byla použita pro proteomickou analýzu. Na gely bylo aplikováno identické množství proteinů z každého vzorku. Kontrola dávkování vzorků na gel byla provedena barvením gelů pomocí Colloidal Coomassie barviva (Obr. 20).

U proteinu α -tubulin bylo po 2 h působení taxolu ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) zaznamenáno mírné zvýšení abundance (Obr. 21) v porovnání s kontrolou. Stejná situace nastala i u β -tubulinu (Obr. 22). Abundance aktinu se po 2 h působení taxolu ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) významně nezměnila (Obr. 23).

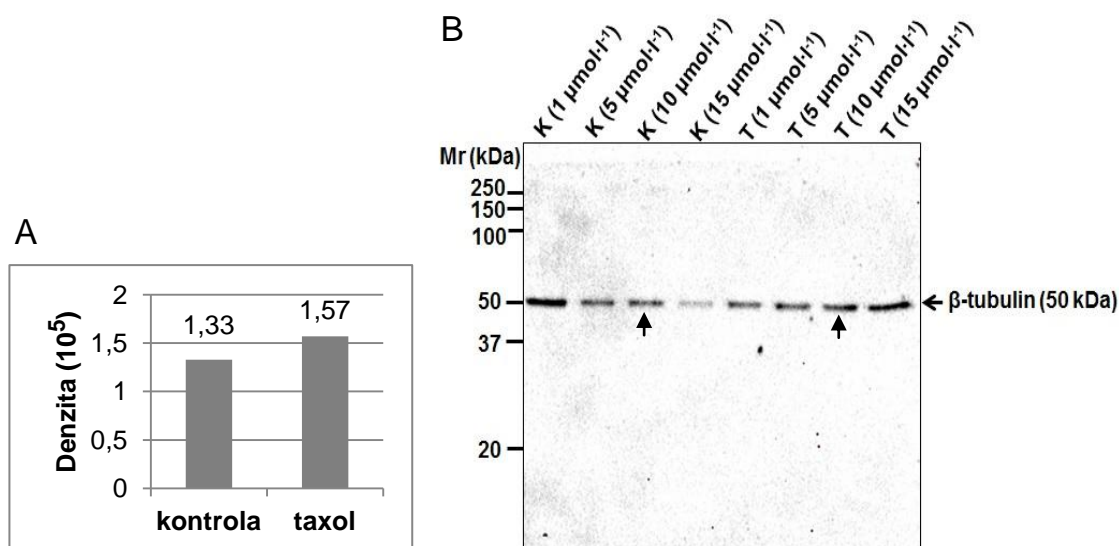


Obr. 20: Kontrola dávkování vzorků na gel. Po SDS PAGE byl gel barven Colloidal Coomassie barvivem. Kontrolní (K) a taxolem ovlivněné (T) kořeny *Arabidopsis*. Stáří rostlin 14 d, ovlivňování taxolem/DMSO 2 h v koncentracích uvedených v závorkách.

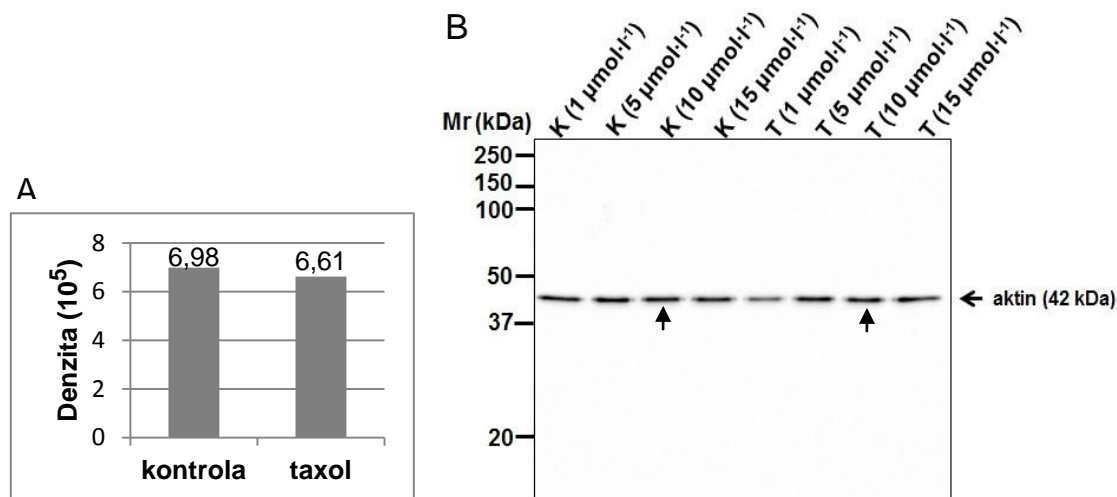


Obr. 21: Porovnání abundance α -tubulinu mezi kontrolními (K) a taxolem ovlivněnými (T) kořeny *Arabidopsis*. Naměřené denzity bandů α -tubulinu (A) u vzorků ovlivněných taxolem/DMSO v koncentraci $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (B, znázorněno šipkami). Reprezentativní membrána z imunoblotování s bandy α -tubulinu (B). Stáří rostlin 14 d, ovlivňování taxolem/DMSO 2 h.

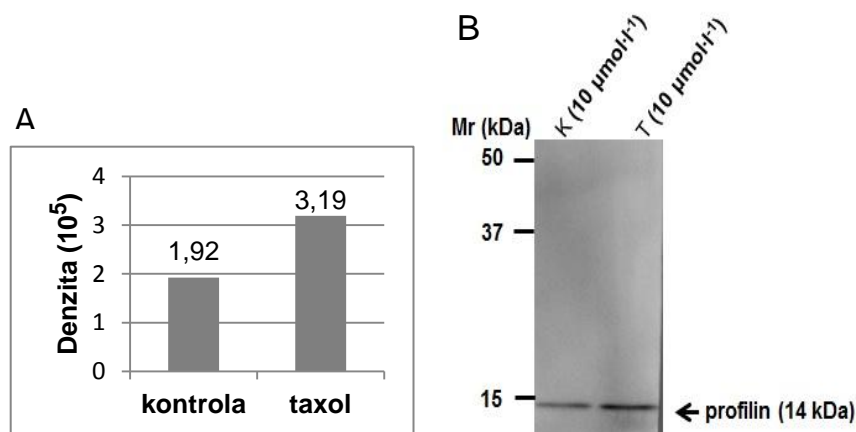
Zvýšené abundance tubulinových proteinů po aplikaci taxolu jsou v souladu s výsledky v publikaci Baluška *et al.* (1997). Taxol zabraňuje depolymerizaci mikrotubulů. Zvýšenou hladinu tubulinů po aplikaci taxolu je možno vysvětlit mechanismem autoregulace hladiny volných tubulinů. Mezi hladinou volných a do mikrotubulů zabudovaných tubulinů existuje rovnováha (Bao *et al.*, 2001). Snížená hladina volných tubulinů vede ke stabilizaci tubulinových mRNA a tím k rapidnímu zvýšení tvorby tubulinů. A naopak zvýšená hladina volných tubulinů vyvolaná látkami způsobujícími depolymerizaci mikrotubulů (např. kolchicin) destabilizuje tubulinové mRNA a snižuje tvorbu tubulinů (Cleveland *et al.*, 1981; Barlow *et al.*, 2002). Tímto je možné vysvětlit mírné zvýšení abundancí tubulinů po taxolu. Nguyen *et al.* (1999) pozorovali zvýšenou abundanci tubulinů po ovlivnění taxolem u buněk HeLa, což je v souladu s výše uvedenou hypotézou autoregulace. Stejně výsledky publikovali Stargell *et al.* (1992) u buněk prvoků.



Obr. 22: Porovnání abundance β -tubulinu mezi kontrolními (K) a taxolem ovlivněnými (T) kořeny *Arabidopsis*. Naměřené denzity bandů β -tubulinu (A) u vzorků ovlivněných taxolem/DMSO v koncentraci $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (B, znázorněno šipkami). Reprezentativní membrána z imunoblotování s bandy β -tubulinu (B). Stáří rostlin 14 d, ovlivňování taxolem/DMSO 2 h.



Obr. 23: Porovnání abundance aktinu mezi kontrolními (K) a taxolem ovlivněnými (T) kořeny *Arabidopsis*. Naměřené denzity bandů aktinu (A) u vzorků ovlivněných taxolem/DMSO v koncentraci $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (B, znázorněno šipkami). Reprezentativní membrána z imunoblotování s bandy aktinu (B). Stáří rostlin 14 d, ovlivňování taxolem/DMSO 2 h.



Obr. 24: Porovnání abundance profilinu mezi kontrolními (K) a taxolem ovlivněnými (T) kořeny *Arabidopsis*. Naměřené denzity bandů profilinu (A) u vzorků ovlivněných taxolem/DMSO v koncentraci $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (B, znázorněno šipkami). Reprezentativní membrána z imunoblotování s bandy profilinu (B). Stáří rostlin 14 d, ovlivňování taxolem/DMSO 2 h.

Mírně snížená abundance aktinu koresponduje s výsledky proteomické analýzy vlivu taxolu na kořeny *Arabidopsis* (Kap. 4.3; Tab. 13 a 14). Porucha správné funkce mikrotubulů nebo zvýšená abundance tubulinů může vést ke zvýšené tvorbě aktinových filament. Na zvýšenou tvorbu aktinových filament může poukazovat i zvýšená abundance profilinu po aplikaci taxolu (Obr. 24). Tento protein zajišťuje polymerizaci aktinových filament tím, že vyměňuje ADP za ATP na aktinových proteinech a aktivuje je (Ahern-Djamali *et al.*, 1999). Zvýšená abundance profilinu v kořenech *Arabidopsis*

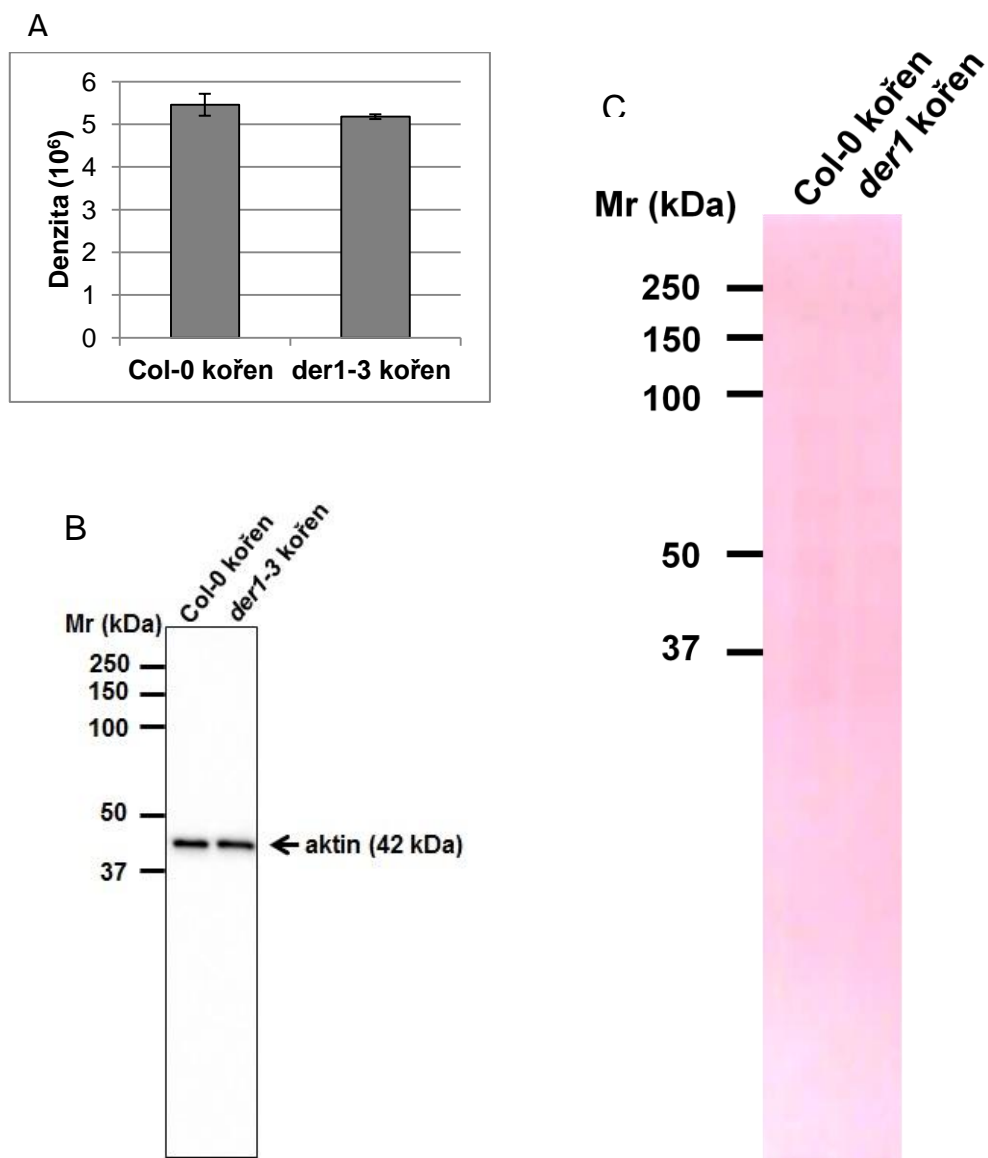
po vlivu taxolu byla zjištěná imunoblotováním potvrdila data získaná proteomickou analýzou, které jsou uvedeny v příloze (Tab. 13 a 14).

Z výsledků experimentu vyplývá, že inhibitor mikrotubulů taxol vyvolává kromě zvýšení abundance tubulinů, také změny abundance aktinových proteinů profilinu a aktinu a to poukazuje na propojení aktinového a tubulinového cytoskeletu.

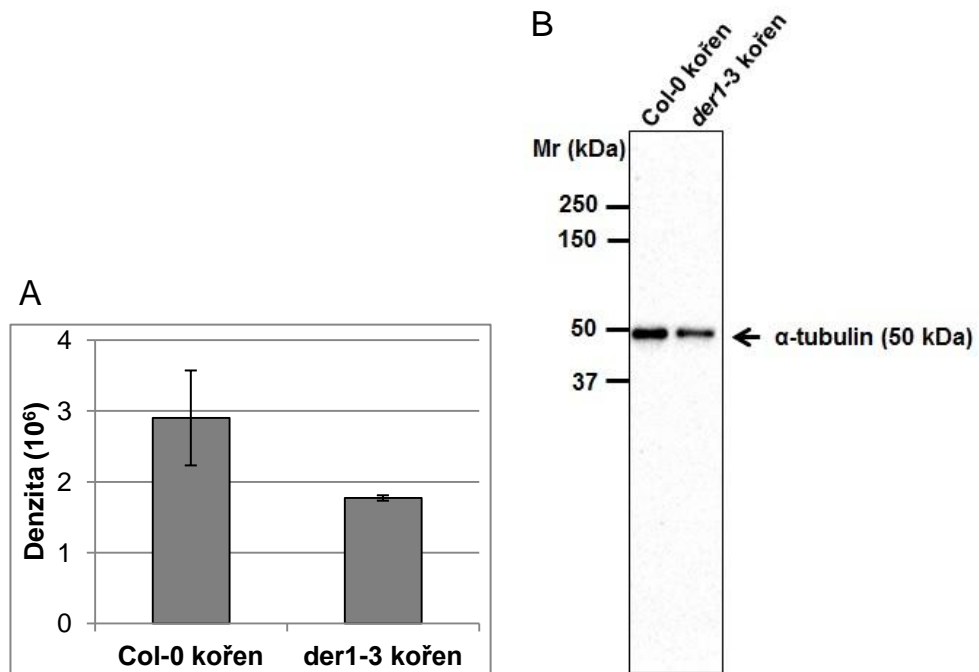
4.5 ANALÝZA ABUNDANCE α -, β -TUBULINU A AKTINU U MUTANTA *der1-3*

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, zda ztráta funkce isovarianty aktin2 může mít vliv na abundanci tubulinů v kořenech *Arabidopsis*. Mutant *Arabidopsis der1-3* vytváří nefunkční isovariantu aktin2 (Ringli *et al.*, 2002). Analýza abundance aktinu v kořenech mutantu *der1-3* ukázala pouze malé změny v porovnání s abundancí v kořenu *Arabidopsis Col-0* (Obr. 25), což je v souladu s Ringli *et al.* (2002), kde zjistili, že exprese isovarianty aktin2 v *der1* mutantu je stejná jako v netransgenním typu. Pro kontrolu dávkování vzorku na gel byla membrána po přenosu barvena barvivem Ponceau S (Obr. 25C), pro analýzu α -tubulinu i β -tubulinu byly nanесeny stejné obsahy proteinů.

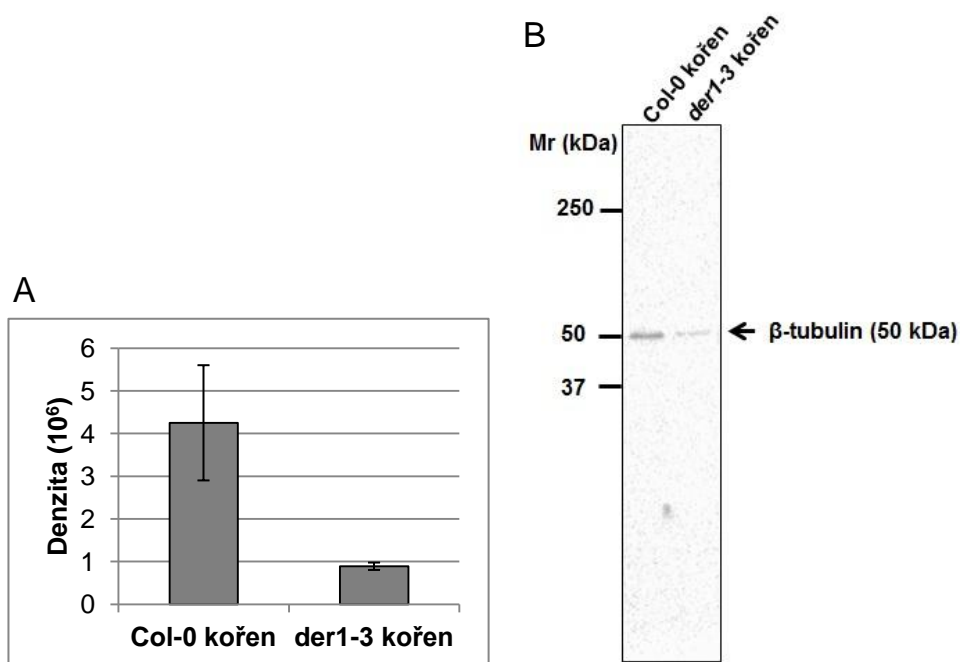
Abundance α -tubulinu i β -tubulinu byla u mutantu *der1-3* výrazně snížena (Obr. 26, 27). Z tohoto experimentu vyplývá, že aktin2 ovlivňuje abundanci α - a β -tubulinu. Je pravděpodobné, že aktin2 působí na rovnováhu mezi syntézou a degradací tubulinů.



Obr. 25: Porovnání abundance aktinu mezi kořeny *Arabidopsis* Col-0 a kořeny mutanta *Arabidopsis* der1-3. Naměřené denzity bandů aktinu (A). Repräsentativní membrána z imunoblotování s bandy aktinu (B), membrána po transferu barvena barvivem Ponceau S pro kontrolu dávkování vzorků (C). Stáří rostlin 14 d.



Obr. 26: Porovnání abundance α -tubulinu mezi kořeny *Arabidopsis* Col-0 a kořeny mutantu *Arabidopsis der1-3*. Naměřené denzity bandů α -tubulinu (A). Repräsentativní membrána z imunoblotování s bandy α -tubulinu (B). Stáří rostlin 14 d.



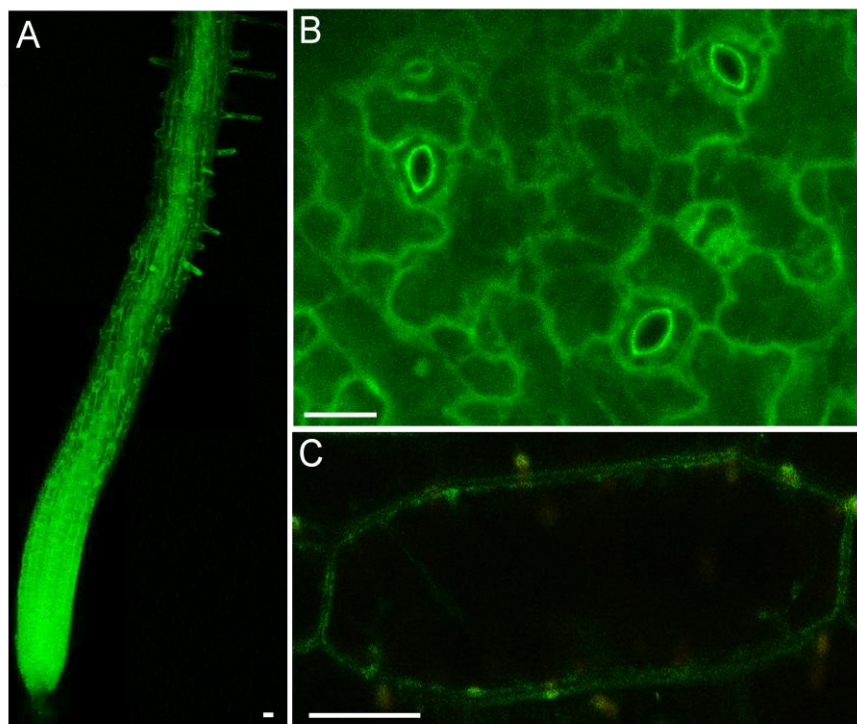
Obr. 27: Porovnání abundance β -tubulinu mezi kořeny *Arabidopsis* Col-0 a kořeny mutantu *Arabidopsis der1-3*. Naměřené denzity bandů β -tubulinu (A). Repräsentativní membrána z imunoblotování s bandy β -tubulinu (B). Stáří rostlin 14 d.

4.6 POZOROVÁNÍ LOKALIZACE BECLIN 1, SEC14p

Proteiny Beclin 1 (At3g61710) a Sec14p (At1g75170) byly identifikovány proteomickou analýzou jako proteiny se zvýšenou abundancí po vlivu taxolu na kořeny *Arabidopsis*. Je známo, že oba tyto proteiny jsou důležité pro membránový transport (Bankaitis *et al.*, 2010; Qin *et al.*, 2007). Senzitivita vůči taxolu může indikovat jejich roli v interakci mezi cytoskeletem a membránovým transportem. Jejich zvýšená abundance indikuje také jejich možnou akumulaci a zvýšenou potřebu pro vitální membránový transport, nebo inhibici jejich degradace. Proto byly vybrány pro další detailní studium a byla validována jejich abundance v kořenech *Arabidopsis* mikroskopickým pozorováním *in vivo*.

Beclin 1

Nejprve byla u transgenních rostlin *Arabidopsis* nesoucích GFP fuzní konstrukt s proteiny Beclin 1 a Sec14p pod nativním promotorem vyhodnocena lokalizace těchto proteinů podle intenzity a umístění fluorescenčního signálu pozorovaného konfokálním laserovým skenovacím mikroskopem.



Obr. 28: Lokalizace proteinu Beclin 1 (zeleně) v kořenu, kořenové špičce a v kořenových vláscích (A), v buňkách kotyledonu a průduchových buňkách (B) a v buňce hypokotylu (C) u transgenních rostlin *Arabidopsis* (stáří 5 d) s konstruktem Beclin 1-GFP. Měřítka 20 μm . Projekce všech snímaných fokálních rovin v jednom snímku (A, B) a jedné fokální roviny (C).

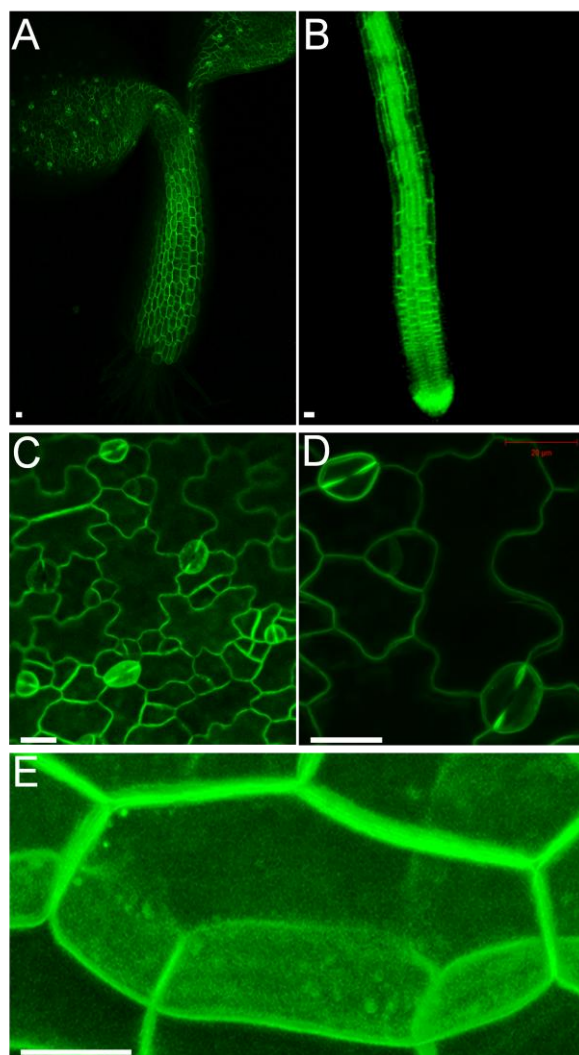
Protein Beclin 1 byl lokalizován v cytoplasmě buněk kořene (Obr. 28A, 30). Fluorescenční signál byl pozorován po celé délce kořene, nejvíce v kořenové špičce. Beclin 1 se také vyskytoval v kořenových vláscích (Obr. 28A). Intenzita fluorescence byla větší v kratších rostoucích kořenových vláscích než v delších vláscích. Beclin 1 je protein který je nezbytný pro klíčení a růst pylového zrna (Harrison-Lowe a Olsen, 2008; Fujiki *et al.*, 2007). Toto mikroskopické pozorování naznačuje jeho možnou roli v růstu kořenových vlásků, což je stejně jako růst pylového zrna, polarizovaný proces.

V cytoplasmě buněk hypokotylu a kotyledonů byla pozorována difuzní lokalizace proteinu Beclin 1 (Obr. 28B, C).

Sec14p

Bylo zjištěno, že Sec14p je lokalizován v kotyledonech a hypokotylech (Obr. 29A) a také v kořenech (Obr. 29B) rostlin *Arabidopsis thaliana*. Subcelulárně se Sec14p vyskytuje v plazmatické membráně a v cytoplasmě buněk kotyledonů (Obr. 29C), hypokotylu (Obr. 29E) a kořene (Obr. 32). V rámci kořene byla pozorována nejvyšší fluorescence v kořenové špičce a čepičce. Signál fluorescence Sec14p-GFP byl nejvýraznější v hypokotylu a v kotyledonech. Výrazný fluorescenční signál byl také pozorován v plazmatické membráně a cytoplasmě průduchových buněk (Obr. 29D). Na Obr. 29D je také pozorovatelná zvýšená lokalizace Sec14p v uzavřených svěracích buňkách průduchů oproti otevřeným svěracím buňkám.

Proteiny skupiny Sec14 jsou nezbytné pro transport fosfatidylinositolu (Bankaitis *et al.*, 2010). Fosfatidylinositol se podílí na uzavírání průduchů a snížení jeho koncentrace ve svěracích buňkách vede ke zpomalení uzavírání průduchové štěrbin (Jung *et al.*, 2002). Tímto mechanismem je možné vysvětlit přítomnost Sec14p ve svěracích buňkách a jeho zvýšené množství v uzavřených průduších.



Obr. 29: Lokalizace proteinu Sec14p (zeleně) v hypocotylu a v kotyledonu (A), v kořenu a kořenové čepičce a špičce (B), v buňkách kotyledonu a v průduších (C, D) a v buňce hypocotylu (E) u transgenních rostlin (stáří 5 d) *Arabidopsis* s konstruktem Sec14-GFP. Měřítka 20 μm . Projekce všech snímaných fokálních rovin v jednom snímku.

4.7 MIKROSKOPICKÉ POZOROVÁNÍ VLIVU TAXOLU NA ABUNDANCI PROTEINŮ BECLIN 1 A SEC14p

Vliv taxolu na abundanci proteinů Beclin1 a Sec14p byl pozorován konfokálním laserovým skenovacím mikroskopem na základě změny intenzity fluorescence v buňkách transgenních rostlin *Arabidopsis* nesoucích GFP fuzní konstrukt s proteiny Beclin 1 a Sec14p (pod kontrolou s nativního promotoru) po ošetření taxolem.

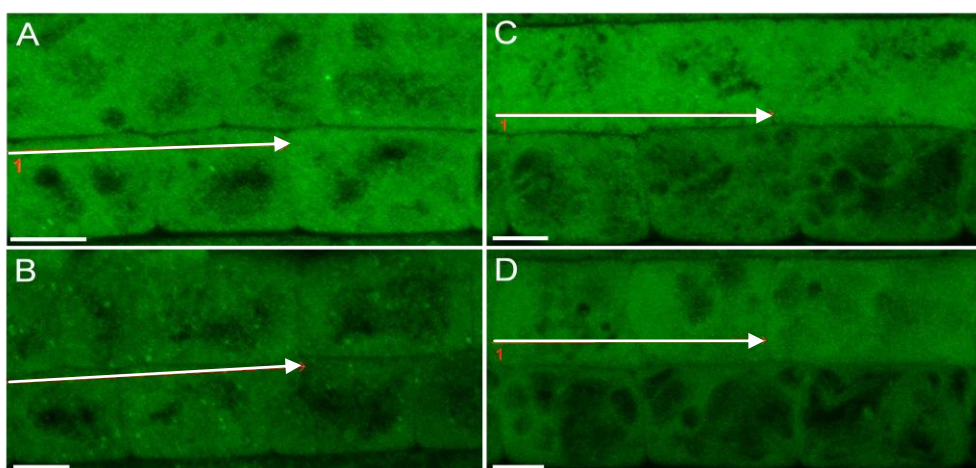
Beclin 1

U transgenních rostlin *Arabidopsis* nesoucích GFP fuzní konstrukt s proteinem Beclin 1 pod nativním promotorem poklesla intenzita fluorescence po 2 h působení taxolu (Obr. 30, 31). Pokles intenzity fluorescence ale nebyl signifikantní. Tyto výsledky

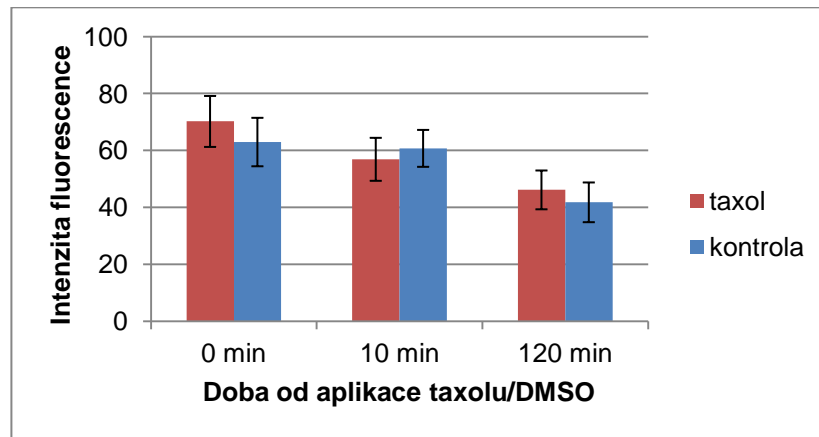
naznačují že taxol mírně snižuje nebo neovlivňuje abundanci Beclin 1, což by bylo v rozporu s výsledky proteomické analýzy vyhodnocené v rámci této práce (Kap. 4.3). Je potřeba poznamenat, že pozorování intenzity fluorescence Beclin1-GFP proběhlo jen ve dvou rhizodermálních buňkách kořene v elongační zóně, přičemž proteomická data vznikla analýzou celého kořenu. Z tohoto důvodu by bylo vhodné validaci provést jinou metodou, např. imunoblotováním, což se v průběhu experimentální práce nepodařilo úspěšně uskutečnit, z důvodu nemožnosti detekce signálu GFP na blotovacích membránách.

Sec14p

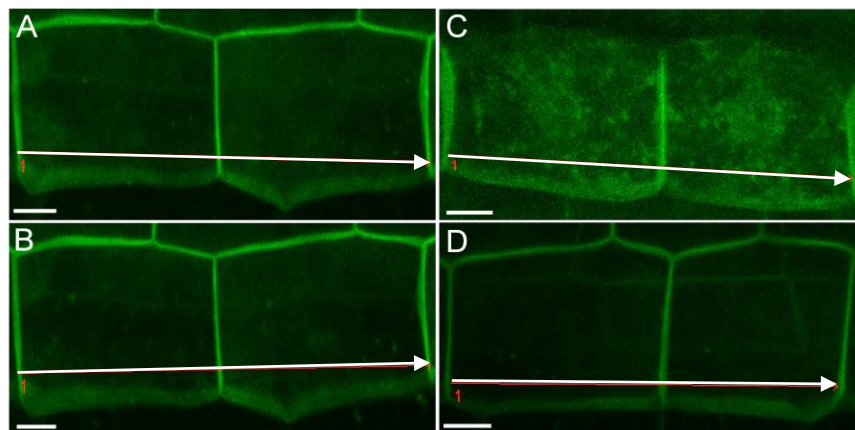
U transgenních rostlin *Arabidopsis* nesoucích GFP fuzní konstrukt s proteinem Sec14p pod nativním promotorem poklesla intenzita fluorescence po 2 h působení taxolu (Obr. 32, 33). Pokles intenzity by znamenal, že taxol snižuje abundanci proteinu Sec14p, což by bylo v rozporu s výsledky proteomické analýzy vyhodnocené v rámci této práce (Kap. 4.3). Snižovaná abundanca tohoto proteinu však byla zaznamenána i po 2 h působení DMSO u kontrolních vzorků (Obr. 32, 33), proto zaznamenaný pokles abundance není možné jednoznačně přičíst účinkům taxolu. Vysvětlení poklesu abundance v tomto experimentu může být takové, že GFP fuzní konstrukt s proteinem Sec14p není stabilní. Stabilita nebo tvorba může být narušena účinkem DMSO, popř. účinkem laserových paprsků mikroskopu.



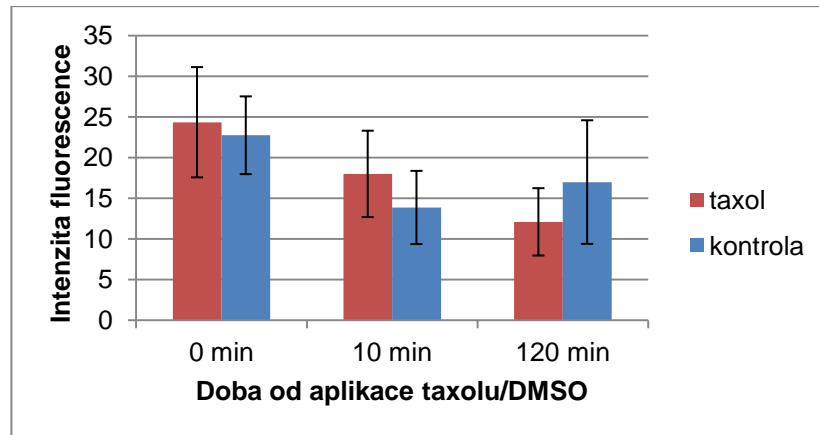
Obr. 30: Porovnání abundance proteinu Beclin 1 (zeleně) u kořenových buněk transgenní rostliny *Arabidopsis* s konstruktem Beclin 1-GFP mezi kontrolní rostlinou před aplikací DMSO (A), po 2 h působení DMSO (B) a taxolem ovlivňovanou rostlinou před aplikací taxolu (C) a po 2 h působení taxolu (D). Bílé šipky znázorňují místa měření intenzity signálu v programu Zen. Stáří rostlin je 5 d. Měřítka 10 μ m. Projekce všech snímaných fokálních rovin v jednom snímku.



Obr. 31: Porovnání abundance (intenzit fluorescenčního signálu) proteinu Beclin 1 u kořenových buněk transgenní rostliny *Arabidopsis* s konstruktem Beclin 1-GFP mezi kontrolní rostlinou a taxolem ovlivňovanou rostlinou před aplikací taxolu/DMSO, 10 min a 120 min po aplikaci.



Obr. 32: Porovnání abundance proteinu Sec14p (zeleně) u kořenových buněk transgenní rostliny *Arabidopsis* s konstruktem Sec14p-GFP mezi kontrolní rostlinou před aplikací DMSO (A), po 2 h působení DMSO (B) a taxolem ovlivňovanou rostlinou před aplikací taxolu (C) a po 2 h působení taxolu (D). Bílé šipky znázorňují místa měření abundance v programu Zen. Stáří rostlin je 5 d. Měřítko 10 μ m. Projekce všech snímaných fokálních rovin v jednom snímku.



Obr. 33: Porovnání abundance (intenzit fluorescenčního signálu) proteinu Sec14p u kořenových buněk transgenní rostliny *Arabidopsis* s konstruktem Sec14p-GFP mezi kontrolní rostlinou a taxolem ovlivňovanou rostlinou před aplikací taxolu/DMSO, 10 min a 120 min po aplikaci.

5 ZÁVĚR

V teoretické části této práce byla vypracována literární rešerše na téma rostlinný cytoskelet s důrazem na charakterizaci mikrotubulů, jejich struktury, mechanismu výstavby, organizaci v buňce a vlastností. Pozornost byla věnována i charakterizaci taxolu a jeho vlivu na růst rostlin, popisu využití a metod provedení proteomické analýzy se zaměřením na již provedené a publikované proteomické analýzy vlivu taxolu.

V experimentální části práce byl pozorován vliv taxolu na fenotyp kořenů *Arabidopsis thaliana*, na délku primárních kořenů, délku a počet postranních kořenů a kořenových vlásků, šířku kořenů a vliv taxolu na odpověď na gravistimulaci primárních kořenů.

Nejdůležitějším závěrem této fenotypové analýzy byla kromě negativního vlivu taxolu na růst primárního kořenu hlavně inhibice tvorby a růstu postranních kořenů a narušení gravitropismu *Arabidopsis*.

Byl také sledován vliv taxolu na dynamiku mikrotubulů pomocí konfokálního laserového mikroskopu. Dále bylo provedeno vyhodnocení proteomické analýzy vlivu taxolu na kořeny *Arabidopsis thaliana*. Toto vyhodnocení ukázalo zejména změnu abundance u proteinů majících souvislost s aktinovým cytoskeletem, což bylo validováno i imunoblotováním. Pro další sledování a potvrzení této souvislosti byla analyzována abundance α -, β -tubulinu a aktinu u mutanta *Arabidopsis der1-3*, který tvoří nefunkční isovariantu aktin2. Aktin2 významně ovlivňuje rovnováhu mezi syntézou a degradací tubulinů. Z výsledků proteomické analýzy byly vybrány proteiny Beclin 1, Sec14p a profilin, jejichž změna abundance po ošetření taxolem byla dále ověřována a sledována. Pro sledování změny abundance profilinu a také α -, β -tubulinu a aktinu po ošetření taxolem byla použita metoda imunoblotování. Pro zjištění vlivu taxolu na abundanci proteinů Beclin 1 a Sec14p bylo použito pozorování intenzity fluorescence konstruktů těchto proteinů s GFP pod nativním promotorem konfokálním laserovým skenovacím mikroskopem *in vivo*. Beclin 1 je lokalizován v cytoplazmě, přičemž Sec14p se kromě cytoplazmy nachází i v plazmatické membráně. Abundance Sec14p je závislá na taxolu, přičemž mikroskopie ukázala že Beclin 1 svou abundanci po taxole neměnil.

Výsledky získané v této bakalářské práci přispěly k lepšímu pochopení funkce mikrotubulů, jejich vlivu na membránový transport a k důkazu propojení aktinového cytoskeletu a mikrotubulů.

6 LITERATURA

- Abu-Abied M., Rogovoy O., Mordehaev I., Grumberg M., Elbaum R., Wasteneys G.O., Sadot E. (2015): Dissecting the contribution of microtubule behaviour in adventitious root induction. *Journal of Experimental Botany* doi:10.1093/jxb/erv097
- Ahern-Djamali S.M., Bachmann C., Hua P., Reddy S.K., Kastenmeier A.S., Walter U., Hoffmann F.M. (1999): Identification of profilin and src homology 3 domains as binding partners for *Drosophila* enabled. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**, 4977–4982.
- Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2001): *Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky*. 1. vydání, Espero Publishing, Ústí nad Labem, Česká republika, 630 stran.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2008): *Molecular biology of the cell*. 5th ed., Garland Science, New York, USA, 1601 stran.
- Andreu J.M., Diaz J.F., Gil R., de Pereda J.M., Garcia de Lacoba M., Peyrot V., Briand C., Towns-Andrews E., Bordas J. (1994): Solution structure of Taxotere-induced microtubules to 3 nm resolution. The change in protofilament number is linked to the binding of the taxol side chain. *The Journal of Biological Chemistry* **269**, 31785–31792.
- Aramemnon home page: <http://aramemnon.uni-koeln.de/> (21. 4. 2015).
- Ashburner M., Ball C.A., Blake J.A., Botstein D., Butler H., Cherry J.M., Davis A.P., Dolinski K., Dwight S.S., Eppig J.T., Harris M.A., Hill D.P., Issel-Tarver L., Kasarskis A., Lewis S., Matese J.C., Richardson J.E., Ringwald M., Rubin G.M., Sherlock G. (2000). Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genetics* **25**, 25–29.
- Baluška F., Šamaj J., Volkmann D., Barlow P.W. (1997): Impact of taxol-mediated stabilization of microtubules on nuclear morphology, ploidy levels and cell growth in maize roots. *Biology of the Cell* **89**, 221–231.
- Bankaitis V.A., Mousley C.J., Schaaf G. (2010): The Sec14 superfamily and mechanisms for crosstalk between lipid metabolism and lipid signaling. *Trends in Biochemical Sciences* **35**, 150–160.
- Bao C., Wang J., Zhang R., Zhang B., Zhang H., Zhou Y., Huang S. (2012): Arabidopsis VILLIN2 and VILLIN3 act redundantly in sclerenchyma development via bundling of actin filaments. *The Plant Journal* **71**, 962–975.
- Bao Y., Kost B., Chua N.H. (2001): Reduced expression of alpha-tubulin genes in Arabidopsis thaliana specifically affects root growth and morphology, root hair development and root gravitropism. *The Plant* **28**, 145–157.
- Barlow S.B. Gonzalez-Garay M.L., Cabral F. (2002): Paclitaxel-dependent mutants have severely reduced microtubule assembly and reduced tubulin synthesis. *Journal of Cell Science* **115**, 3469–3478.
- Baskin T.I., Wilson J.E., Cork A., Williamson R.E. (1994): Morphology and microtubule organization in Arabidopsis roots exposed to oryzalin or taxol. *Plant Cell Physiology* **35**, 935–942.
- Beer S., Scheikl T., Reis B., Hüser N., Pfeffer K., Holzmann B. (2005): Impaired immune responses and prolonged allograft survival in Sly1 mutant mice. *Molecular and Cellular Biology* **25**, 9646–9660.
- Bektaş M., Nurtn R., Gürel Z., Sayers Z., Bermek E. (1994): Interactions of eukaryotic elongation factor 2 with actin: a possible link between protein synthetic machinery and cytoskeleton. *FEBS Letters* **356**, 89–93.
- Bibikova T.N., Blancaflor E.B., Gilroy S. (1999): Microtubules regulate tip growth and orientation in root hairs of Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal* **17**, 657–665.
- Bradford M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dya binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248–254.
- Buljan V., Yeung S., Rushdi S., Delikatny J., Hambly B. (2001): Mercury and cadmium effects on microtubule polymerisation and depolymerisation. *Biophysical Journal* **80**, 99.
- Bull V.H., Fargestad E.M., Strozynski M., Thiede B. (2010): Temporal proteome profiling of taxol-induced mitotic arrest and apoptosis. *Electrophoresis* **31**, 1873–1885.

- Buschmann H., Lloyd C.W. (2008): Arabidopsis mutants and the network of microtubule associated functions. *Molecular Plant* **1**, 888–898.
- Camacho L., Smertenko A.P., Pérez-Gómez J., Hussey P.J., Moore I. (2009): Arabidopsis Rab E GTPases exhibit a novel interaction with a plasma-membrane phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase. *Journal of Cell Science* **122**, 4383–4392.
- Casimiro I., Marchant A., Bhalerao R.P., Beeckman T., Dhooge S., Swarup R., Graham N., Inzé D., Sandberg G., Casero P.J., Bennett M. (2001): Auxin transport promotes Arabidopsis lateral root initiation. *The Plant Cell* **13**, 843–852.
- Clark G.B., Morgan R.O., Fernandez M.P., Roux S.J. (2012): Evolutionary adaptation of plant annexins has diversified their molecular interactions and functional roles. *New Phytologist* **196**, 695–712.
- Cleveland D. W., Lopata M. A., Sherline P., Kirschner M. W. (1981): Unpolymerized tubulin modulates the level of tubulin mRNAs. *The Cell* **25**, 537–546.
- Cobo F. (2013): Application of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical virology: A review. *The Open Virology Journal* **7**, 84–90.
- Conesa A., Götz S. (2008): Blast2GO: A comprehensive suite for functional analysis in plant genomics. *International Journal of Plant Genomics* **2008**:619832 <http://dx.doi.org/10.1155/2008/619832>
- Cserző M., Wallin E., Simon I., von Heijne G., Elofsson A. (1997): Prediction of transmembrane alpha-helices in procariotic membrane proteins: the Dense Alignment Surface method. *Protein Engineering* **10**, 673–676.
- Curwin A.J., Fairn G.D., McMaster C.R. (2009): Phospholipid transfer protein Sec14 is required for trafficking from endosomes and regulates distinct trans-Golgi export pathways. *The Journal of Biological Chemistry* **284**, 7364–7375.
- Cyr R.J., Palevitz B.A. (1995): Organization of cortical microtubules in plant cells. *Current Opinion in Cell Biology* **7**, 65–71.
- Černý, M., Skalák, J., Cerna, H., Brzobohatý, B. (2013): Advances in purification and separation of posttranslationally modified proteins. *Journal of Proteomics* **92**, 2–27.
- DAS - Transmembrane Prediction server home page: <http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/> (21. 4. 2015).
- De Brabander M., Geuens G., Nuydens R., Willebrords R., De Mey J. (1981): Taxol induces the assembly of free microtubules in living cells and blocks the organizing capacity of the centrosomes and kinetochores. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **78**, 5608–5612.
- Desai A., Mitchison T.J. (1997): Microtubule polymerization dynamics. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **13**, 83–117.
- Dominguez R., Holmes K.C. (2011): Actin structure and function. *Annual Review of Biophysics* **40**, 169–186.
- Dovgalyuk A., Kalynyak T., Blume Y.B. (2003): Heavy metals have a different action from aluminium in disrupting microtubules in *Allium cepa* meristematic cells. *Cell Biology International* **27**, 193–195.
- Erhardt M., Stoppin-Mellet V., Campagne S., Canaday J., Mutterer J., Fabian T., Sauter M., Muller T., Peter C., Lambert A.M., Schmit A.C. (2002): The plant Spc98p homologue colocalizes with γ -tubulin at microtubule nucleation sites and is required for microtubule nucleation. *Journal of Cell Science* **115**, 2423–2431.
- Erickson H.P. (1998): Atomic structures of tubulin and FtsZ. *Trends in Cell Biology* **8**, 133–137.
- Fishel E.A., Dixit R. (2013): Role of nucleation in cortical microtubule array organization: variations on a theme. *The Plant Journal* **75**, 270–277.
- Freedman H., Huzil J.T., Luchko T., Ludueña R.F., Tuszynski J.A. (2009): Identification and characterization of an intermediate taxol binding site within microtubule nanopores and a mechanism for tubulin isotype binding selectivity. *Journal of Chemical Information and Modeling* **49**, 424–436.
- Friml J., Wiśniewska J., Benková E., Mendgen K., Palme K. (2002): Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in Arabidopsis. *Nature* **415**, 806–809.

- Fujiki Y., Yoshimoto K., Ohsumi Y. (2007): An Arabidopsis homolog of yeast ATG6/VPS30 is essential for pollen germination. *Plant Physiology* **143**, 1132–1139.
- Fukamatsu Y., Yabe N., Hasunuma K. (2003): Arabidopsis NDK1 is a component of ROS signaling by interacting with three catalases. *Plant and Cell Physiology* **44**, 982–989.
- Fukiji Y., Yoshimoto K., Ohsumi Y. (2007): An arabidopsis homolog of yeast ATG6/VPS30 is essential for pollen germination. *Plant Physiology* **143**, 1132–1139.
- Gao Y., Thomas J.O., Chow R.L., Lee G.H., Cowan N.J. (1992): A cytoplasmic chaperonin that catalyzes beta-actin folding. *The Cell* **69**, 1043–1050.
- Ghosh S., Sarkar S. (1994): Recent development in the synthesis of taxane diterpenes. *Journal of the Indian Institute of Science* **74**, 91–115.
- Gilliland L.U., Pawloski L.C., Kandasamy M.K., Meagher R.B. (2003): Arabidopsis actin gene ACT7 plays an essential role in germination and root growth. *Plant Journal* **33**, 319–328.
- Greenberg J.T. (1997): Programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**, 525–545.
- Guénard D., Guéritte-Voegelein F., Potier P. (1993): Taxol and taxotere: discovery, chemistry, and structure-activity relationships. *Accounts of Chemical Research* **26**, 160–167.
- Gupta M.L.Jr., Bode C.J., Georg G.I., Himes R.H. (2003): Understanding tubulin–Taxol interactions: Mutations that impart Taxol binding to yeast tubulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 6394–6397.
- Harrison-Lowe N. J., Olsen L. J. (2008): Autophagy protein 6 (ATG6) is required for pollen germination in Arabidopsis thaliana. *Autophagy* **4**, 339–348.
- Hasenstein K.H., Blancaflor E.B., Lee J.S. (1999): The microtubule cytoskeleton does not integrate auxin transport and gravitropism in maize roots. *Physiologia Plantarum* **105**, 729–738.
- Herrmann H., Strelkov S.V. (2011): History and phylogeny of intermediate filaments: Now in insects. *BMC Biology* **9**:16. <http://www.biomedcentral.com/1471-2148/7/64>.
- Hirokawa N., Noda Y., Okada Y. (1998): Kinesin and dynein superfamily proteins in organelle transport and cell division. *Current Opinion in Cell Biology* **10**, 60–73.
- Hou G., Mohamalawari D.R., Blancaflor E.B. (2003): Enhanced gravitropism of roots with a disrupted cap actin cytoskeleton. *Plant Physiology* **131**, 1360–1373.
- Huang S., An Y.Q., McDowell J.M., McKinney E.C., Meagher R.B. (1997): The Arabidopsis ACT11 actin gene is strongly expressed in tissues of the emerging inflorescence, pollen, and developing ovules. *Plant Molecular Biology* **33**, 125–139.
- Chan J., Sambade A., Calder G., Lloyd C. (2009): Arabidopsis cortical microtubules are initiated along, as well as branching from, existing microtubules. *The Plant Cell* **21**, 2298–2306.
- Chen P.H., Wang C.Y., Hsia C.W., Ho M.Y., Chen A., Tseng M.J., Wu Y.F., Chen H.M., Huang T.H., Liu H.T., Shui H.A. (2011): Impact of taxol on dermal papilla cells—a proteomics and bioinformatics analysis. *Journal of Proteomics* **74**, 2760–2773.
- ImageJ home page: <http://imagej.nih.gov/ij/> (28. 4. 2015).
- Jánosi I.M., Chrétien D., Flyvbjerg H. (1998): Modeling elastic properties of microtubule tips and walls. *European Biophysics Journal* **27**, 501–513.
- Jaspersen S.L., Winey M. (2004): The budding yeast spindle pole body: structure, duplication and function. *Review of Cell and Developmental Biology* **20**, 1–28.
- Job D., Valiron O., Oakley B. (2003): Microtubule nucleation. *Current Opinion in Cell Biology* **15**, 111–117.
- Jordan M.A., Toso R.J., Thrower D., Wilson L. (1993): Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **90**, 9552–9556.
- Jordan M.A., Wendell K., Gardiner S., Derry W.B., Copp H., Wilson L. (1996): Mitotic block induced in HeLa cells by low concentrations of paclitaxel (Taxol) results in abnormal mitotic exit and apoptotic cell death. *Cancer Research* **56**, 816–825.
- Jung J.Y., Kim Y.W., Kwak J.M., Hwang J.U., Young J., Schroeder J.I., Hwang I., Lee Y. (2002): Phosphatidylinositol 3- and 4-phosphate are required for normal stomatal movements. *The Plant Cell* **14**, 2399–2412.
- Jürgens G. (2005): Cytokinesis in higher plants. *Annual Review of Plant Biology* **56**, 281–299.

- Justice M.C., Hsu M.J., Tse B., Ku T., Balkovec J., Schmatz D., Nielsen J. (1998): Elongation factor 2 as a novel target for selective inhibition of fungal protein synthesis. *The Journal of Biological Chemistry* **273**, 3148–3151.
- Kalluri R., Zeisberg M. (2006): Fibroblasts in cancer. *Nature reviews cancer* **6**, 392–401.
- Kandasamy M.K., McKinney E.C., Meagher R.B. (2002): Plant profilin isovariants are distinctly regulated in vegetative and reproductive tissues. *Cell Motility and the Cytoskeleton* **52**, 22–32.
- Kerk, D., Bulgrien, J., Smith, D.W., and Gribskov, M. (2003): Arabidopsis proteins containing similarity to the universal stress protein domain of bacteria. *Plant Physiology* **131**, 1209–1219.
- Ketelaar T. Faivre-Moskalenko C., Esseling J.J., de Ruijter N.C., Grierson C.S., Dogterom M., Emons A.M. (2002): Positioning of nuclei in Arabidopsis root hairs: an actin-regulated process of tip growth. *The Plant Cell* **14**, 2941–2955.
- Kong Z., Hotta T., Lee Y.R., Horio T., Liu B. (2010): The γ -tubulin complex protein GCP4 is required for organizing functional microtubule arrays in Arabidopsis thaliana. *The Plant Cell* **22**, 191–204.
- Kopczak S.D., Haas N.A., Hussey P.J., Silflow C.D, Snustad D.P. (1992): The small genome of Arabidopsis contains at least six expressed alpha-tubulin genes. *The Plant Cell* **4**, 539–547.
- Laval V., Koroleva O.A., Murphy E., Lu C., Milner J.J., Hooks M.A., Tomos A.D. (2002): Distribution of actin gene isoforms in the Arabidopsis leaf measured in microsamples from intact individual cells. *Planta* **215**, 287–292.
- Le Sourd F., Boulben S., Le Bouffant R., Cormier P., Morales J., Belle R., Mulner-Lorillon O. (2006): Eef1b: At the dawn of the 21st century. *Biochimica et Biophysica Acta* **1759**, 13–31.
- Lewis S.A., Tian G., Cowan N.J. (1997): The alpha- and beta-tubulin folding pathways. *Trends in Cell Biology* **7**, 479–485.
- Liu B., Joshi H.C., Wilson T.J., Silflow C.D., Polevitz B.A., Snustad D.P. (1994): γ -tubulin in Arabidopsis: gene sequence, immunoblot, and immunofluorescence studies. *The Plant Cell* **6**, 300–314.
- Liu B., Marc J., Joshi H.C., Palevitz B.A. (1993): A γ -tubulin-related protein associated with the microtubule arrays of higher plants in a cell cycle-dependent manner. *Journal of Cell Science* **104**, 1217–1228.
- Liu Y., Schiff M., Czymmek K., Tallóczy Z., Levine B., Dinesh-Kumar S.P. (2005): Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response. *The Cell* **121**, 567–577.
- Llorca O., Smyth M.G., Carrascosa J.L., Willison K.R., Radermacher M., Steinbacher S., Valpuesta J.M. (1999): 3D reconstruction of the ATP-bound form of CCT reveals asymmetric folding conformation of a type II chaperonin. *Nature Structural Biology* **6**, 639–642.
- Lloyd C. (2011): Dynamic microtubules and the texture of plant cell walls. *International Review of Cell and Molecular Biology* **287**, 287–329.
- Löwe J., Amos L.A. (1999): How taxol stabilises microtubule structure. *Chemistry & Biology* **6**, 65–69.
- Lüders J., Patel U.K., Stearns T. (2006): GCP-WD is a gamma-tubulin targeting factor required for centrosomal and chromatin-mediated microtubule nucleation. *Nature Cell Biology* **8**, 137–147.
- Ma Y., Hendershot L.M. (2004): ER chaperone functions during normal and stress conditions. *Journal of Chemical Neuroanatomy* **28**, 51–65.
- Marc J., Granger C.L., Brincat J., Fisher D.D., Kao T., McCubbin A.G., Cyr R.J. (1998): A GFP-MAP4 reporter gene for visualizing cortical microtubule rearrangements in living epidermal cells. *The Plant Cell* **10**, 1927–1939.
- McDowell J.M., An Y.Q., Huang S., McKinney E.C., Meagher R.B. (1996): The Arabidopsis ACT7 actin gene is expressed in rapidly developing tissues and responds to several external stimuli. *Plant Physiology* **111**, 699–711.
- Melki R., Carlier M.F., Pantaloni D., Timasheff S.N. (1989): Cold depolymerization of microtubules to double rings - geometric stabilization of assemblies. *Biochemistry* **28**, 9143–9152.
- Merkouropoulos G., Andreasson E., Hess D., Boller T., Peck S.C. (1996): An Arabidopsis protein phosphorylated in response to microbial elicitation, AtPHOS32, is a substrate of MAP kinases 3 and 6. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 10493–10499.

- Millar A.H., Sweetlove L.J., Giegé P., Leaver C.J. (2001): Analysis of the Arabidopsis mitochondrial proteome. *Plant Physiology* **127**, 1711–1727.
- Mitchison T., Kirschner M. (1984): Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* **312**, 237–242.
- Mitchison T.J., Kirschner M. (1984): Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* **312**, 237–242.
- Murashige T., Skoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473–497.
- Murata T., Hasebe M. (2007): Microtubule-dependent microtubule nucleation in plant cells. *Journal of Plant Research* **120**, 73–78.
- Murata T., Hasebe M. (2011): Microtubule Nucleation and Organization in Plant Cells. In: *The Plant Cytoskeleton, Advances in Plant Biology 2*. (Liu B. ed.), Springer, New York, USA, 81–94.
- Murata T., Tanahashi T., Nishiyama T., Yamaguchi K., Hasebe M. (2007): How do plants organize microtubules without a centrosome? *Journal of Integrative Plant Biology* **49**, 1154–1163.
- Murata T., Wada M. (1991): Reformation of the preprophase band after cold-induced depolymerization of microtubules in *Adiantum protonemata*. *Plant Cell Physiology* **32**, 1145–1151.
- Nakagami H., Potzschke A., Hirt H. (2005): Emerging MAP kinase pathways in plant stress signalling. *Trends in Plant Science* **10**, 339–346.
- Nakamura M., Ehrhardt D.W., Hashimoto T. (2010): Microtubule and katanin-dependent dynamics of microtubule nucleation complexes in the acentrosomal Arabidopsis cortical array. *Nature Cell Biology* **12**, 1064–1070.
- Nakamura M., Toyota M., Tasaka M., Morita M.T. (2011): An Arabidopsis E3 ligase, SHOOT GRAVITROPISM 9, modulates the interaction between statoliths and F-Actin in gravity sensing. *The Plant Cell* **23**, 1830–1848.
- Nakamura, M., Hashimoto, T. (2009): A mutation in the Arabidopsis γ -tubulin-containing complex causes helical growth and abnormal microtubule branching. *Journal of Cell Science* **122**, 2208–2217.
- NCBI home page: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (21. 4. 2015).
- Nguyen H.L., Gruber D., Bulinski J.C. (1999): Microtubule-associated protein 4 (MAP4) regulates assembly, protomer-polymer partitioning and synthesis of tubulin in cultured cells. *Journal of Cell Science* **112**, 1813–1824.
- Nogales E., Whittaker M., Milligan R.A., Downing K.H. (1999): High-resolution model of the microtubule. *The Cell* **96**, 79–88.
- Nogales E., Wolf S.G., Downing K.H. (1998): Structure of $\alpha\beta$ tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* **391**, 199–203.
- Oakley B.R. (1992): γ -Tubulin: The microtubule organizer? *Trends in Cell Biology* **2**, 1–5.
- Park Y.H., Choy Y.H., Lee J.S. (1996): The effect of taxol and ethyl-N-phenylcarbamate (EPC) on growth and gravitropism in *Zea mays* L. *Singmul Hakhoe Chi* **39**, 287–293.
- Patel S., Dinesh-Kumar S.P. (2008): Arabidopsis ATG6 is required to limit the pathogen-associated cell death response. *Autophagy* **4**, 20–27.
- Peterson M.R., Hsu S.C., Scheller R.H. (1996): A mammalian homologue of SLY1, a yeast gene required for transport from endoplasmic reticulum to Golgi. *Gene* **169**, 293–294.
- Prabu G.R., Thirugnanasambantham K., Mandal A.K.A., Saravanan A. (2012): Molecular cloning and characterization of nucleoside diphosphate kinase 1 cDNA in tea. *Biologia Plantarum* **56**, 140–144.
- Qin G., Ma Z., Zhang L., Xing S., Hou X., Deng J., Liu J., Chen Z., Qu L.J., Gu H. (2007): Arabidopsis AtBECLIN 1/AtAtg6/AtVps30 is essential for pollen germination and plant development. *Cell Research* **17**, 249–263.
- Rabilloud T., Lelong C. (2011): Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: a tutorial. *Journal of Proteomics* **74**, 1829–1841.
- Ringli C., Baumberger N., Diet A., Frey B., Keller B. (2002): ACTIN2 is essential for bulge site selection and tip growth during root hair development of Arabidopsis. *Plant Physiology* **129**, 1464–1472

- Rothman J.E. (1989): Polypeptide chain binding proteins: catalysts of protein folding and related processes in cells. *The Cell* **59**, 591–601.
- Rutherford S., Moore I. (2002): The Arabidopsis Rab GTPase family: another enigma variation. *Current Opinion in Plant Biology* **5**, 518–528.
- Sato E.M., Hijazi H., Bennett M.J., Vissenberg K., Swarup R. (2014): New insights into root gravitropic signalling. *Journal of Experimental Botany* doi:10.1093/jxb/eru515.
- Sharma N., Kosan Z.A., Stallworth J.E., Berbari N.F., Yoder B.K. (2001): Soluble levels of cytosolic tubulin regulate ciliary length control. *Molecular and Cellular Biology* **22**, 806–816.
- Shaw S.L., Kamyar R., Ehrhardt D.W. (2003): Sustained microtubule treadmilling in Arabidopsis cortical arrays. *Science* **300**, 1715–1718.
- Schiff P.B., Fant J., Horwitz S.B. (1979): Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* **277**, 665–667.
- Schiff P.B., Horwitz S.B. (1980): Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **77**, 1561–1565.
- Smirnova E.A., Bajer A.S. (1998): Early stages of spindle formation and independence of chromosome and microtubule cycles in *Haemanthus endosperm*. *Cell Motility and the Cytoskeleton* **40**, 22–37.
- Snustad D.P., Haas N.A., Kopczak S.D., Silflow C.D. (1992): The small genome of Arabidopsis contains at least nine expressed beta-tubulin genes. *The Plant Cell* **4**, 549–556.
- Stargell L.A., Heruth D.P., Gaertig J., Gorovsky M.A. (1992): Drugs affecting microtubule dynamics increase alpha-tubulin mRNA accumulation via transcription in *Tetrahymena thermophila*. *Molecular and Cellular Biology* **12**, 1443–1450.
- Stoppin V., Vantard M., Schmit A.C., Lambert A.M. (1994): Isolated plant nuclei nucleate microtubule assembly – the nuclear-surface in higher-plants has centrosome-like activity. *The Plant Cell* **6**, 1099–1106.
- Šamaj J., Müller J., Beck M., Böhm N., Menzel D. (2006): Vesicular trafficking, cytoskeleton and signalling in root hairs and pollen tubes. *Trends in Plant Science* **11**, 594–600.
- TAIR home page: <https://www.arabidopsis.org/> (21. 4. 2015).
- Takáč T., Šamaj J. (2015): Advantages and limitations of shot-gun proteomic analyses on Arabidopsis plants with altered MAPK signaling. *Frontiers in Plant Science* **6**, 107.
- TargetP 1.1 Server home page: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/> (28. 4. 2015).
- Teixidó-Travesa N., Roig J., Lüders J. (2012): The where, when and how of microtubule nucleation – one ring to rule them all. *Journal of Cell Science* **125**, 4445–4456.
- Tian G., Lewis S.A., Feierbach B., Stearns T., Rommelaere H., Ampe C., Cowan N.J. (1997): Tubulin subunits exist in an activated conformational state generated and maintained by protein cofactors. *Journal of Cell Biology* **138**, 821–832.
- Tominaga M., Yokota E., Vidali L., Sonobe S., Hepler P.K., Shimmen T. (2000): The role of plant villin in the organization of the actin cytoskeleton, cytoplasmic streaming and the architecture of the transvacuolar strand in root hair cells of *Hydrocharis*. *Planta* **210**, 836–843.
- UniProt home page: <http://www.uniprot.org/> (21. 4. 2015).
- van der Honing H.S., Kieft H., Emons A.M., Ketelaar L. (2012): Arabidopsis VILLIN2 and VILLIN3 are required for the generation of thick actin filament bundles and for directional organ growth. *Plant Physiology* **158**, 1426–1438.
- Wang F., Jing Y., Wang Z., Mao T., Šamaj J., Yuan M., Ren H. (2009): Arabidopsis profilin isoforms, PRF1 and PRF2 show distinctive binding activities and subcellular distributions. *Journal of Integrative Plant Biology* **51**, 113–121.
- Wani M.C., Taylor H.M., Wall M.E., Coggon P., McPhail A.T. (1971): Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society* **93**, 2325–2327.
- Wasteneys G.O. (2002): Microtubule organization in green kingdom: chaos or self order? *Journal of Cell Science* **115**, 1345–1354.
- Wasteneys G.O., Ambrose J.C. (2009): Spatial organization of plant cortical microtubules: close encounters of the 2D kind. *Trends in Cell Biology* **19**, 62–71.
- Westermeier R., Naven T. (2002): *Proteomics in practice: A laboratory manual of proteome analysis*. 3. vydání, Wiley-VHC, Weinheim, Germany, 329 stran.

- Wiese C., Zheng Y. (2006): Microtubule nucleation: gamma-tubulin and beyond. *Journal of Cell Science* **119**, 4143–4153.
- Wiche G., Oberkanins C., Himmler A. (1981): Molecular structure and function of microtubule-associated proteins. *International Reviews of Cytology* **124**, 217–273.
- Xiao H., Verdier-Pinard P., Fernandez-Fuentes N., Burd B., Angeletti R., Fiser A., Horwitz S.B., Orr G.A. (2006): Insight into the mechanism of microtubule stabilization by Taxol. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 10166–10173.
- Xu P., Lie D., Jiang W. (2009): Cadmium effects on the organization of microtubular cytoskeleton in interphase and mitotic cells of *Allium sativum*. *Biologia Plantarum* **53**, 387–390.
- Yvon A. M., Wadsworth P., Jordan M. A. (1999): Taxol suppresses dynamics of individual microtubules in living human tumor cells. *Molecular Biology of the Cell* **10**, 947–959.
- Yvon A.C., Wadsworth P., Jordan M.A. (1999): Taxol suppresses dynamics of individual microtubules in living human tumor cells. *Molecular Biology of the Cell* **10**, 947–959.
- Zheng Y., Wong M.L., Alberts B., Mitchison T. (1995): Nucleation of microtubule assembly by a γ -tubulin-containing ring complex. *Nature* **378**, 578–583.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

| | |
|-----------|--|
| ADP | adenosindifosfát |
| ANOVA | analýza rozptylu |
| APS | persíran amonný |
| ATG6 | autofagický protein 6 |
| ATP | adenosintrifosfát |
| BSA | hovězí sérový albumin |
| CBB | Coomassie Brilliant Blue |
| CCT | chaperonin obsahující TCP-1 |
| d | den |
| Da (kDa) | Dalton (kilodalton) |
| DMSO | dimethylsulfoxid |
| DNA | deoxiribonukleová kyselina |
| DTT | dithiothreitol |
| ECL | chemiluminiscenční detekční kit |
| EDTA | kyselina ethylendiamintetraoctová |
| EF | elongační faktor |
| ER | endoplazmatické retikulum |
| GCP | γ -tubulin komplex-protein |
| GDP | guanosindifosfát |
| GFP | zelený fluorescenční protein |
| GO | Gene ontology |
| GTP | guanosintrifosfát |
| h | hodina |
| CHAPS | 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propan sulfonát |
| IPG | isoelektrický fokusační gradient |
| JA | kyselina jasmonová |
| MALDI-TOF | matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace s analyzátozem doby letu |
| MAP | proteiny asociované s mikrotubuly |
| min | minuta |
| MPK3 | MAP kinasa 3 |
| MPK6 | MAP kinasa 6 |
| M_r | relativní molekulová hmotnost |
| mRNA | mediátorová kyselina ribonukleová |
| MS | Murashige & Skoog médium |
| NAD | nikotinamidadenindinukleotid (oxidovaná forma) |
| NADH | nikotinamidadenindinukleotid (redukováná forma) |
| NCBI | národní centrum pro biotechnologické informace |
| NDK 1 | nukleosiddifosfátkináza 1 |
| NDP | nukleosiddifosfát |
| NTP | nukleosidtrifosfát |
| p | hladina významnosti |
| PAGE | polyakrylamidová gelová elektroforéza |
| PMSF | fenylmethansulfonyl fluorid |
| PVDF | polyvinyliden difluorid |
| SDS | dodecylsíran sodný |
| Sec | sekreční (secretory) |
| TBS | Tris-pufr, sůl |

| | |
|--------------|---|
| TBS-T | Tris-pufr, sůl, Tween |
| TCP-1 | T-komplex-protein 1 |
| TEMED | N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin |
| Tris | 2-amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol |
| Tris-HCl | 2-amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol hydrochlorid |
| tRNA | transferová kyselina ribonukleová |
| <i>TubG1</i> | gen kódující γ 1-tubulin |
| <i>TubG2</i> | gen kódující γ 2-tubulin |

8 PŘÍLOHY

Tab. 4: Porovnání délek primárních kořenů mezi 10 kontrolními a 10 taxolem ovlivněnými rostlinami nultý den po přenesení rostlin na médium s DMSO (kontrola) nebo na médium taxolem. Celkové stáří rostlin bylo 5 dnů.

| Číslo rostliny | Délka kořene (mm) | |
|---|---------------------|---------------------|
| | kontrola | taxol |
| 1 | 13,55 | 13,88 |
| 2 | 15,56 | 13,63 |
| 3 | 13,43 | 13,96 |
| 4 | 13,10 | 13,82 |
| 5 | 14,61 | 12,45 |
| 6 | 12,75 | 11,07 |
| 7 | 12,68 | 9,43 |
| 8 | 18,55 | 11,92 |
| 9 | 13,93 | 10,69 |
| 10 | 9,56 | 13,55 |
| Průměrná délka, směr. odchylka | 13,77 ± 2,29 | 12,44 ± 1,61 |

Tab. 5: Porovnání délek primárních kořenů mezi 10 kontrolními a 10 taxolem ovlivněnými rostlinami 3. den po přenesení rostlin na médium s DMSO (kontrola) nebo na médium taxolem. Celkové stáří rostlin bylo 8 dnů.

| Číslo rostliny | Délka kořene (mm) | |
|--|---------------------|---------------------|
| | kontrola | taxol |
| 1 | 34,94 | 28,69 |
| 2 | 40,59 | 28,10 |
| 3 | 38,88 | 28,30 |
| 4 | 37,10 | 27,61 |
| 5 | 40,17 | 26,92 |
| 6 | 31,64 | 24,44 |
| 7 | 33,39 | 23,05 |
| 8 | 46,44 | 26,71 |
| 9 | 35,40 | 23,26 |
| 10 | 29,46 | 16,79 |
| Průměrná délka, směr. odchylka (mm) | 36,80 ± 4,95 | 25,39 ± 3,66 |

Tab. 6: Porovnání délek primárních kořenů mezi 10 kontrolními a 10 taxolem ovlivněnými rostlinami 4. den po přenesení rostlin na médium s DMSO (kontrola) nebo na médium taxolem. Celkové stáří rostlin bylo 9 dnů.

| Číslo rostliny | Délka kořene (mm) | |
|--|---------------------|---------------------|
| | kontrola | taxol |
| 1 | 43,45 | 33,01 |
| 2 | 49,82 | 32,11 |
| 3 | 47,07 | 32,39 |
| 4 | 45,61 | 32,00 |
| 5 | 49,03 | 31,25 |
| 6 | 37,81 | 27,64 |
| 7 | 39,34 | 27,26 |
| 8 | 54,75 | 31,09 |
| 9 | 42,12 | 27,73 |
| 10 | 36,65 | 16,90 |
| Průměrná délka, směr. odchylka (mm) | 44,56 ± 5,79 | 29,14 ± 4,81 |

Tab. 7: Porovnání délek primárních kořenů mezi 10 kontrolními a 10 taxolem ovlivněnými rostlinami 5. den po přenesení rostlin na médium s DMSO (kontrola) nebo na médium taxolem. Celkové stáří rostlin bylo 10 dnů.

| Číslo rostliny | Délka kořene (mm) | |
|--|---------------------|---------------------|
| | kontrola | taxol |
| 1 | 51,85 | 39,21 |
| 2 | 59,93 | 36,44 |
| 3 | 55,73 | 38,42 |
| 4 | 54,77 | 36,74 |
| 5 | 60,45 | 37,86 |
| 6 | 46,71 | 33,48 |
| 7 | 48,01 | 32,92 |
| 8 | 64,50 | 36,43 |
| 9 | 51,55 | 33,08 |
| 10 | 47,73 | 19,07 |
| Průměrná délka, směr. odchylka (mm) | 54,12 ± 6,05 | 34,36 ± 5,82 |

Tab. 8: Počet a délka všech postranních kořenů u 10 kontrolních rostlin. Celkové stáří rostlin bylo 8 dnů a na médiu s DMSO byly rostliny 3. den.

| Číslo rostliny | Počet postranních kořenů | Délka postranních kořenů (mm) | | | | | | | | | |
|----------------|--------------------------|-------------------------------|------|------|------|------|-------|------|------|------|------|
| | | | | | | | | | | | |
| 1 | 6 | 5,74 | 7,05 | 2,59 | 4,00 | 1,33 | 0,70 | | | | |
| 2 | 8 | 3,27 | 8,39 | 7,57 | 4,57 | 5,04 | 2,92 | 6,15 | 1,93 | | |
| 3 | 8 | 14,70 | 9,40 | 2,22 | 4,50 | 3,91 | 1,35 | 2,35 | 1,49 | | |
| 4 | 4 | 6,19 | 3,61 | 3,64 | 2,25 | | | | | | |
| 5 | 8 | 9,38 | 4,68 | 4,80 | 4,32 | 3,51 | 2,53 | 0,63 | 0,76 | | |
| 6 | 5 | 5,70 | 4,37 | 3,43 | 1,81 | 0,77 | | | | | |
| 7 | 7 | 8,89 | 4,74 | 2,68 | 2,80 | 1,76 | 1,89 | 1,37 | | | |
| 8 | 10 | 4,59 | 5,14 | 6,65 | 7,90 | 7,58 | 2,28 | 4,37 | 6,19 | 3,52 | 2,46 |
| 9 | 8 | 5,82 | 7,76 | 0,30 | 3,74 | 2,27 | 1,44 | 1,10 | 0,35 | | |
| 10 | 6 | 9,30 | 5,57 | 4,18 | 2,06 | 8,47 | 13,37 | | | | |

Tab. 9: Počet a délka všech postranních kořenů u 10 rostlin ovlivněných taxolem. Celkové stáří rostlin bylo 8 dnů a na médiu s taxolem byly rostliny 3. den.

| Číslo rostliny | Počet postranních kořenů | Délka postranních kořenů (mm) | | | | | | | | | |
|----------------|--------------------------|-------------------------------|------|------|------|------|------|------|--|--|--|
| | | | | | | | | | | | |
| 1 | 7 | 6,42 | 2,00 | 2,75 | 3,41 | 2,44 | 3,06 | 2,41 | | | |
| 2 | 5 | 4,44 | 2,00 | 3,18 | 2,51 | 9,85 | | | | | |
| 3 | 7 | 3,85 | 5,11 | 3,08 | 2,13 | 2,87 | 1,02 | 1,68 | | | |
| 4 | 4 | 6,19 | 3,61 | 3,64 | 2,25 | | | | | | |
| 5 | 5 | 3,09 | 3,21 | 2,87 | 1,74 | 2,30 | 1,52 | | | | |
| 6 | 6 | 8,59 | 3,81 | 3,38 | 2,50 | 1,68 | 1,73 | | | | |
| 7 | 3 | 9,46 | 3,20 | 1,75 | | | | | | | |
| 8 | 6 | 3,52 | 4,83 | 3,01 | 3,29 | 2,62 | 2,14 | | | | |
| 9 | 5 | 8,17 | 3,48 | 3,09 | 2,28 | 1,91 | | | | | |
| 10 | 5 | 1,67 | 4,05 | 3,76 | 3,12 | 3,27 | | | | | |

A**B**

Obr. 34: Porovnání počtu a délky kořenových vlásků kontrolních rostlin *Arabidopsis* (A) a rostlin ovlivňovaných taxolem (B). Kořeny rostly 3 dny na médiu s DMSO (A) nebo s taxolem (B). Stáří rostlin je 8 d. Měřítko 0,5 mm.

Tab. 10: Délky a celkový počet kořenových vlásků u vybrané kontrolní rostliny a taxolem ovlivněné rostliny. Celkový počet kořenových vlásků byl měřen na kořenech z Obr. 14A a 14B. Délky byly měřeny u 10 kořenových vlásků z kořenové zóny vyznačené na Obr. 14A, 14B složenou závorkou. Celkové stáří rostlin je 8 d. Na médiu s taxolem/DMSO byly rostliny 3. den.

| Číslo kořenového vlásku | Délka kořenového vlásku (μm) | |
|---|------------------------------|----------|
| | kontrola | taxol |
| 1 | 356 | 240 |
| 2 | 192 | 186 |
| 3 | 232 | 143 |
| 4 | 327 | 139 |
| 5 | 246 | 114 |
| 6 | 260 | 151 |
| 7 | 244 | 101 |
| 8 | 182 | 88 |
| 9 | 260 | 121 |
| 10 | 169 | 152 |
| Průměr, směrodatná odchylka (μm) | 247 ± 57 | 144 ± 42 |
| Celkový počet vlásků | 44 | 62 |

Tab. 11: Porovnání úhlů mezi směrem růstu primárních kořenů a směrem růstu po otočení rostlin o 90° (vzhledem ke gravitaci) mezi 10 kontrolními a 10 taxolem ovlivněnými rostlinami. Rostliny byly otočeny po dobu 1 dne. Celkové stáří rostlin bylo 11 dnů a na médiu s taxolem/DMSO byly rostliny 6. den.

| Číslo kořene | Úhel (°) | |
|-----------------------------------|---------------|---------------|
| | kontrola | taxol |
| 1 | 111,64 | 99,85 |
| 2 | 94,80 | 105,54 |
| 3 | 103,10 | 108,21 |
| 4 | 117,72 | 98,33 |
| 5 | 111,58 | 104,73 |
| Průměr, směr. odchylka (°) | 107,77 ± 7,98 | 103,33 ± 3,68 |

Tab. 12: Porovnání úhlů mezi směrem růstu primárních kořenů po otočení rostlin o 90° vzhledem ke gravitaci a po otočení o 90° zpět do původní polohy mezi 10 kontrolními a 10 taxolem ovlivněnými rostlinami. Rostliny byly otočeny po dobu 1 dne. Celkové stáří rostlin bylo 12 dnů a na médiu s taxolem/DMSO byly rostliny 7. den.

| Číslo kořene | Úhel (°) | |
|---------------------------------------|---------------|---------------|
| | kontrola | taxol |
| 1 | 95,67 | 140,49 |
| 2 | 87,52 | 130,97 |
| 3 | 95,26 | 134,04 |
| 4 | 121,29 | 133,01 |
| Průměr, směr. odchylka (°) | 99,94 ± 12,75 | 134,63 ± 3,56 |

Tab. 13: Seznam proteinů s významně změněnou abundancí (One way Anova test, $p \leq 0,05$) po ošetření taxolem získaných ze vzorků kořenů Arabidopsis s využitím metod bezgelové proteomické analýzy (jejich název, přístupový kód a změna abundance). Změna abundance vyjadřuje poměr mezi abundancí proteinu v taxolem ovlivněném vzorku a kontrolním vzorku.

| Přístupový kód GI | Název proteinu | Změna abundance |
|--------------------------|---|-----------------|
| SNÍŽENÁ ABUNDANCE | | |
| 18400212 | dihydrolipoamide acetyltransferase, long form protein | 0,20 |
| 15227443 | 40S ribosomal protein S2-3 | 0,24 |
| 18390444 | ubiquitin-associated (UBA)/TS-N domain-containing protein | 0,27 |
| 15218740 | aspartyl protease-like protein | 0,29 |
| 15236981 | 60S ribosomal protein L14-2 | 0,30 |
| 15227825 | ankyrin repeat-containing 2B | 0,31 |
| 15237548 | 40S ribosomal protein S28-1 | 0,34 |
| 18410510 | HIS triad family protein 3 | 0,41 |
| 186521400 | ATP synthase subunit beta-1 | 0,42 |
| 18423628 | universal stress protein (USP) family protein | 0,51 |
| 334187803 | chaperonin 20 | 0,53 |
| 334188667 | sulfurtransferase 18 | 0,55 |
| 15219413 | nascent polypeptide-associated complex subunit beta | 0,66 |
| 145323776 | histone H4 | 0,67 |
| ZVÝŠENÁ ABUNDANCE | | |
| 15225103 | glutathione peroxidase GPx | 1,24 |
| 30694221 | dihydrolipoyl dehydrogenase 1 | 1,51 |
| 30684428 | dihydrolipoyl dehydrogenase 2 | 1,75 |
| 145323950 | dehydroascorbate reductase | 1,76 |
| 334183191 | poly(A) binding protein 8 | 1,78 |

Tab. 13: Seznam proteinů s významně změněnou abundancí (One way Anova test, $p \leq 0,05$) po ošetření taxolem získaných ze vzorků kořenů *Arabidopsis* s využitím metod bezgelové proteomické analýzy (jejich název, přístupový kód a změna abundance). Změna abundance vyjadřuje poměr mezi abundancí proteinu v taxolem ovlivněném vzorku a kontrolním vzorku (*pokračování*).

| | | |
|-----------|---|-------|
| 15238284 | CBS domain-containing protein | 1,78 |
| 15219901 | patellin 2 | 1,84 |
| 18413214 | nucleoside diphosphate kinase 1 | 1,90 |
| 15233538 | profilin 2 | 1,93 |
| 30691626 | heat shock protein 70-1 | 2,03 |
| 15225333 | monothiol glutaredoxin-S12 | 2,27 |
| 15220092 | cytochrome c oxidase subunit 5b-2 | 2,69 |
| 186510498 | succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit 1 | 2,79 |
| 30681492 | glycine-rich RNA-binding protein 7 | 2,87 |
| 15237679 | peptidyl-prolyl isomerase FKBP12 | 3,19 |
| 240255880 | heat shock factor binding protein | 3,36 |
| 15225798 | 3-ketoacyl-CoA thiolase 2 | 3,38 |
| 15241592 | succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit alpha-1 | 3,40 |
| 15218090 | putative mitochondrial-processing peptidase subunit alpha-1 | 6,20 |
| 30680570 | ADP,ATP carrier protein 1 | 8,41 |
| 18405794 | villin 2 | 10,03 |

Tab. 14: Seznam proteinů s významně změněnou abundancí (One way Anova test, $p \leq 0,05$) po ošetření taxolem získaných ze vzorků kořenů *Arabidopsis* s využitím metod gelové proteomické analýzy (jejich název, přístupový kód a změna abundance). Změna abundance vyjadřuje poměr mezi abundancí proteinu v taxolem ovlivněném vzorku a kontrolním vzorku.

| Databázový kód | Název proteinu | Změna abundance |
|----------------|--|-----------------|
| | SNÍŽENÁ ABUNDANCE | |
| gi 30693962 | BIP; ATP binding | |
| At2g01900 | endonuclease/exonuclease/phosphatase family protein | |
| CYSKP_ARATH | cysteine synthase, chloroplast/chromoplast precursor | |
| MDAR4_ARATH | probable monodehydroascorbate reductase, cytoplasmic isoform 4 | 0,40 |
| TL15B_ARATH | thylakoid lumenal 15,0 kDa protein 2, chloroplast precursor | 0,44 |
| MPPA1_ARATH | probable mitochondrial-processing peptidase subunit alpha-1, mitochondrial precursor | 0,50 |
| BIP1_ARATH | luminal-binding protein 1 precursor | 0,51 |
| ANXD1_ARATH | annexin D1 | 0,54 |
| At3g16470 | myrosinase-binding protein-like | 0,60 |
| gi 18404382 | malate dehydrogenase | 0,60 |

Tab. 14: Seznam proteinů s významně změněnou abundancí (One way Anova test, $p \leq 0,05$) po ošetření taxolem získaných ze vzorků kořenů *Arabidopsis* s využitím metod gelové proteomické analýzy (jejich název, přístupový kód a změna abundance). Změna abundance vyjadřuje poměr mezi abundancí proteinu v taxolem ovlivněném vzorku a kontrolním vzorku (*pokračování*).

| | | |
|-------------|---------------------------------------|------|
| ACT11_ARATH | actin-11 | 0,62 |
| SCRK1_ARATH | probable fructokinase-1 | 0,62 |
| gi 15219623 | glycosyl hydrolase family 1 protein | 0,63 |
| KTNA1_ARATH | katanin p60 ATPase-containing subunit | 0,65 |
| ADK1_ARATH | adenosine kinase 1 | 0,66 |
| gi 1303695 | luminal binding protein (BiP) | 0,73 |
| gi 1303695 | luminal binding protein (BiP) | 0,75 |
| ACT7_ARATH | actin-7 | 0,75 |
| gi 15231778 | PAL2; phenylalanine ammonia-lyase | 0,75 |
| gi 21594017 | putative lectin | 0,79 |
| gi 15231715 | fructose-bisphosphate aldolase | 0,80 |
| gi 21537345 | adenylosuccinate synthetase | 0,88 |
| gi 15219412 | PGK (phosphoglycerate kinase) | 0,90 |
| gi 41080591 | 3,5-epimerase/4-reductase | 0,90 |

ZVÝŠENÁ ABUNDANCE

| | | |
|-----------|---|------|
| At1g76030 | vacuolar ATP synthase subunit B | |
| At3g20770 | ethylene-insensitive 3 (EIN3) | |
| At5g11200 | DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 56 | |
| At5g07310 | ethylene-responsive transcription factor ERF115 | |
| At1g07890 | APX1; L-ascorbate peroxidase | 1,12 |
| At1g79930 | HSP91 | 1,13 |
| At3G17390 | methionine adenosyltransferase | 1,14 |
| At3g52930 | fructose-bisphosphate aldolase | 1,19 |
| At3g22370 | alternative oxidase 1a, mitochondrial (AOX1A) | 1,24 |
| At4g14880 | cysteine synthase | 1,30 |
| At3g52880 | monodehydroascorbate reductase, putative | 1,30 |
| At4g34200 | amino acid binding /oxidoreductase, acting on the CH-OH group of donors | 1,34 |
| At5g66760 | succinate dehydrogenase [ubiquinone], putative | 1,37 |
| At2g36530 | enolase (2-phospho-D-glycerate hydrolyase) | 1,39 |
| At3g02090 | probable mitochondrial-processing peptidase subunit beta | 1,45 |
| At5g26830 | threonyl-tRNA synthetase | 1,47 |
| At4g13930 | glycine hydroxymethyltransferase, putative | 1,48 |
| At1g10895 | F-box protein | 1,50 |
| At1g57720 | probable elongation factor 1-gamma 2 | 1,50 |
| At2g43750 | cysteine synthase, chloroplast/chromoplast precursor | 1,50 |
| At2g36880 | ATP binding/methionine adenosyltransferase | 1,52 |
| At1g07890 | sec1 family protein | 1,68 |
| At4g35260 | isocitrate dehydrogenase [NAD] regulatory subunit 1, mitochondrial | 1,69 |
| At1g07890 | L-ascorbate peroxidase 1, cytosolic | 1,70 |
| At5g17920 | 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase | 1,91 |
| At5g11170 | DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 15 | 2,60 |

Tab. 14: Seznam proteinů s významně změněnou abundancí (One way Anova test, $p \leq 0,05$) po ošetření taxolem získaných ze vzorků kořenů *Arabidopsis* s využitím metod gelové proteomické analýzy (jejich název, přístupový kód a změna abundance). Změna abundance vyjadřuje poměr mezi abundancí proteinu v taxolem ovlivněném vzorku a kontrolním vzorku (*pokračování*).

| | | |
|------------|---|------|
| At3g18130 | guanine nucleotide-binding family protein/activated protein kinase C receptor (RACK1) | 2,70 |
| At1g04410 | malate dehydrogenase, cytoplasmic 1 | 2,83 |
| At1g75170 | Sec14 cytosolic factor family protein | 3,00 |
| gi 6056373 | elongation factor EF-2 | 3,03 |
| At2g45790 | phosphomannomutase | 3,71 |
| At4g20360 | elongation factor Tu, chloroplast precursor | 3,90 |
| At3g13920 | eukaryotic translation initiation factor 4A-1 | 4,00 |
| At3g08560 | VHA-E2 | 5,06 |
| At5g20010 | GTP-binding nuclear protein (RAN-1) | 6,20 |
| At3g61710 | beclin-1-like protein | 6,60 |
| At3g57150 | dyskerin putative / nucleolar protein NAP57 | 9,40 |