

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra experimentální biologie rostlin

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Zdeňka Mauzerová

Mechanismy dynamiky a nukleace

mikrotubulů v rostlinné buňce

Mechanisms of Microtubules Dynamics

and Nucleation in a Plant Cell

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Kateřina Schwarzerová, Ph.D.

Praha, 2021

Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala své školitelce RNDr. Kateřině Schwarzerové, Ph.D. za odborné vedení, přínosné rady, ochotu a neocenitelnou pomoc při psaní této práce.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 2. května 2021

.....

Podpis

Anotace

Nukleace mikrotubulů spoluurčuje organizaci této složky cytoskeletu v buňkách a významným dílem přispívá k utváření její dynamiky. V rostlinných buňkách se uplatňuje především na preexistujících mikrotubulech závislá nukleace, která se odehrává v kortikální oblasti a také v rámci dělicího vřeténka a fragmoplastu. Rekrutování γ TuRC, univerzálního konzervovaného nukleátoru, na stěnu mikrotubulů zajišťuje augmin ve spolupráci s NEDD1/GCP-WD. Funkce γ TuRC je přinejmenším při nukleaci ve vřeténku, ale zřejmě i v ostatních případech dále posilována XMAP215/MOR1, který zvyšuje jeho efektivitu svojí polymerační aktivitou, a TPX2, eventuálně jeho homology, jež jednak komplex přímo aktivuje, jednak tvorbou kondenzátu s tubulinovými dimery lokálně navyšuje jejich koncentraci, což také zvyšuje pravděpodobnost úspěšného uskutečnění nukleace. O regulačních drahách kontrolujících tento proces se toho příliš neví, s výjimkou TTP komplexu činného v kortexu. Celkově jsou znalosti o nukleaci v rostlinách spíše skrovné a informace týkající se molekulárních mechanismů fungování uvedených faktorů pocházejí převážně z výzkumu na živočišných modelech.

Klíčová slova augmin, cytoskelet, γ TuRC, mikrotubuly, nukleace, rostlinná buňka

Annotation

Nucleation of microtubules co-determines organization of this cytoskeleton component in cells and makes a significant contribution to shaping its dynamics. In plant cells, microtubules are mainly nucleated on preexisting ones and nucleation takes place in the cortex and also within the mitotic spindle and the fragmoplast. Recruiting the γ TuRC, a preserved universal nucleator, to the wall of microtubules is provided by augmin in cooperation with NEDD1/GCP-WD. The function of the γ TuRC is at least in the case of nucleation in the spindle, but apparently in other situations as well further enhanced by XMAP215/MOR1, which raises efficiency of the γ TuRC through its own polymerization activity, and TPX2, or its homologs, which for one thing, directly activates the complex and for another, locally increases concentration of tubulins by forming condensate with them, which also augments the probability of success of nucleation. Not much is known about regulatory pathways controlling this process, with the exception of the TTP complex, which is functional in the cortex. Overall, knowledge covering nucleation in plants is rather meager and information concerning the molecular mechanisms of functioning of mentioned factors comes mainly from research in animals.

Keywords augmin, cytoskeleton, γ TuRC, microtubules, nucleation, plant cell

Obsah

Seznam obrázků

Seznam tabulek

Seznam zkratk

1 Úvod	1
2 Obecné vlastnosti mikrotubulů	3
2.1 Struktura	3
2.2 Dynamika	6
3 Nukleace mikrotubulů	9
3.1 Kruhový γ -tubulinový komplex	10
3.1.1 Proteiny γ -tubulinového komplexu	10
3.1.2 Struktura γ TuRC	12
4 Regulace γTuRC	15
4.1 Regulace lokalizace γ TuRC	15
4.1.1 Umístění γ TuRC v rostlinné buňce	17
4.1.2 Význam NEDD1/GCP-WD	17
4.1.3 Význam augminu	18
4.2 Nukleace v interfázi	21
4.2.1 Augmin při nukleaci kortikálních mikrotubulů	22
4.2.2 TTP komplex	23
4.3 Nukleace v mitóze	26
4.3.1 Nukleace na jaderné membráně	27
4.3.2 Nukleace ve vřeténku	28
4.3.3 Nukleace ve fragmoplastu	36
5 Závěr	39
Literatura	41

Seznam obrázků

1	Buněčný cyklus z pohledu mikrotubulárního cytoskeletu	3
2	Hydrolyza GTP při stavbě mikrotubulů	5
3	Struktura mikrotubulu	5
4	Dynamická nestabilita mikrotubulů	6
5	Porovnání sekvencí GCPs	11
6	Konformační změna γ TuSC	12
7	Architektura γ TuRC	13
8	Sestavení γ TuRC	14
9	Augmin v lokalizaci γ TuRC na mikrotubulech	20
10	Nukleace v kortikální oblasti	23
11	Nukleace mikrotubulů na karyolemě	28
12	Nukleace v dělicím vřeténku	29
13	Doménová architektura TPX2	30
14	RanGTPázový cyklus a struktura LINC komplexu	31
15	Členění TPX2 proteinové rodiny	34
16	Role XMAP215 a TPX2 v nukleaci mikrotubulů	35
17	Expanze fragmoplastu	36

Seznam tabulek

1	Názvy komponent γ TuRC	11
2	Regulace nukleace mikrotubulů u živočichů	16
3	Členy QWRF proteinové rodiny	21
4	Kategorizace TRM proteinové superrodiny	26
5	Centrozomální homology proteinů TTP komplexu	26
6	Doménová architektura proteinů TPX2 rodiny	33
7	Funkce proteinů TPX2 proteinové rodiny	33

Seznam zkratek

AUG	AUGMIN subunit
CDK-A	cyklin-dependentní kináza A
EDE1	ENDOSPERM-DEFECTIVE 1
GAP	GTPase-activating protein
GCP	γ -tubulin complex protein
GCP-WD	γ -tubulin complex WD40 repeat protein
GDP	guanosindifosfát
GEF	guanosine nucleotide exchange factor
GIP1	GCP3-interacting protein 1
GRIP	γ -tubulin ring protein
GTP	guanosintrifosfát
γTuRC	kruhový γ -tubulinový komplex (γ -tubulin ring complex)
γTuSC	malý γ -tubulinový komplex (γ -tubulin small complex)
LINC	linker of nucleoskeleton and cytoskeleton
MAP	s mikrotubuly asociovaný protein (microtubule-associated protein)
MAP65	microtubule-associated protein 65kD
MOR1	MICROTUBULE ORGANIZATION 1
MZT	mitotic-spindle organizing protein
MTOC	microtubule-organizing center
NEDD1	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated protein 1
NES	jaderný exportní signál (nuclear export signal)
NHD	N-terminální α -helikální doména (N-terminal α -helical domain)
NLS	jaderný lokalizační signál (nuclear localization signal)
NTF2	nuclear transport factor 2
OFP	OVATE family protein
PP2A	proteinfosfatáza 2A
PPB	preprofázový prstenec (preprophase band)
QWRF	QWRF motif-containing protein
Ran	Ras-related nuclear

RanBP	Ran-binding protein
RCC1	regulator of chromosome condensation 1
SCO3	SNOWY COTYLEDON 3
TOG	tumour overexpressed gene
TON	TONNEAU
TPX2	targeting protein for Xklp2 (<i>Xenopus</i> kinesin-like protein 2)
TRM	TON1-recruiting motif protein
TSA1	TSK (TONSOKO)-associating protein 1
TTP	TON1/TRM/PP2A
XMAP215	<i>Xenopus</i> microtubule-associated protein 215kDa

Kapitola 1

Úvod

Mikrotubulární cytoskelet, tvořený soustavou mnoha dutých polarizovaných „trubiček“, představuje nepostradatelnou součást rostlinných buněk, v nichž vystupuje jako jakési multifunkční a flexibilní lešení — vazbou membránových váčků zajišťuje vezikulární transport, napojením na chromozomy zabezpečuje segregaci genetické informace při buněčném dělení, interakcí s proteinovými komplexy syntetizujícími celulózní mikrofibrily je zapojen do stavby buněčné stěny, a na ní stojící morfogeneze rostlin, asociací s buněčnými kompartmenty reguluje jejich umístění v rámci buňky a výčet by mohl pokračovat dále. Všechny tyto funkce jsou umožněny unikátním spojením dynamického charakteru mikrotubulů s jejich relativně vysokou odolností vůči deformacím.

Mikrotubuly samy o sobě vykazují komplexní chování, jež dosud uniká detailnímu obecnému pochopení, nemluvě o nuancích spojených s mikrotubulárními systémy konkrétních říš. Jakkoli je vlastní dynamika této složky cytoskeletu komplikovaná, v buňkách dochází k dalšímu stupňování této složitosti obrovským množstvím faktorů, označovaných jako MAPs (microtubule-associated proteins), které kooperativně modulují různé vlastnosti mikrotubulů — zvyšují, či snižují rychlost jejich růstu, resp. zkracování, mohou mikrotubuly stabilizovat tím, že je mezi sebou propojují a vytvářejí tak jejich svazky, nebo je dokonce přesekávají.

Jedním z dějů spojených s mikrotubuly, který podléhá striktní časové i místní kontrole, je jejich nukleace. Na rozdíl od živočichů a hub, součástí jejichž buněk jsou specializovaná centra, kde se zakládání mikrotubulů odehrává, jsou faktory katalyzující tento proces v rostlinných buňkách převážně rozesety na povrchu preexistujících mikrotubulů, z nichž se ty nové odvětvují. Ústřední roli při nukleaci hraje kruhový γ -tubulinový komplex (γ TuRC), jenž funguje jako templát pro sestavování mikrotubulů se správnou geometrií a jehož struktura byla rozluštěna ve velice nedávné době, z čehož je patrné, že poznatky o tomto důležitém dílku přispívajícím k mozaice mikrotubulární dynamiky jsou poněkud neucelené, což platí obzvlášť pro rostliny.

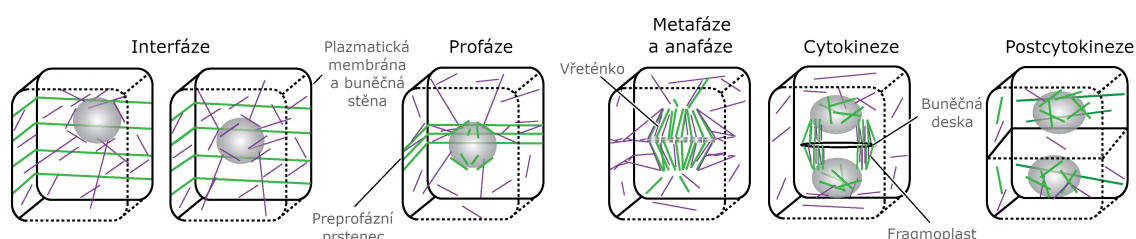
Tato práce si klade za cíl zmapovat a shrnout současné znalosti týkající se nukleace mikrotubulů v rostlinách, přičemž se zaměřuje na rostliny krytosemenné a zanedbává specifika mikrotubulární nukleace u bazálních skupin rostlin (např. nukleace mikrotubulů na plastidech).

Kapitola 2

Obecné vlastnosti mikrotubulů

Mikrotubuly, struktury, které byly v rostlinných buňkách poprvé pozorovány a popsány v 60. letech minulého století (Ledbetter et al., 1963; Ledbetter et al., 1964), jsou univerzální komponentou eukaryotických buněk, jejíž prominentní funkcí je formování dělicího vřeténka a s tím související separace chromozomů během mitotického i meiotického dělení. V rostlinných buňkách mají řadu exkluzivních funkcí: podílejí se na utváření buněčné desky, definují rovinu buněčného dělení a předurčují uspořádání buněčné stěny, čímž přispívají k ustavení specifického tvaru buněk.

Mikrotubulární systémy jsou přitom velice dynamické a v průběhu buněčného cyklu se mezi sebou přeměňují (Obrázek 1). V interfázové rostlinné buňce jsou mikrotubuly nejhojněji nacházeny v paralelním uspořádání těsně pod plazmatickou membránou, kde je jejich organizace zásadní pro depozici celulóznych mikrofibril buněčné stěny, během dělení se reorganizují a tvoří základ mitotického vřeténka a pozdějšího fragmoplastu; v ostatních částech dělicí se buňky (včetně vrstvy cytoplazmy těsně pod plazmatickou membránou) mikrotubuly přítomny nejsou.



Obrázek 1: Buněčný cyklus z pohledu mikrotubulárního cytoskeletu; zeleně jsou zobrazeny mikrotubuly, purpurově aktinová mikrofilamenta, přední a boční strana buňky (přerušovaná čára) jsou pro srozumitelnost vynechány. *Upraveno podle Livanos et al. (2019).*

2.1 Struktura

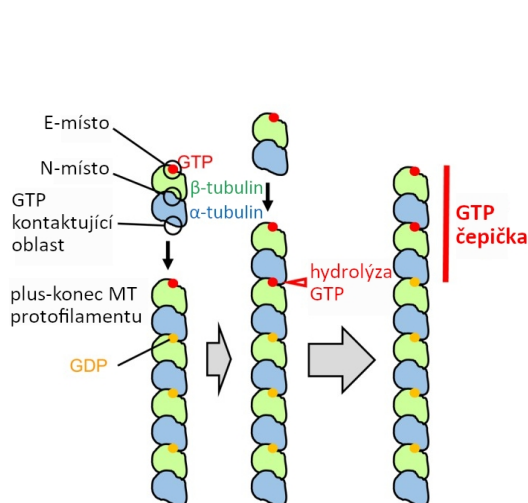
Mikrotubuly jsou duté polarizované tubulární útvary s průměrem přibližně 25 nm, které se skládají z $\alpha\beta$ -tubulinových dimerů (Feit et al., 1971; Bryan et al., 1971).

Tubuliny jsou globulární proteiny, jejichž aminokyselinové sekvence jsou vysoce konzervované napříč organizmy, což odráží význam mikrotubulů ve fungování buněk, stejně jako omezení, která klade požadavek uspořádání proteinů do dimerů a těchto dále do mikrotubulů (Ludueno et al., 1973). Existuje řada izotypů α - i β -tubulinu s mírně rozdílnými vlastnostmi, které jsou exprimovány v odlišných pletivech a také v závislosti na okolních podmínkách (Janke, 2014). Největší rozdíly mezi rozličnými izotypy jsou v oblasti hypervariabilního záporně nabitého C-konce. Sekvenční identita mezi α - a β -tubulinem dosahuje 40 % (Ponstingl et al., 1981; Krauhs et al., 1981), strukturně jsou monomery prakticky totožné (Nogales et al., 1998; Löwe et al., 2001).

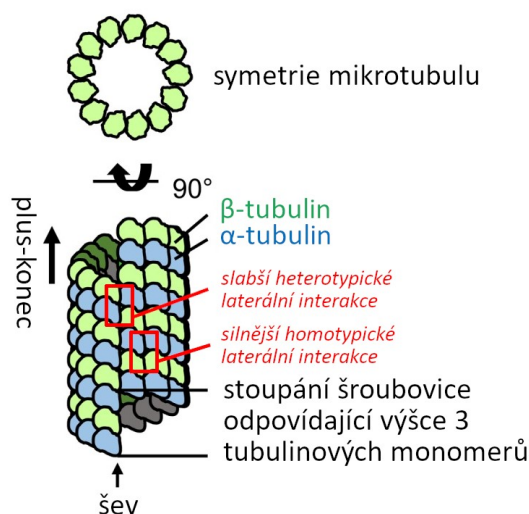
Dimer je tvořen dvojicí α -tubulin– β -tubulin spojenou způsobem hlava–ocas, přičemž každý z monomerů obsahuje vazebné místo pro guanosinový nukleotid (Stevens et al., 1967; Weisenberg et al., 1968) — vzniklý dimer tak nese v neopolymerované formě navázány dvě molekuly GTP, resp. jednu molekulu GTP a jednu molekulu GDP (Weisenberg, 1972; Berry et al., 1972; Kobayashi, 1974). Tzv. N-místo (*non-exchangeable*), náležející α -tubulinu, se nachází na rozhraní monomerů (Nogales et al., 1998), má strukturní roli, a na rozdíl od tzv. E-místa (*exchangeable*) β -tubulinu (Geahlen et al., 1977; Geahlen et al., 1979), které je u volného dimeru exponováno na povrch, zde nedochází k výměně GTP za GTP či GDP přítomné v médiu. V E-místě tak může být navázán difosfát i trifosfát v závislosti na poměru jejich koncentrací, ačkoli vazebné místo má poněkud vyšší afinitu ke GTP. Za fyziologických koncentrací tubulinů je schopen polymerace pouze GTP-tubulin, tj. tubulinový dimer s GTP v E-místě (Carlier et al., 1978).

Po zabudování tubulinového dimeru do struktury mikrotubulu je GTP v E-místě po určité době štěpeno (Kobayashi, 1975; David-Pfeuty et al., 1977), většina struktury mikrotubulu je proto tvořena, s ohledem na formu guanosinového nukleotidu v E-místě, tubulinovými dimery v GDP formě (Obrázek 2). GDP, vzniklé v E-místě po štěpení, není již dále přístupné pro výměnu s okolím (Weisenberg et al., 1976b). GTP vázané v N-místě není v průběhu polymerace a „zrání“ mikrotubulů štěpeno, resp. štěpeno být může, ale vzniklý difosfát je povětšinou regenerován na trifosfát transfosforylační reakcí prostřednictvím nukleosiddifosfátkinázy (Berry et al., 1972; Jacobs et al., 1974).

Štěpení GTP není pro polymeraci nezbytnou podmínkou (Weisenberg et al., 1976b; Arai et al., 1976), je však spojeno s konformační změnou tubulinu, která za určitých okolností umožňuje rapidní depolymeraci. V závislosti na vazbě GDP, resp. GTP v E-místě a s ohledem na to, zda je zabudován do struktury mikrotubulu, či se nachází volně jako dimer, může $\alpha\beta$ -tubulin zaujímat několik konformací (Weisenberg et al., 1976a; Buey et al., 2006; Rice et al., 2008). Neopolymerizovaný GDP-tubulin má



Obrázek 2: Hydrolýza GTP při stavbě mikrotubulů; pro přehlednost je vyobrazen samostatný protofilament, MT — mikrotubulární. *Upraveno podle Hashimoto (2015).*



Obrázek 3: Struktura mikrotubulu; guanosinové nukleotidy, navázané na příslušných místech obou tubulinů, chybí. *Upraveno podle Hashimoto (2013) a Hashimoto (2015).*

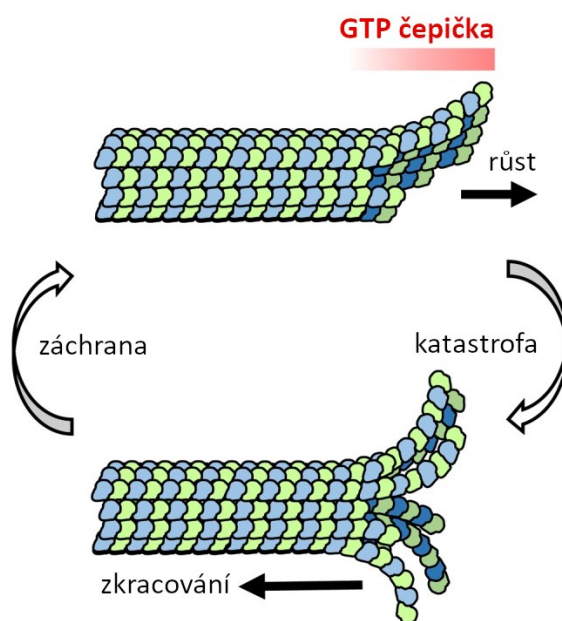
relaxovanou zakřivenou konformaci, výměna GDP za GTP způsobí částečné narovnání dimeru a po vazbě GTP-tubulinu na konec mikrotubulu dochází v důsledku laterálních interakcí s ostatními dimery ke kompletnímu napřímení (Grover et al., 1994). Právě tento proces do mikrotubulu zanáší napětí, které je příčinou rychlé depolymerace — konformační cyklus tubulinů je přímo svázán s dynamikou mikrotubulů.

Tubulinové dimery vykazují dva typy interakcí: longitudinální, které dávají vzniknout protofilamentům, „vláknům“ podélně spojených heterodimerů α - a β -tubulinu (Pease, 1963), a laterální, které umožňují spojení jednotlivých protofilamentů do finální struktury mikrotubulu (Kirschner et al., 1974). Protofilamentů je většinou 13 (Tilney et al., 1973), což je počet, při němž jsou osy celého mikrotubulu i jednotlivých protofilamentů přesně rovnoběžné (Sui et al., 2010), a skládají se do mřížky typu B (Mandelkow et al., 1986), což znamená, že monomery sousedních protofilamentů interagují homotypicky (α -monomer jednoho protofilamentu asociuje s α -monomerem protofilamentu vedlejšího) vyjma tzv. švu, jakési nepravidelnosti ve struktuře mikrotubulu, kde jsou interakce naopak heterotypické (Obrázek 3).

Protofilamenty neleží přesně vedle sebe, ale je zde jistý posun — monomery v jedné „řadě“ vytvářejí levotočivou šroubovici, která se odchyluje od roviny kolmé na osu mikrotubulu přibližně o 10° (Shelanski et al., 1968; Erickson, 1974b; Amos et al., 1974). Stoupání této šroubovice odpovídá výšce třech tubulinových monomerů (Obrázek 3).

2.2 Dynamika

Mikrotubuly jsou vysoce dynamické a jejich konce mohou stochasticky přepínat mezi dvěma fázemi (T. Mitchison et al., 1984), relativně pomalým růstem (*growth*) a překotným zkracováním (*shrinkage*); přechody mezi nimi se označují jako katastrofa, resp. záchrana (Obrázek 4). Toto chování se nazývá dynamická nestabilita a jedná se o vlastnost podmiňující fungování mikrotubulárního cytoskeletu.



Obrázek 4: Dynamická nestabilita mikrotubulů. Upraveno podle Hashimoto (2015).

O tom, v jaké fázi se v dané chvíli mikrotubul nachází, rozhoduje řada faktorů, tím hlavním je však přítomnost stabilizační čepičky, útvaru na koncích mikrotubulu, který je tvořen $\alpha\beta$ -tubulinovými podjednotkami s GTP v E-místě. Existence GTP-čepičky je umožněna rozdílnou kinetikou asociace a disociace (během fáze růstu) dimerů na koncích mikrotubulů a hydrolýzy GTP (Carrier et al., 1981; Carrier et al., 1987): rychlost přidávání, resp. odpojování podjednotek je závislá na koncentraci volných $\alpha\beta$ -tubulinů, přičemž ve fázi růstu přidávání převažuje, rychlost hydrolýzy GTP tuto závislost nevykazuje. Nejnovější model chování konců mikrotubulů (Bowne-Anderson et al., 2013) předpokládá, že hydrolýza GTP-tubulinu v mřížce nastává náhodně vyjma dimerů na úplném konci, které jsou před ní „chráněné“; zařazený tubulin má tedy určitou pravděpodobnost, že u něj dojde ke štěpení nukleotidu, která je tím větší, čím déle je součástí mřížky daného mikrotubulu.

Je-li tedy v médiu přítomno dostatečné množství volných tubulinových dimerů, dochází k jejich připojování a hydrolýza ani disociace neprobíhají dostatečně rychle na to, aby efektivně odstranily stabilizační čepičku. Přirůstající konec je tvořen stě-

nou paralelně uspořádaných, mírně vychýlených, laterálně spojených protofilamentů v různém počtu, která se po dosažení určité velikosti spojí a vytvoří strukturu dutého válce (Erickson, 1974b; Chrétien et al., 1995).

Déle rostoucí mikrotubuly mají vyšší šanci, že u nich dojde ke katastrofě (Odde et al., 1995; Gardner et al., 2011), což je spojeno s výskytem destabilizačních událostí v průběhu polymerace (Bowne-Anderson et al., 2013) souvisejících se změnou struktury GTP-čepičky (Coombes et al., 2013). U každého protofilamentu může s určitou pravděpodobností dojít k odhalení GDP-tubulinu v důsledku disociace právě zařazené podjednotky, které předchází hydrolýza pod ní umístěného GTP-tubulinu. Pokud tato situace nastane, další GTP-tubulin se již není schopen navázat, což má za následek postupné snižování počtu rostoucích protofilamentů, nebo se je schopen navázat, ale okamžitě dochází k jeho hydrolýze, což trvale destabilizuje rostoucí mikrotubul. Na začátku polymerace je tak konec víceméně tupý (žádný z protofilamentů výrazně svou délkou nepřevyšuje ostatní), s postupem času se ovšem progresivně zužuje. Zužující se konce nevykazují tak silné laterální interakce mezi protofilamenty, proto se u nich zvyšuje rychlost disociace již zařazených GTP-tubulinových podjednotek, což je spojeno se zmenšováním GTP-čepičky, které posléze může vyústit v odhalení metastabilní GDP-tubulinové mřížky.

Délka mikrotubulu se tedy může zmenšovat i v rámci fáze růstu — na konec asociují nové podjednotky a disociují od něj podjednotky již zařazené (Schek III et al., 2007); tyto fluktuace nemusí být provázeny přepnutím fáze, jedná se pouze o změny ve struktuře GTP-čepičky.

Při nižších koncentracích volných dimerů, a s postupující polymerací, převažuje disociace nejnověji přidaných podjednotek a hydrolýza GTP v nižších vrstvách, takže se na konci exponuje tubulin v GDP formě. GDP-tubulin neprojevuje tak stabilní boční interakce jako GTP-tubulin (Rice et al., 2008), a tak se rozvolňují vazby mezi protofilamenty, které se proto odchyľují od osy mikrotubulu do podoby jakýchsi rohů (Erickson, 1974a; Mandelkow et al., 1991). Nastává rapidní depolymerace, jejíž rychlost není závislá na koncentraci tubulinu v médiu (Walker et al., 1988) a vysoce převyšuje rychlost polymerace během fáze růstu. Záchrana mikrotubulů je pravděpodobně možná díky neúplné hydrolýze GTP-tubulinu, který jako pozůstatek GTP-čepičky může být přítomen v mikrotubulární mřížce (Dimitrov et al., 2008). Na těchto místech dochází ke zpomalení depolymerace a případnému obnovení růstu.

Polarita stavebních jednotek se odráží v odlišnosti dvou konců mikrotubulu, co se týče dynamické nestability (Walker et al., 1988). Za vysokých koncentrací tubulinových podjednotek polymerují oba konce, přičemž tzv. minus-konec, zakončený α -tubulinem (T. J. Mitchison, 1993), vykazuje nižší rychlost polymerace a je u něj nižší frekvence katastrof. Tato směrovost je dána asymetrií výchozí zakřivené konformace volných

dimerů, která zapříčiňuje, že GTP, nezbytné pro polymeraci, se na koncích s prakticky stejnou afinitou pro volné $\alpha\beta$ -tubuliny (Walker et al., 1988) nachází v jiném strukturálním kontextu (Rice et al., 2008). Během fáze depolymerace je minus-konec relativně stabilní (Walker et al., 1988; Tran et al., 1997) a je u něj vyšší frekvence záchran; od plus-konce, zakončeného β -tubulinem, GDP-tubulin rychle disociuje.

Konsekvencí rozdílného chování konců mikrotubulu z hlediska kinetiky je možnost dosažení ustáleného stavu, kdy probíhají procesy polymerace a depolymerace na opačných koncích (Margolis et al., 1978). Na plus-konec se připojují tubulinové podjednotky (Dentler et al., 1974; Carlier et al., 1981), „putují“ směrem k minus-konci a zde se uvolňují — tento děj se označuje jako tzv. treadmilling.

In vitro je polymerace tubulinových dimerů závislá především na teplotě, koncentraci samotného tubulinu, GTP, GDP a vápenatých a hořečnatých iontů (Gaskin et al., 1974; Olmsted et al., 1973), přičemž přítomnost vápenatých iontů inhibuje přirůstání mikrotubulů, naopak hořečnaté ionty jej podporují (Weisenberg, 1972; Borisy et al., 1972). Přítomnost GDP v médiu má inhibiční účinek, jehož příčina tkví jednak ve snižování koncentrace GTP-tubulinu, jednak ve výměně GTP v E-místě již zařazených tubulinových dimerů za GDP, což má za následek neschopnost vazby dalších podjednotek (Carlier et al., 1982). V živých systémech je tento proces regulován řadou dalších faktorů (Weingarten et al., 1975; Carlier et al., 1982), což umožňuje výrazně modulovat dynamiku mikrotubulů v rámci fyziologických podmínek buňky bez nápadné změny výše uvedených parametrů. Regulace dynamiky mikrotubulů a samostatných podjednotek probíhá rovněž na úrovni posttranslačních modifikací (Janke et al., 2011).

Kapitola 3

Nukleace mikrotubulů

Kinetika „zakládání“ nových mikrotubulů, tzv. nukleace, je závislá na koncentraci neopolymerovaných jednotek (Weisenberg et al., 1976a; Olmsted et al., 1973; Gaskin et al., 1974). Oligomery $\alpha\beta$ -tubulinů jsou pod určitou velikostí nestabilní — růst převládá až ve chvíli, kdy dosáhne nukleační jádro kritické velikosti (Rice et al., 2008). V živých systémech není koncentrace tubulinu dostatečná pro zajištění spontánní nukleace, proto zde existují mikrotubuly organizující centra (MTOCs) seskupující faktory, které tento děj katalyzují a následně také stabilizují a ukotvují minus-konce rostoucích mikrotubulů. Výskyt těchto nukleátorů na specifických místech v buňce a jejich aktivace v závislosti na fázi buněčného cyklu umožňují precizní regulaci organizace různých mikrotubulárních systémů (J. Wu et al., 2017).

Existence nukleačních center byla poprvé naznačena v 70. letech minulého století (Borisy et al., 1972), kdy byly elektronovým mikroskopem v extraktu z prasečího mozku (bohatý zdroj tubulinových proteinů) pozorovány struktury připomínající disk, jejichž přítomnost výrazně zkracovala lag fázi při polymeraci tubulinu; později se však ukázalo, že se nejedná o konstrukty iniciující vznik mikrotubulů, ale o tubulinové agregáty fungující jako nukleační zrna (Erickson, 1974b). C. E. Oakley et al. (1989) však posléze identifikovali nový člen tubulinové superrodiny, γ -tubulin, který se ukázal být univerzální, napříč organizmy konzervovanou (Zheng et al., 1991; Stearns et al., 1991) komponentou MTOCs nezbytnou pro nukleaci a ustavení polaritu mikrotubulů (B. R. Oakley et al., 1990; Horio et al., 1991; B. R. Oakley, 1992; Kollman et al., 2010; Kollman et al., 2011; Kollman et al., 2015).

γ -tubulin stejně jako ostatní příslušníci tubulinové superrodiny váže guanosinový nukleotid, který může být vyměňován s okolím (Oegema et al., 1999), jakou roli plní jeho hydrolýza však není zcela jasné. Vazba GTP na γ -tubulin pravděpodobně reguluje sílu interakce s $\alpha\beta$ -tubulinovým dimerem a je nezbytná pro nukleaci mikrotubulů *in vivo* (Gombos et al., 2013). Jeho hydrolýza možná, podobně jako v případě β -tubulinu, kontroluje dynamiku mikrotubulů.

Struktura γ -tubulinu se do značné míry shoduje se strukturou α - a β -tubulinu (Aldaz et al., 2005), což už samo o sobě naznačuje jeho možnou funkci při zakládání mikrotubulů. U *Arabidopsis thaliana* je γ -tubulin kódován dvěma paralogními geny s redundantní funkcí (B. Liu et al., 1994); down regulace nebo knockout obou má za následek závažné změny v organizaci mikrotubulů a je letální (Binarová et al., 2006; Pastuglia et al., 2006).

3.1 Kruhový γ -tubulinový komplex

γ -tubulin (také označovaný jako GCP1, Tabulka 1) je u vyšších eukaryot součástí tzv. kruhového γ -tubulinového komplexu (γ TuRC) (Zheng et al., 1995), který dále obsahuje protein MZT1 (mitotic-spindle organizing protein 1) (Janski et al., 2008; Hutchins et al., 2010; Nakamura et al., 2012; Janski et al., 2012), jenž je u *Arabidopsis* kódován dvěma vysoce homologními geny s redundantní funkcí, a pět vzájemně příbuzných proteinů γ -tubulinového komplexu (GCP2 až GCP6, Obrázek 5) (Murphy et al., 1998; Fava et al., 1999; Murphy et al., 2001). U druhoústých přispívají ke konstrukci γ TuRC také proteiny MZT2A a MZT2B, ty však u rostlin chybí (Teixidó-Travesa et al., 2010). Na živočišném modelu byla rovněž prokázána přítomnost aktinu podobného proteinu v γ TuRC (P. Liu et al., 2020; Wieczorek et al., 2020b; Consolati et al., 2020).

Netubulinové proteiny vytvářejí jakýsi rámec, na který je na proximální straně navázán γ -tubulin tak, že vzniká základ šroubovice s charakteristikami přibližně odpovídajícími mikrotubululární mřížce (Zheng et al., 1995; Moritz et al., 2000; Kollman et al., 2010). Počet přístupných γ -tubulinů v γ TuRC určuje počet protofilamentů začínajícího mikrotubulu (Zheng et al., 1995). γ TuRC zároveň svojí vazbou blokuje růst na minus-konci, čímž na něm tvoří jakousi stabilizační čepičku (Zheng et al., 1995).

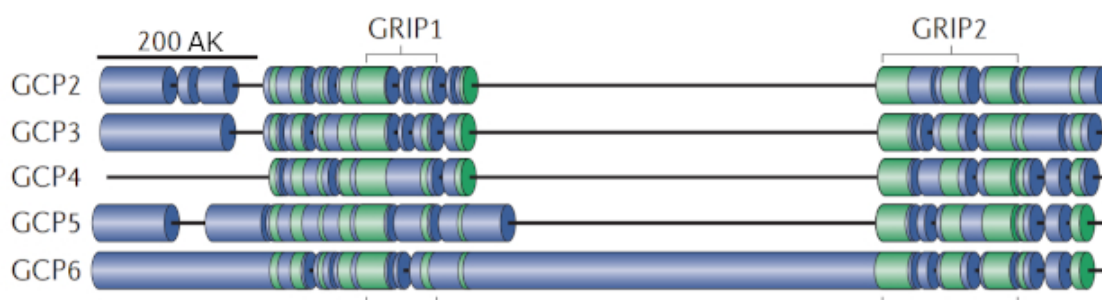
3.1.1 Proteiny γ -tubulinového komplexu

Všechny GCPs jsou schopné konzervovaným motivem v C-terminální doméně označovaným jako GRIP2 (γ -tubulin ring protein 2) vázat γ -tubulin (Gunawardane et al., 2000; Guillet et al., 2011) a navzdory příbuznosti a podobné struktuře (Guillet et al., 2011) nejsou redundantní, což lze nepřímým dokumentovat striktně danou stechiometrií těchto stavebních kamenů v γ TuRC (Murphy et al., 2001; Wieczorek et al., 2020b; Consolati et al., 2020; P. Liu et al., 2020), stejně jako sníženým počtem komplexů při depleci některého z GCP (Vérollet et al., 2006). N-terminální doména obsahuje konzervovanou oblast zprostředkovávající laterální interakce jednotlivých variant mezi sebou (GRIP1 motiv). Identitu dílčích GCPs definují (s výjimkou GCP4, jenž je postrádá) specifická N-koncová prodloužení a inserce mezi konzervovanými motivy

Komponenta γ TuRC	Doporučovaný název	Alternativní názvy
γ -tubulin	tubulin gamma-1 chain	gamma-1-tubulin
	tubulin gamma-2 chain	gamma-2-tubulin
GCPs		GCP1
		SPR3
	AtGCP2	AtSpc97
	AtGCP3	AtSpc98
	AtGCP4	
	AtGCP5	není
	AtGCP6	
MZT1	MZT1A	MOZART1/AtGIP1A
		AtGIP2
	MZT1B	MOZART1B/AtGIP1B
		AtGIP1

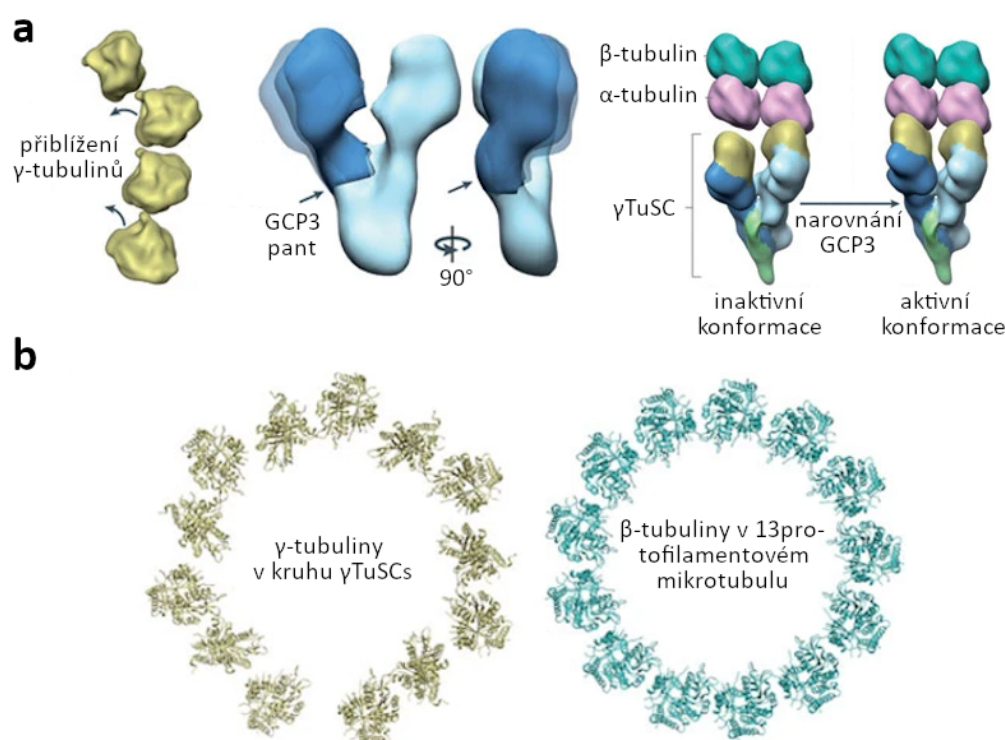
Tabulka 1: Doporučované a alternativní názvy komponent γ TuRC u *Arabidopsis thaliana*; GCP — γ -tubulin complex protein, SPR3 — SPIRAL 3, Spc — Spindle pole body component, MZT — mitotic-spindle organizing protein, MOZART — mitotic-spindle organizing protein associated with a ring of γ -tubulin, GIP — GCP3-interacting protein. Zdroj: „UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021“ (2021)

GRIP1 a GRIP2 (Obrázek 5) (Guillet et al., 2011); tyto oblasti jsou příčinou specifických interakcí s ostatními podjednotkami a určují pozici příslušných GCPs v komplexu (Farache et al., 2016).



Obrázek 5: Porovnání sekvencí GCPs (zelená reprezentuje více konzervované oblasti GCPs, modrá naopak regiony konzervované méně); AK — aminokyseliny, GRIP — γ -tubulin ring protein, GCP — γ -tubulin complex protein. Upraveno podle Kollman et al. (2011).

Proteiny GCP2 a GCP3 se s γ -tubulinem skládají do podoby tzv. malých γ -tubulinových komplexů (γ TuSCs) (Moritz et al., 1998; Oegema et al., 1999; Seltzer et al., 2007), které představují stavební podjednotky γ TuRC. Vzniklý heterotetramer má tvar písmene Y (Kollman et al., 2008) — tělo sestává z N-koncových oblastí GCP2 a GCP3, C-konce tvoří spodní části ramen, na která se váže γ -tubulin. γ -tubuliny tedy nejsou v uspořádání umožňujícím laterální interakce vznikajících protofilamentů, což podmi-



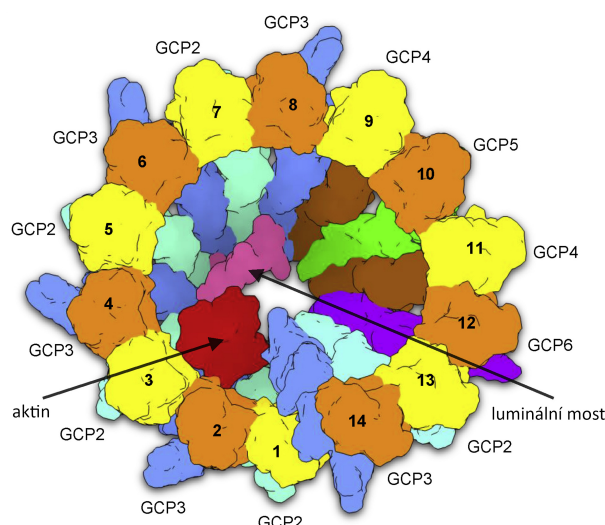
Obrázek 6: Konformační změna γ TuSC po inkorporaci do γ TuRC. **a** Model konformační aktivace γ TuSC narovnáním GCP3. **b** Porovnání pozic γ -tubulinů v kruhu γ TuSCs a β -tubulinů v sestaveném mikrotubulu názorně ukazuje nekompetenci samostatných γ TuSCs iniciovat polymeraci mikrotubulů; GCP3 — γ -tubulin complex protein 3, γ TuSC — γ -tubulin small complex. *Upraveno podle Kollman et al. (2011).*

ňuje nízkou nukleační aktivitu samostatného γ TuSC. Při sestavení do γ TuRC dochází ke změně konformace GCP3, narovnání jeho flexibilního raménka, které je umožněno přítomností „pantu“ mezi C- a N-terminální doménou (Obrázek 6). Tento pohyb přiblíží molekuly γ -tubulinu na vzdálenost podobnou té mezi $\alpha\beta$ -tubulinovými dimery v mřížce mikrotubulu (Choy et al., 2009; Kollman et al., 2010; Kollman et al., 2015).

GCP4, GCP5 a GCP6 interagují mezi sebou (Xiong et al., 2009) a jejich komplex je také přímo zainkorporován do kruhové struktury γ TuRC (Guillet et al., 2011; Kollman et al., 2011; Farache et al., 2016).

3.1.2 Struktura γ TuRC

Nejnovější modely (P. Liu et al., 2020; Wiczorek et al., 2020b; Consolati et al., 2020) ukazují γ TuRC jako asymetrický kužel sestávající ze 14 strukturně podobných paprsků uspořádaných do otevřené levotočivé spirály (Obrázek 7). Každý paprsek odpovídá GCP s navázaným γ -tubulinem; jednotlivé varianty GCPs zauímají v rámci struktury přesně dané pozice, díky čemuž má komplex uniformní sekvenci GCP(2–3)₄–GCP4–GCP5–GCP4–GCP6–(GCP2–3). GCP2 v pozici 1 a GCP3 v pozici 14



Obrázek 7: Schématické znázornění architektury γ TuRC; GCP — γ -tubulin complex protein, γ TuRC — γ -tubulin ring complex. *Upraveno podle P. Liu et al. (2021).*

jsou umístěny nad sebou, což v celkovém kontextu γ TuRC dává vzniknout stoupání adekvátnímu šroubovici mikrotubulu a definuje postavení švu — v místě přesahu spolu laterálně interagují γ - a α -tubulin, což má význam ve stabilizaci slabšího laterálního kontaktu α -tubulin– β -tubulin. Toto uspořádání γ TuRC předurčuje, že v živých systémech mají mikrotubuly téměř výhradně 13 protofilamentů (Tilney et al., 1973).

Podjednotky 1–8, sestavené v γ TuSCs, spolu těsně interagují a zaujímají „uzavřenou“ konformaci, jejíž geometrie se shoduje s mřížkou mikrotubulu (Kollman et al., 2015), naproti tomu podjednotky 9–14 interagují pouze na špičce kužele a jsou flexibilnější — radiálně se odchyľují od středu struktury a vzniklá „otevřená“ konformace odpovídá neaktivní formě γ TuSC. γ TuRC tedy ve výchozím stavu nemá striktně helikální symetrii a je proto geometricky nevhodný jako templát pro nukleaci mikrotubulu. Aktivace je spojena se „stažením“ spirály γ TuRC, které vede k částečnému přeskupení γ -tubulinů, jehož výsledkem je jejich jednotné rozložení kompatibilní s mikrotubulární symetrií.

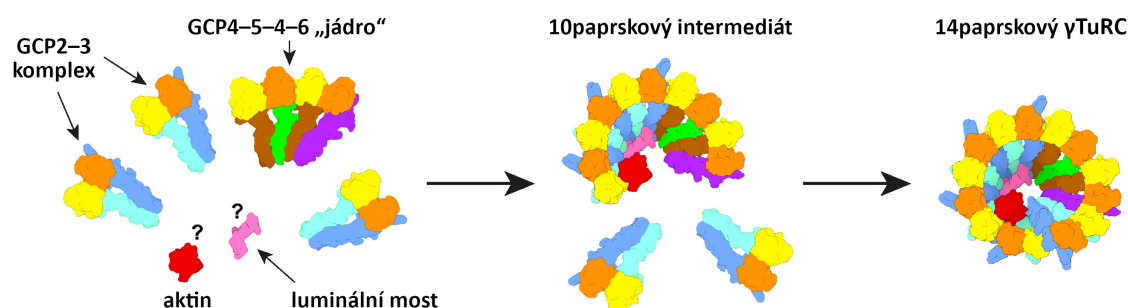
Inkorporace GCP4–6 tedy zjevně umožňuje sestavit kompletní, avšak neaktivní γ TuRC, který může být následně konformační změnou vynucenou interakčními partnery přímo převeden na aktivní formu. Tento princip umožňuje daleko rychlejší a dynamičtější regulaci nukleace mikrotubulů. Specifické podjednotky γ TuRC navíc zřejmě tvoří jádro, na němž dochází k sestavení celého komplexu (Obrázek 8) (Haren et al., 2020) — část N-terminálního prodloužení GCP6 tvoří α -helix, tzv. GCP6 pás, který z luminální strany interaguje s γ TuSCs na pozicích přibližně 3–6 (Wieczorek et al., 2020a), inzerční doména GCP6 udržuje GCP2 v pozici 13.

V dutině uvnitř γ TuRC je coby strukturní komponenta přítomen aktinu podobný protein (Obrázek 7) (P. Liu et al., 2020; Wieczorek et al., 2020b; Consolati et al., 2020),

který přímo interaguje s γ -tubulinem navázaným na GCP3 v pozici 2, čímž pravděpodobně stéricky blokuje další oligomerizaci. Aktin je součástí tzv. luminálního mostu, jenž tvoří „zátku“ na bázi celé struktury a dále zahrnuje dva komplexy proteinu MZT1 (Wieczorek et al., 2020a). Jedna kopie MZT1 asociuje s N-koncovou α -helikální doménou (NHD) GCP3 na pozici 6, druhá interaguje s aktinu podobným proteinem a GCP6-NHD. Luminální most poskytuje rozsáhlé možnosti protein-proteinových interakcí, které mohou ustalovat komplex a modulovat jeho funkci. MZT/GCP-NHD podobný komplex také zřejmě stabilizuje přesah γ TuRC.

Na vnějším obvodu komplexu mohou být skrze příslušné NHDs navázány další kopie MZT1, příp. u druhoustých MZT2, což buňce dovoluje regulovat umístění γ TuRC (Wieczorek et al., 2020a; Huang et al., 2020). Přesné mechanismy, které ovlivňují promiskuitu těchto interakcí, dosud nejsou zcela známy.

Výše uvedené poznatky o detailní struktuře γ TuRC byly získány na základě analýz komplexu u člověka (Wieczorek et al., 2020b; Consolati et al., 2020) a *Xenopus laevis* (P. Liu et al., 2020), rostliny ovšem s výjimkou proteinu MZT2, který tvoří subkomplexy na vnějším povrchu, obsahují homology všech avizovaných složek γ TuRC, což poukazuje na to, že získané znalosti by mohly být minimálně zčásti aplikovatelné i na γ TuRC vyskytující u rostlin.



Obrázek 8: Sestavení γ TuRC. GCP4–GCP5–GCP4–GCP6 tvoří jádro, které nejprve rekrutuje tři kopie GCP(2–3), čímž vzniká 10paprskový intermediát (role aktinu a luminálního mostu při sestavování γ TuRC je spekulativní), následně se přidávají další dvě kopie GCP(2–3) a vytváří se kompletní γ TuRC; GCP — γ -tubulin complex protein, γ TuRC — γ -tubulin ring complex. Upraveno podle P. Liu et al. (2021).

Kapitola 4

Regulace γ TuRC

V živočišných buňkách se γ TuRC předsestavuje v cytoplazmě (Cota et al., 2017), potřeba prostorové kontroly nad nukleací ovšem zároveň vyžaduje, aby byl tento proces oddělen od směřování γ TuRC na místo nukleace (neúplně sestavené komplexy či subkomplexy γ TuRC nejsou rekrutovány do MTOCs) a jeho aktivace (náležitě sestavené γ TuRCs jsou aktivní pouze v kontextu MTOCs). Tento princip skýtá výhodu velice rychlé reakce na náhlé změny v požadavcích na množství aktivních nukleátorů, které nastávají například při vstupu do mitózy. Že by podobný systém mohl fungovat i v rostlinných buňkách, naznačuje výskyt γ TuRCs v cytoplazmě okolo jádra a v blízkosti plazmatické membrány (hlavní rostlinná MTOCs) (Seltzer et al., 2007; D. Ma et al., 2020) i konzervovanost klíčových součástí γ TuRC a s ním asociovaných faktorů.

Ústředním elementem z hlediska regulace funkce γ TuRC je MZT1, který jednak specificky rozeznává intaktní γ TuRC skrze vazbu několika jeho podjednotek, jednak zprostředkovává interakci komplexu s dalšími regulačními faktory (Cota et al., 2017). γ TuRC se sestavuje i v nepřítomnosti MZT1, ovšem je pozměněná jeho aktivita a lokalizace (Cota et al., 2017; Nakamura et al., 2012). Vyřazení tohoto proteinu z funkce je u *Arabidopsis thaliana* letální (Janski et al., 2012; Nakamura et al., 2012), z čehož lze usuzovat na jeho význam pro činnost γ TuRC.

Rostliny postrádají řadu faktorů, které jsou nezbytné pro regulaci funkce γ TuRC v živočišných systémech (Tabulka 2) — lze předpokládat, že u nich fungují jiné proteiny, které dosud čekají na odhalení (Yamada et al., 2017).

4.1 Regulace lokalizace γ TuRC

V rostlinných buňkách se odehrává nukleace mikrotubulů na odlišných místech v závislosti na buněčném cyklu, vývojovém stádiu a enviromentálních podmínkách (Erhardt et al., 2002; Seltzer et al., 2003). Typická MTOCs, jako jsou centrozómy u živočichů a pólová tělíska u kvasinek, zde chybí; za jejich ekvivalent lze považovat jádro,

Lokace	Faktor	Funkce			
		S	K	A	M
Centrozóm	AKAP450/AKAP9/GC-NAP	✓	✓		
	CDK5RAP2/Cnn/Cep215	✓		✓	
	Cep192		✓		
	CM-MMG	✓			
	MZT2A/B	✓			
	ninein		✓		
	NME7			✓	
	pericentrin	✓	✓		
	Plk1				✓
Chromatin	HURP				✓
	RHAMM		✓		
Preexistující mikrotubuly	Plk1				✓

Tabulka 2: Proteiny regulující nukleaci mikrotubulů v živočišných buňkách a chybějící u rostlin. Faktory mohou regulovat funkci γ TuRC různým způsobem, S — směřování γ TuRC na příslušné místo, K — kotvení γ TuRC, A — aktivace γ TuRC, M — modulace aktivity γ TuRC; AKAP450/AKAP9/CG-NAP — A-kinase anchoring protein 450/9/centrosome- and golgi-localized protein kinase N-associated protein, CDK5RAP2/Cnn/Cep215 — cyclin-dependent kinase 5 regulatory subunit-associated protein 2/centrosomin/centrosomal protein 215, Cep192 — centrosomal protein 192, CM-MMG — centrosomin motif-myomegalin, MZT2A/B — mitotic-spindle organizing protein 2A/B, NME7 — non-metastatic cells 7, Plk1 — Polo-like kinase 1, HURP — hepatoma up-regulated protein, RHAMM — receptor for hyaluronan-mediated motility. Zdroje: J. Wu et al. (2017), Sulimenko et al. (2017) a Yamada et al. (2017)

na jehož povrchu dochází k nukleaci mikrotubulů při nástupu mitózy (Stoppin et al., 1994), a plazmatickou membránu, v jejíž bezprostřední blízkosti jsou mikrotubuly příležitostně nukleovány v průběhu interfáze (Cyr et al., 1995; Shaw et al., 2003).

Převažujícím nukleačním módem je bezesporu na mikrotubulech závislá nukleace mikrotubulů (Murata et al., 2005), při níž nejsou γ TuRCs akumulovány na jednom místě, ale jsou rekrutovány na stěnu preexistujících mikrotubulů, kde je poté iniciována polymerace. Tento typ nukleace se uplatňuje ve všech rostlinných mikrotubulárních systémech a bez výjimky je závislý na dvou lokalizačních faktorech — NEDD1/GCP-WD (neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated protein 1/ γ -tubulin complex WD40 repeat protein) a augminu — jež spolupracují pro zaručení správného umístění γ TuRC. Augminový komplex, NEDD1/GCP-WD a γ TuRC tedy fungují jakožto ústřední kontrolní modul nukleace mikrotubulů v rostlinách (Tian et al., 2019).

4.1.1 Umístění γ TuRC v rostlinné buňce

Distribuce γ TuRC v buňce se mění především v souvislosti s buněčným cyklem (B. Liu et al., 1993; B. Liu et al., 1995; Nakamura et al., 2010).

Během interfáze a preprofáze je γ TuRC rekrutován do kortikální oblasti a objevuje se převážně podél zde přítomných mikrotubulů, a to po celé jejich délce (Murata et al., 2005); méně často probíhá nukleace i na místech neasociovaných s existujícími mikrotubuly (Shaw et al., 2003; Chan et al., 2009; Nakamura et al., 2010).

Při vstupu do mitózy je γ TuRC zřetelný v preprofázovém prstenci (PPB), zároveň dochází k jeho relokizaci na povrch jádra, kde se postupně koncentruje na protilehlých stranách — vytváří tzv. polární čepičky, které představují póly profázového vřeténka.

V metafázi lze γ TuRC detekovat jak v difúzních pólech dělicího vřeténka, tak i podél kinetochorových vláken, přičemž jeho množství se progresivně zvyšuje směrem k pólům (B. Liu et al., 1995; Miao et al., 2019). Kinetochorové mikrotubuly jsou dekorovány γ -tubulinem i během anafáze, což vede k jeho postupnému hromadění na pólech; naopak ve střední zóně, kde se svazkují interzonální mikrotubuly, γ -tubulinový komplex zpočátku chybí.

S postupující telofází se γ TuRC přesouvá na mikrotubuly vyvíjejícího se fragmoplastu, neobsazuje však jejich plus-konce, kde se tvoří buněčná deska. V nižším počtu je také přítomen na distálních stranách dceřiných jader.

4.1.2 Význam NEDD1/GCP-WD

NEDD1/GCP-WD je konzervovaný protein (Gunawardane et al., 2003), který se skrze vazbu MZT1 (Hutchins et al., 2010; Cota et al., 2017) periferně napojuje na γ TuRC, což dokazuje jeho kolokalizace s komplexem napříč buněčným cyklem (Zeng et al., 2009; Walia et al., 2014).

NEDD1/GCP-WD obstarává rekrutování γ TuRC na místa nukleace, ale dále nemá vliv na schopnost komplexu nukleovat (Walia et al., 2014). V *Arabidopsis thaliana* je NEDD1/GCP-WD nezbytný pro správnou organizaci mikrotubulů (Zeng et al., 2009; Walia et al., 2014) a jeho mutace je letální.

Tento faktor také ovlivňuje režim nukleace γ TuRC — zda „dceřiný“ mikrotubul bude ležet rovnoběžně s „mateřským“, či zda bude vzniklá struktura větvená — je tedy pravděpodobně jedním z cílů signalizačních drah regulujících nukleaci (Walia et al., 2014). U živočichů bylo prokázáno, že NEDD1/GCP-WD podléhá posttranslačním modifikacím (X. Zhang et al., 2009; Sdelci et al., 2012; Pinyol et al., 2013), u rostlin však tento fenomén zatím nebyl studován.

4.1.3 Význam augminu

Role NEDD1/GCP-WD ve směřování γ TuRCs na konkrétní místa v buňce je zčásti zajištěna augminem, který byl identifikován ve screenech mutantů *Drosophila melanogaster* jako faktor nezbytný pro sestavení dělicího vřeténka (Goshima et al., 2007).

Jedná se o 8podjednotkový komplex, který se vyskytuje v celé eukaryotní říši (Goshima et al., 2008; Lawo et al., 2009; Ho et al., 2011; Hotta et al., 2012; Nakaoka et al., 2012) a má konzervovanou funkci — zprostředkovává vazbu γ TuRCs na stěnu mikrotubulů, kde následně může dojít k iniciaci polymerace (Song et al., 2018). Samotný augmin skutečně funguje pouze jako lokalizační faktor, na stimulaci nukleace mikrotubulu z γ TuRC se nepodílí. V souladu s jeho úlohou se umístění augminu v daných pozicích shoduje s γ TuRC a NEDD1/GCP-WD (Hotta et al., 2012; T. Liu et al., 2014).

U rostlin nesou proteiny augminového komplexu označení AUG1–8 (AUGMIN subunit 1–8); z těchto osmi jsou AUG1–6 relativně dobře konzervované, AUG7 a AUG8 jsou ke svým protějškům v ostatních organizmech homologní velmi vzdáleně (Kuhn et al., 2014) a lze je považovat za rostlinně specifické podjednotky augminu (Hotta et al., 2012). V *Arabidopsis thaliana* jsou všechny AUG s výjimkou AUG8 kódovány jediným genem, což se projevuje vážnými poruchami mitózy a cytokineze v případech jejich ztrátových mutací — AUG1–6 jsou esenciální (Ho et al., 2011; Hotta et al., 2012; Oh et al., 2016), rostliny postrádající AUG7 sice přežívají, ale vykazují výrazné mutantní fenotypy.

Mutace v augminových proteinech

U mutantních rostlin je poškozený mikrotubulární cytoskelet z hlediska počtu mikrotubulů i jejich uspořádání, na čemž lze dokumentovat význam na mikrotubulech závislé nukleace mikrotubulů v rostlinách.

Nejnápadněji se mutace v genech pro augminové podjednotky projevují během buněčného dělení, kdy je na rozdíl od wild-typu γ TuRC víceméně rovnoměrně rozptýlen v cytoplazmě (Ho et al., 2011; Hotta et al., 2012; Lee et al., 2017); v profázi sice je γ TuRC nabohacený v okrsku pólů profázového vřeténka, ale netvoří se zřetelné polární čepičky. Mutanti mají roztažené póly dělicího vřeténka a mikrotubuly ve vřeténku se nesblíhají, ale jsou různě protažené směrem ke krajům buňky, což souvisí i s celkovým prodloužením vřeténka. Navíc je narušená pozice chromozomů v ekvatoriální rovině (Lee et al., 2017). Mikrotubuly fragmoplastu jsou rovněž delší a nedochází na nich k akumulaci γ TuRC, který je výrazněji detekován na reformujícím se jaderném obalu dceřiných buněk (Lee et al., 2017).

Kortikální síť mikrotubulů mutantních buněk je uspořádána do robustních svazků (T. Liu et al., 2014), výrazně se snižuje počet nukleovaných mikrotubulů a převažuje svazkující nukleace (viz 4.2 Nukleace v interfázi).

Struktura augminového komplexu

Organizace podjednotek v augminovém komplexu byla doposud studována na lidském modelu (Hsia et al., 2014), v *Drosophila melanogaster* (Chen et al., 2017) a *Xenopus laevis* (Song et al., 2018), a ačkoli tyto studie zcela neozřejmily princip funkce augminu, lze z nich vyvodit závěry pravděpodobně platné i pro rostliny.

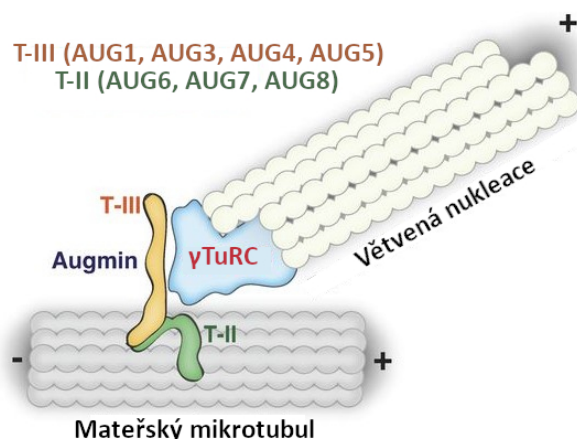
AUG1–8 se skládají do heterooktameru — každý z proteinů je přítomen v jedné kopii (Hsia et al., 2014). Komplex má délku přibližně 40 nm a zaujímá tvar písmene Y, ramena však nejsou stejně dlouhá a mohou vůči sobě být různě orientována, což naznačuje, že vazba mezi γ TuRC a augminem nabývá rozličných forem spojených s jinými iniciačními úhly nukleace (Tian et al., 2019).

AUG6 patrně tvoří jádro, na němž se celý komplex sestavuje (Hsia et al., 2014; Song et al., 2018), zároveň tato podjednotka svou C-terminální doménou interaguje s NEDD1/GCP-WD (Zhu et al., 2008; Uehara et al., 2009). Vazby γ TuRC přes NEDD1/GCP-WD se mimo AUG6 nejspíš také účastní heterodimer AUG3/AUG5 N-koncovými oblastmi obou proteinů (Chen et al., 2017).

Augmin je složen ze dvou subkomplexů, AUG1/AUG3/AUG4/AUG5 (T-III) a AUG6/AUG7/AUG8 (T-II). AUG2 možná zajišťuje spojení subkomplexů, nebo vystupuje jako periferní podjednotka (Song et al., 2018). T-II se přímo váže na stěnu mikrotubulu N-koncovou doménou AUG8 (G. Wu et al., 2008) a je sám o sobě flexibilní — v důsledku kontaktu s T-III v augminovém holokomplexu zaujímá konformaci připomínající písmeno V; T-III tvoří „nožku“ augminového Y a směřuje od mikrotubulu v kolmém směru (Obrázek 9). Oba subkomplexy spolupracují při vazbě γ TuRC.

AUG8 a jeho homology

U rostlin došlo ke zmnožení genu pro podjednotku augminového komplexu fungující jako s mikrotubuly asociovaný protein (MAP) — AUG8 je členem rostlinně specifické QWRF proteinové rodiny (aminokyselinový motiv QWRF v C-terminální oblasti), která dále zahrnuje například EDE1/QWRF5 (ENDOSPERM-DEFECTIVE 1) či SCO3/QWRF1 (SNOWY COTYLEDON 3) (Pignocchi et al., 2009; Albrecht et al., 2010) (Tabulka 3). Tyto proteiny sdílejí schopnost interakce s mikrotubuly prostřednictvím jejich N-konce, který však paradoxně není příliš sekvenčně konzervovaný (Lee et al., 2017) — sekvenční rozmanitost patrně usnadňuje selektivní a preferenční vazbu daného QWRF proteinu na mikrotubuly konkrétního mikrotubulárního systému.



Obrázek 9: Model pro augminem zprostředkovanou lokalizaci γ TuRC na mikrotubulech; γ TuRC — γ -tubulin ring complex, AUG — AUGMIN subunit. Upraveno podle Song et al. (2018).

C-konec AUG8 v augminovém komplexu přímo interaguje s AUG6 (Hsia et al., 2014) a stejný typ vazby byl prokázán i u EDE1 (Lee et al., 2017), který během buněčného dělení představuje podjednotku augminového komplexu, v němž nahrazuje AUG8. Oproti AUG8, mutace v jehož genu nemá v mitóze výrazný projev (Hotta et al., 2012), je EDE1 esenciální (Pignocchi et al., 2009) a jeho absence vede k malfunkci dělicího vřeténka a fragmoplastu (Lee et al., 2017). Exprese EDE1 je striktně závislá na buněčném cyklu — jeho přítomnost v buňce je omezena pouze na buněčné dělení (Pignocchi et al., 2009).

Vyjma EDE1 a AUG8 nebyla souvislost členů QWRF proteinové rodiny s augminem dosud studována, ačkoli sekvenční podobnost naznačuje jejich funkci ve skládání augminového komplexu (Lee et al., 2017). D. Ma et al. (2020) u mutantu *qwrflqwrfl2* pozorovali defekty v uspořádání kortikální mikrotubulární sítě u epidermálních buněk okvětních lístků a nitek tyčinek připomínající mutace v podjednotkách augminu a prokázali schopnost vazby SCO3/QWRF1 a QWRF2 na mikrotubuly, další výzkumy však musí potvrdit, zda jsou tyto proteiny skutečně podjednotky augminu během generativní fáze rostlin.

Augminové komplexy s rozličnými izoformami AUG8 se tedy nejspíš skládají na mikrotubulech odlišných mikrotubulárních systémů (Lee et al., 2017) a nestejné sekvence jejich N-konců mohou vést ke konformačním rozdílům, které ovlivňují úhel větvení poté, co se augminový komplex napojí na stěnu mikrotubulu, kam rekrutuje γ TuRC — augmin nesoucí EDE1 je v rámci dělicího vřeténka a fragmoplastu zodpovědný za tvorbu dceřiných mikrotubulů, které zaujímají ostrý úhel k mikrotubulu mateřskému, zatímco komplex obsahující AUG8 umožňuje v interfázi nukleaci nových mikrotubulů v úhlu okolo 40° k preexistujícímu (viz 4.2 Nukleace v interfázi).

Člen	Alternativní názvy	Lokalizace	Funkce
QWRF1	SCO3	peroxizóm, kortikální cytoskelet	vývoj květních orgánů a fertilita, organizace chloroplastu, sestavování vřeténka
QWRF2		kortikální cytoskelet, plastidy, jádro	vývoj květních orgánů a fertilita, sestavování vřeténka
QWRF3		plastidy, jádro	sestavování vřeténka
QWRF4		plastidy, jádro	sestavování vřeténka
QWRF5	EDE1	mikrotubuly dělicího vřeténka a fragmoplastu	buněčné dělení, sestavování vřeténka
QWRF6		plastidy, jádro	sestavování vřeténka
QWRF7		plastidy, jádro	sestavování vřeténka
QWRF8	AUG8	kortikální cytoskelet, jádro	organizace interfázových mikrotubulů
QWRF9		plastidy, jádro	sestavování vřeténka

Tabulka 3: Členy QWRF proteinové rodiny, jejich alternativní názvy, umístění v buňce a funkce (kurzívou je zvýrazněno předpokládané umístění, resp. funkce); QWRF — QWRF motif-containing protein, SCO3 — SNOWY COTYLEDON 3, AUG8 — AUGMIN subunit 8, EDE1 — ENDOSPERM-DEFECTIVE 1. *Upraveno podle Albrecht et al. (2010), „UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021“ (2021) a H. Ma et al. (2021)*

Regulace funkce augminu

Kromě použití různých izotypů AUG8 (Lee et al., 2017) pravděpodobně regulují sestavení a funkci augminového komplexu v rostlinách i posttranslační modifikace. Tento princip se významně uplatňuje u živočichů, kde byla popsána celá fosforylační kaskáda zabezpečující translokaci augminu do dělicího vřeténka (Johmura et al., 2011), řada enzymů vystupujících v těchto regulačních drahách nicméně u rostlin chybí.

EDE1 je *in vitro* fosforylován cyklin-dependentní kinázou A (CDK-A) (Pignocchi et al., 2011), která asociuje s mikrotubuly dělicího vřeténka i fragmoplastu (Weingartner et al., 2001), význam této modifikace ovšem není zřejmý — možná moduluje interakci mezi EDE1 a mikrotubuly. Nezávisle na fosforylaci CDK-A je EDE1 vázán jedním ze členů rodiny 14-3-3 proteinů (14-3-3 *v*) (Pignocchi et al., 2011), k čemu tato vazba slouží, však také není jasné.

4.2 Nukleace v interfázi

Na mikrotubulech závislá nukleace mikrotubulů je nejnápadnější v kortikální oblasti rostlinné buňky (Obrázek 10), kam je v interfázi γ TuRC rekrutován z přilehlé

cytoplazmy a kde tak vzniká v počátku převážně rozvětvená mikrotubulární síť (Murata et al., 2005). Úhel větvení se pohybuje okolo 40° a je dán strukturou samotného γ TuRC (Nakamura et al., 2009; Kong et al., 2010) a jeho lokalizačních faktorů (Walia et al., 2014; T. Liu et al., 2014) — mutace v GCPs, NEDD1/GCP-WD či podjednotkách augminu vedou k pozměněnému iniciačnímu úhlu nukleace. Při větvené nukleaci mají mateřský a dceřiný mikrotubul většinou shodnou orientaci plus- a minus-konců (Chan et al., 2009).

S nižší frekvencí leží nově vznikající mikrotubul rovnoběžně s původním, na němž byla z γ TuRC polymerace zahájena (Chan et al., 2009). U tohoto typu nukleace naopak převažuje antiparalelní uspořádání dvou vedle sebe spočívajících mikrotubulů (Yagi et al., 2018) a jeho výsledkem je tvorba svazků.

Příležitostně jsou mikrotubuly nukleovány i z míst neasociovaných s existujícími mikrotubuly (Chan et al., 2009; Nakamura et al., 2010).

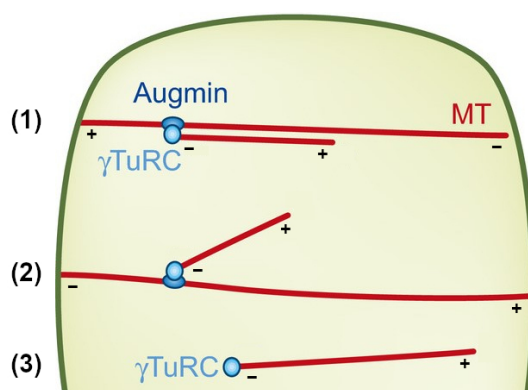
Způsob nukleace mikrotubulů spolu s jejich svazkováním, enzymatickým „sekáním“ a modulací dynamické nestability pomocí rozličných faktorů utváří řádnou a ve vztahu k funkci buňky a environmentálním podmínkám relevantní strukturu kortikální mikrotubulární sítě (Elliott et al., 2018), která zprostředkovaně, naváděním enzymů syntetizujících celulózní mikrofibrily, determinuje tvar buňky (Bringmann et al., 2012).

Při vstupu do mitózy se kortikální mikrotubuly reorganizují do podoby preprofázového prstence (PPB), který tranzientně obkružuje buňku v místě budoucího napojení dceřiné buněčné stěny. Navzdory prvotnímu zdání není PPB hlavní determinanta roviny buněčného dělení, ale spíše prvek, který specificky posiluje již předdefinovaný signál a poskytuje tak robustní prostředek pro interpretaci tohoto signálu ustavením správně orientovaného bipolárního vřeténka (Schaefer et al., 2017). Tato role PPB odkazuje na jeho homologii s centriolami a astrálními mikrotubuly v mitóze centrozomálních buněk a může být spojená se sekvenční podobností řady TTP (TON1/TRM/PP2A) proteinů (viz níže) s proteiny centrozómu (Tabulka 5).

Při formování PPB se zvyšuje dynamická nestabilita mikrotubulů v prostoru mimo ustavující se rovinu buněčného dělení a dochází k masivnímu svazkování kortikálních mikrotubulů uvnitř vznikajícího prstence, což vede k jejich postupnému ubývání v ostatních okresech kortexu (Vos et al., 2004). Nukleace nových mikrotubulů zřejmě přispívá k tvorbě PPB pouze částečně.

4.2.1 Augmin při nukleaci kortikálních mikrotubulů

Augmin na kortikálních mikrotubulech kolokalizuje s γ TuRC (T. Liu et al., 2014), deplece některé z jeho podjednotek však překvapivě a v kontrastu s větvenou nukleací téměř nepoznamenává svazky produkující nukleaci; totéž platí i pro NEDD1/GCP-WD (T. Liu et al., 2014; Walia et al., 2014). Změny v kompozici či struktuře superkom-



Obrázek 10: V buněčném kortexu se odehrává několik typů nukleace, (1) na mikrotubulech závislá svazující nukleace mikrotubulů; (2) na mikrotubulech závislá větvená nukleace mikrotubulů; (3) *de novo* nukleace v blízkosti plazmatické membrány; MT — mikrotubul, γ TuRC — γ -tubulin ring complex. *Upraveno podle Lee et al. (2019).*

plexu augmin–NEDD1/GCP-WD– γ TuRC patrně rekonfigurují jeho nasedání na stěnu mikrotubulu a posouvají poměr větvené ku svazující nukleaci.

Na místech *de novo* nukleace mikrotubulů augmin nelze detekovat (T. Liu et al., 2014) a není známo, zda nějaký faktor, a eventuálně jaký, kotví γ TuRC k plazmatické membráně. Jako přijatelná varianta se vzhledem k relativní výjimečnosti tohoto děje nabízí nahodilá aktivace γ TuRC v blízkosti plazmalemy, která nevyžaduje specifické lokalizační faktory (Fishel et al., 2013).

4.2.2 TTP komplex

Nukleační mód γ TuRC regulují mimo konformaci samotných složek lokalizační mašinerie i další přídatné faktory. Jedním z nich je TTP komplex, jehož funkční komponenta je proteinfosfatáza 2A (PP2A) (Spinner et al., 2013). Mutace v klíkových součástech tohoto komplexu se projevuje náhodnou orientací interfázových mikrotubulů a absencí PPB (McClinton et al., 1997; Camilleri et al., 2002; Azimzadeh et al., 2008); zvyšuje se frekvence katastrof, což je spojeno s celkovým snížením hustoty mikrotubulů v kortexu (Kirik et al., 2012; Yoon et al., 2018). Zároveň je u mutantů v porovnání s wild-typem v průběhu preprofáze větší množství γ TuRC lokalizováno na jaderné membráně.

Změna uspořádání kortikální mikrotubulární sítě se vztahuje k posunu rovnováhy mezi větvenou a svazující nukleací (Kirik et al., 2012). TTP komplex podporuje větvení mikrotubulů v kortikální zóně, mutanti tak mají výrazně sníženou frekvenci větvené nukleace mikrotubulů z rekrutovaných nukleačních komplexů, zatímco frekvence svazující nukleace se zvyšuje. Nukleační kompetence γ TuRC, stejně jako úhel větvení zůstávají nezměněné. PP2A v rámci TTP komplexu interaguje s γ -tubulinem a GCP-WD (Yoon et al., 2018), zda regulaci podléhá rovněž augmin, nebylo dosud studováno.

Při formování PPB jsou zřejmě cíle působení TTP komplexu jiné (nukleace mikrotubulů k tomuto procesu příliš nepřispívá), což reflektuje i na buněčném cyklu závislá exprese některých variant jeho komponent (viz TRM proteinová superrodina) (Schaefer et al., 2017) — potenciálním terčem defosforylace jsou v tomto případě svazující proteiny MAP65-1 (microtubule-associated protein 65kD 1) a MAP65-2, které kolokalizují s kortikálními mikrotubuly pouze během interfáze a preprofáze a jejichž svazující aktivita je zásadní pro formaci PPB a kromě jiného je negativně regulována fosforylací (Vavrdová et al., 2019). Jako antagonist TTP komplexu zřejmě působí CDK-A, která je rekrutována do PPB těsně před nástupem profáze (Weingartner et al., 2001), čímž pravděpodobně indukuje jeho rozpad; navíc nejspíš přímo reguluje i činnost TTP komplexu fosforylací jedné z jeho podjednotek (viz TON1 proteiny) (Benschop et al., 2007; Van Leene et al., 2007; Sugiyama et al., 2008; Costa, 2017). Regulací aktivity svazujících faktorů TTP komplex přispívá k uspořádání kortikálních mikrotubulů patrně i v interfázi, kdy se ovšem přidává i jeho úloha v nukleaci. Chybění PPB má za následek abnormální umístění buněčných stěn.

Z výše uvedeného vyplývá, že TTP komplex je skrze PP2A zapojen do fosforylační kaskády kontrolující dynamickou organizaci kortikálního cytoskeletu v rostlinných buňkách (Camilleri et al., 2002). Následující odstavce se blíže zabývají jednotlivými složkami TTP komplexu.

Struktura TTP komplexu

TTP komplex se skládá z TON1 heterodimeru, různých TRMs a PP2A holoenzymu s TON2/FASS jako regulační podjednotkou B a PP2AC3 či PP2AC4 jako katalytickou podjednotkou (Spinner et al., 2013) (viz níže). PP2A zodpovídá za enzymatickou aktivitu komplexu, TON1 napomáhá jeho sestavování, a snad i aktivaci a TRMs přibližují defosforylační aktivitu PP2A do blízkosti jejího cíle.

S výjimkou TON2/FASS mají všechny ostatní identifikované komponenty TTP komplexu několik izoform, zjevně tedy existuje vysoká kombinatorická diverzita TTP komplexů (Spinner et al., 2010) a specifická genová exprese odlišných variant jednotlivých součástí precizně moduluje jejich činnost v souladu s probíhající fází buněčného cyklu. Funkce TTP komplexu může být dále modulována rostlinně specifickou rodinou proteinů OFP (OVATE family protein) (X. Zhang et al., 2020).

Proteinfosfatáza 2A

Proteinfosfatáza 2A je v podstatě všudypřítomná serin/threoninová fosfatáza s širokou substrátovou specifitou a rozmanitým repertoárem buněčných funkcí (Janssens et al., 2001), která tvoří heterotrimer (Wera et al., 1995) sestávající z evolučně konzervo-

vané katalytické podjednotky C (PP2AC) a regulačních podjednotek A a B (PP2AA, resp. PP2AB). Podjednotka A slouží jako lešení pro sestavení komplexu (Groves et al., 1999), zatímco podjednotka B moduluje aktivitu PP2A, vymezuje její substrátovou specifitu a subcelulární lokalizaci (Wera et al., 1995). Význam podjednotky typu B podmiňuje diverzifikaci genů ji kódujících (Goldberg, 1999), které se sdružují do tří skupin — B, B' a B".

U rostlin prodělala genová rodina kódující podjednotky PP2A intenzivní expanzi — v genomu *Arabidopsis thaliana* je přítomno 5 genů pro podjednotku C, 3 geny pro podjednotku A a 17 genů pro podjednotku B (Yoon et al., 2018). Počet možných kombinací podjednotek A, B a C v holoenzymu PP2A předurčuje strukturní a funkční rozmanitost sestavených komplexů.

Katalytická podjednotka PP2A Geny pro PP2AC se dále dělí do dvou podrodin, v jejichž rámci přetrvává sekvenční podobnost a funkční redundance (Pérez-Callejón et al., 1998; Yu et al., 2005): *PP2AC-1*, *PP2AC-2* a *PP2AC-5* se seskupují do jednoho kladu (podrodina I), *PP2AC-3* a *PP2AC-4* do druhého (podrodina II) (Yoon et al., 2018).

Mutant *pp2ac3-c4* vykazuje závažné vývojové defekty spojené s uvedenými změnami ve struktuře kortikálního cytoskeletu, kdežto mutace v genech *PP2AC* podrodiny I vede „jen“ k předčasné senescenci (Yoon et al., 2018).

Regulační podjednotka B PP2A — TON2/FASS Gen *TON2/FASS* (*TONNEAU2/FASS*) kóduje protein s funkcí B" regulační podjednotky PP2A (Camilleri et al., 2002) a jeho mutace vede k popsáným defektům organizace mikrotubulů. TON2/FASS převážně interaguje s izoformami PP2AC z podrodiny II (Yoon et al., 2018).

TON1 proteiny

TON1 proteiny jsou rovněž esenciální pro uspořádání mikrotubulů v průběhu interfáze a preprofáze (Azimzadeh et al., 2008). Genom *Arabidopsis thaliana* obsahuje dva téměř identické geny *TON1a* a *TON1b*, produkty jejichž exprese pravděpodobně tvoří heterodimer (Spinner et al., 2010). V kortexu byla prokázána asociace CDK-A s těmito proteiny (Benschop et al., 2007; Sugiyama et al., 2008), jejich fosforylace tak nejspíš reguluje funkci TTP komplexu (Van Leene et al., 2007; Costa, 2017).

TRM proteinová superrodina

V rostlinách konzervovaná proteinová superrodina TRM (TON1-recruiting motif protein) čítá u *Arabidopsis thaliana* 34 členů (Drevensek et al., 2012) dále rozdělených do osmi podskupin (Tabulka 4). Všechny jsou bez výjimky schopné skrze konzervovaný M2 motiv vázat protein TON1, část z nich současně interaguje s mikrotubuly.

Některé TRMs vykazují na buněčném cyklu závislou úroveň exprese a TTP komplex je obsahující plní speciální funkce. Příkladem je TRM7, který se objevuje v buňce pouze během přechodu mezi G2 a M fází a spolu s TRM6 a TRM8 (exprimovány konstitutivně) představuje nedílnou součást TTP komplexu zodpovědného za sestavení PPB (Schaefer et al., 2017). *trm678* mutant má normální interfázové mikrotubuly — mimo preprofázi tyto TRMs nejsou pro organizaci mikrotubulů potřebné.

Skupina	TRMs
1	TRM1, TRM2, TRM3, TRM4, TRM5
2	TRM6, TRM7, TRM8
3	TRM9, TRM10, TRM11, TRM27, TRM28
4	TRM13, TRM14, TRM15, TRM33
5	TRM17, TRM19, TRM20, TRM21, TRM26
6	TRM23, TRM24, TRM25
7	TRM29, TRM31
8	TRM16, TRM32
<i>nezařazené</i>	TRM12, TRM18, TRM22, TRM30, TRM34

Tabulka 4: Kategorizace TRM proteinové superrodiny; TRM — TON1-recruiting motif protein. *Zdroj: Drevensek et al. (2012)*

Podjednotka TTP komplexu		Centrozomální homolog	
<i>Protein</i>	<i>Funkce</i>	<i>Protein</i>	<i>Funkce</i>
TON2/FASS	B podjednotka PP2A	RSA-1	rekrutování PP2A do centrozómu
TON1	sestavení a aktivace komplexu	FOP	kotvení minus-konců mikrotubulů v centrozómu
		OFD1	stabilizace centriolárních mikrotubulů určité délky
TRM	směrování komplexu na mikrotubuly	CAP350	rekrutování FOP do centrozómů

Tabulka 5: Centrozomální homology proteinů TTP komplexu; TRM — TON1 recruiting motif protein 1, RSA-1 — regulator of spindle assembly 1, FOP — FGFR1 oncogene partner, OFD1 — orofaciocigital syndrome 1, CAP350 — centrosome-associated protein 350 kDa. *Zdroje: Camilleri et al. (2002), Yan et al. (2006), Schlaitz et al. (2007), Singla et al. (2010) a Spinner et al. (2013)*

4.3 Nukleace v mitóze

Jak bylo naznačeno v předcházející podkapitole, s nástupem buněčného dělení se mikrotubulární cytoskelet kompletně reorganizuje, a to nejen na periférii buňky,

ale rovněž v jejím centru, kde se celý proces segregace zduplikované genetické informace odehrává. Zásadní měrou se na uskutečnění tohoto fundamentálního, vysoce koordinovaného, nesmírně komplexního a striktně regulovaného děje podílí i nukleace mikrotubulů, která se odehrává jednak stejně jako v kortexu na samotných mikrotubulech, a také na jaderném obalu.

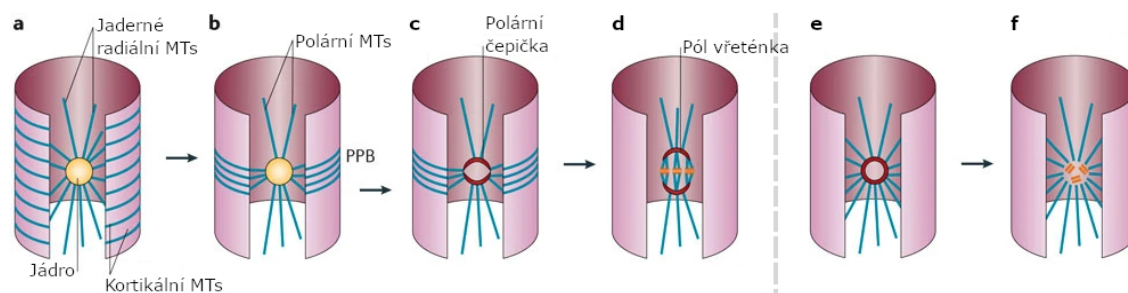
4.3.1 Nukleace na jaderné membráně

Jádro v rostlinných buňkách tedy přechodně plní funkci MTOC (Stoppin et al., 1994) — mikrotubuly jsou na něm radiálně nukleovány v preprofázi souběžně s formací PPB a v pozdní telofázi (Hasezawa et al., 1991) paralelně s depolymerací mikrotubulů fragmoplastu. Ačkoli jaderný obal sám o sobě disponuje schopností nukleace mikrotubulů ve spolupráci s γ TuRC, k masivnímu navýšení počtu mikrotubulů okolo jádra dochází na mikrotubulech závislou nukleací mikrotubulů zprostředkovanou augminem.

Radiální mikrotubuly vznikající na jaderném obalu na počátku buněčného dělení mají několikrátý úděl (Lloyd et al., 2006) (Obrázek 11). Část z nich si udržuje prvotní směr a je spojená s periferií buňky v místě ustavování PPB, z něhož obdobně „rostou“ mikrotubuly směrem k jádru (Dhonukshe et al., 2005) — tyto mikrotubuly mohou přispívat k formování PPB a zároveň zajišťují umístění jádra v rovině budoucího dělení buňky. Jak se PPB postupně zaostřuje, mikrotubuly spojující jádro s oblastí kortexu ohraničenou prstencem jsou současně reorganizovány do definovaného cytoplazmatického disku, tzv. fragmozómu, s PPB na periférii, který přímo vymezuje rovinu buněčného dělení. Některé z radiálně orientovaných mikrotubulů směřují z pólů jádra k okrajům buňky a ustavují tak osu pól–pól, která je kolmá na fragmozóm — tyto mikrotubuly se označují jako polární.

Většina na povrchu jádra vznikajících mikrotubulů po iniciaci polymerace mění orientaci vzhledem ke karyolemě z radiální na tangenciální a postupně se činností molekulových motorů uspořádává do rostlinně specifické struktury bipolárního profázového vřeténka, jehož osa odpovídá té definované polárními mikrotubuly a jež po rozpadu jaderného obalu dává vzniknout vřeténku metafázovému. Minus-konce mikrotubulů jsou v této fázi lokalizovány na protilehlých stranách jádra v tzv. polárních čepičkách (Chan et al., 2005). Počáteční polarizace mikrotubulů na povrchu jádra je podmíněná existencí PPB — pokud se neformuje, mikrotubuly jsou okolo jádra uspořádány náhodně (J. C. Ambrose et al., 2008; Schaefer et al., 2017; Kosetsu et al., 2017) a bipolarita se ustavuje až po zániku jaderného obalu.

Nukleace mikrotubulů na jádře při přechodu mezi cytokinezí a interfází pravděpodobně přispívá k organizaci systému kortikálních mikrotubulů (Kumagai et al., 2001; Kumagai et al., 2003; C. Ambrose et al., 2014) — ke kortexu směřující mikrotubuly se v blízkosti plazmatické membrány ohýbají a spolupodílejí se na augminem zprostřed-



Obrázek 11: Nukleace mikrotubulů na jaderném obalu. **a** Na začátku buněčného dělení jsou kromě kortexu mikrotubuly nukleovány i na povrchu jádra, odkud se paprskovitě rozbíhají. **b** V preprofázi kortikální mikrotubuly vytvářejí PPB, zatímco radiální mikrotubuly se shromažďují do fragmozómu a ustavují osu pól–pól. **c** Mikrotubuly se postupně organizují do bipolárního profázového vřeténka s minus-konci v polárních čepičkách. **d** Polarita profázového vřeténka určuje polaritu vřeténka metafázového — polární čepičky vymezují jeho budoucí póly. **e** V buňkách bez PPB se polarita před rozpadem jaderného obalu neustavuje, vřeténko z toho důvodu v počátku není bipolární (**f**); MTs — mikrotubuly, PPB — preprofázový prstenec. *Upraveno podle Lloyd et al. (2006).*

kované nukleaci, která je dominantní dráhou navyšující počet mikrotubulů v kortexu a ustavující finální organizovanou interfázovou mikrotubulární síť.

Kotvení γ TuRC na povrchu jádra

Faktory, které připojují γ TuRCs k jadernému obalu, nejsou známy. Jedním z kandidátů je protein TSA1 (TSK-associating protein 1) (Batzenschlager et al., 2013; Batzenschlager et al., 2014), který interaguje s MZT1 a je během profáze a v rané telofázi přítomen na karyolemě; navíc nejspíš obsahuje transmembránovou doménu, kterou by mohl být přímo zakotven do vnější jaderné membrány (Suzuki et al., 2005).

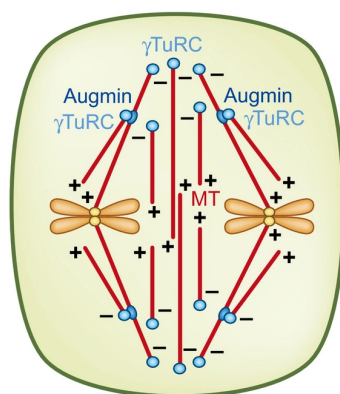
Histon H1 jako nukleační faktor

V buňkách tabáku byl na povrchu jader pozorován ještě jeden typ nukleace, který překvapivě nevyžaduje γ TuRC (Nakayama et al., 2008; Hotta et al., 2007). Jako nukleační faktor zde vystupuje histon H1, který se skládá spolu s $\alpha\beta$ -tubulinovými dimery do komplexu s kruhovou strukturou. Inkorporace tubulinových podjednotek se odehrává proximálně k jádru, minus-konce mikrotubulů tedy směřují do cytoplazmy a rostoucí mikrotubul je progresivně vytlačován. Tento postulovaný mechanismus nukleace ovšem stále čeká na ověření.

4.3.2 Nukleace ve vřeténku

Předpokladem pro zdárné sestavení vřeténka je integrace nukleačních událostí na jaderném obalu a následné na vzniklých mikrotubulech závislé nukleace, jež rozhoduje

jícím dílem přispívá k navýšení počtu mikrotubulů (Obrázek 12) (Petry et al., 2013). V součinnosti s augminem zřejmě pracují pro zajištění dostatečné efektivity tohoto procesu faktory TPX2 (targeting protein for Xklp2) (Petry et al., 2013; Alfaro-Aco et al., 2017; Alfaro-Aco et al., 2020) a XMAP215 (*Xenopus* microtubule-associated protein 215kDa) (Gunzelmann et al., 2018; Thawani et al., 2018; Flor-Parra et al., 2018); jejich participace na mikrotubulech závislé nukleaci mikrotubulů byla zatím studována na živočišném a kvasinkovém modelu, řada indicií ovšem naznačuje, že je tento mechanismus funkční i v rostlinách.

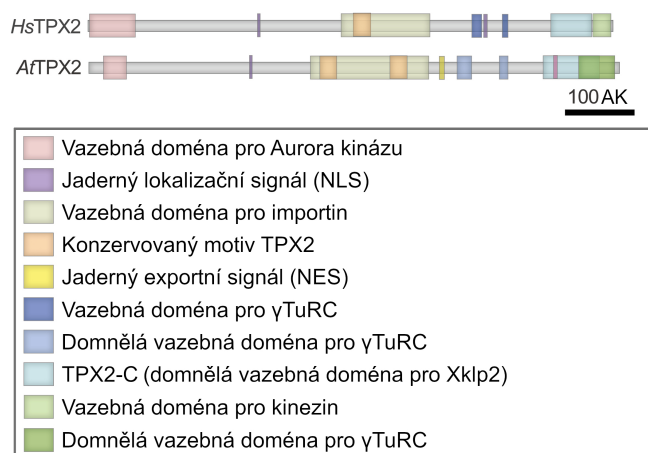


Obrázek 12: Nukleace v dělicím vřeténku. Dostatečný počet mikrotubulů ve vřeténku zajišťuje na mikrotubulech závislá nukleace mikrotubulů závislá na γ TuRC, augminu a nejspíš i dalších faktorech, díky níž vzniká funkční denzní mikrotubulární struktura, která připomíná jedli (tzv. fir tree); MT — mikrotubul, γ TuRC — γ -tubulin ring complex. *Upraveno podle Lee et al. (2019)*

Význam TPX2

TPX2 je konzervovaný protein s komplexní doménovou architekturou (Obrázek 13) (Alfaro-Aco et al., 2017), který ve vřeténku plní hned několik funkcí: podílí se na větvené nukleaci mikrotubulů, navádí do vřeténka Aurora kinázu a také některé molekulové motory. S ohledem na jeho víceúčelovost musí být TPX2 striktně regulován, což svojí inhibiční vazbou obstarává importin (Schatz et al., 2003; Vos et al., 2008) ve spolupráci s Ran GTPázou, která TPX2 z inhibice ve stanovený čas uvolňuje.

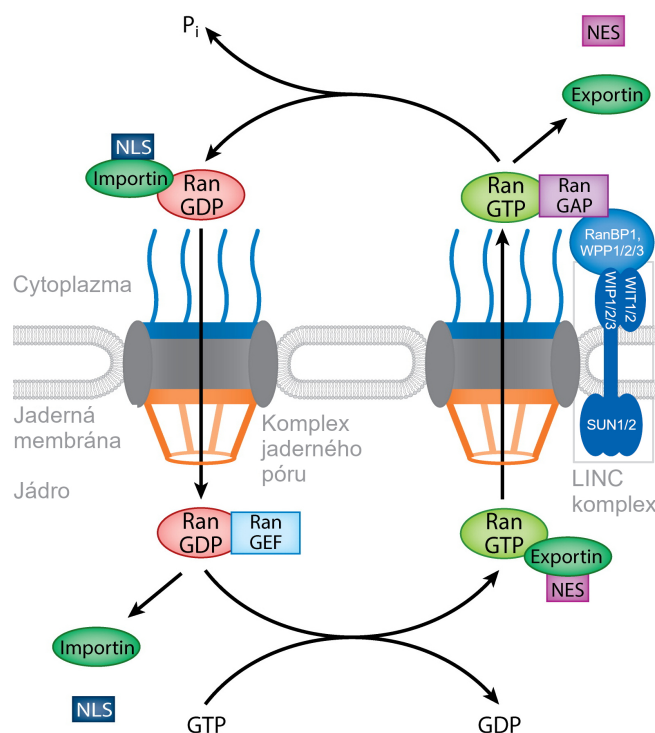
Ran GTPáza Ran (Ras-related nuclear), malá GTPáza ze superrodiny Ras, je ústředním regulačním elementem nukleocytoplazmatického transportu, zároveň ovšem ovlivňuje i nejrůznější aspekty buněčného dělení (Nielsen, 2020). Ran se v buňce může nacházet ve dvou stavech, s navázaným GTP (RanGTP), resp. GDP (RanGDP), přechod mezi nimiž je řízen s Ran asociovanými regulačními proteiny GEF (guanosine nucleotide exchange factor), který zprostředkovává výměnu GDP navázaného na Ran za GTP, a GAP (GTPase-activating protein), který aktivuje GTPázovou aktivitu Ran.



Obrázek 13: Doménová architektura TPX2; *HsTPX2* — *Homo sapiens* TPX2, *AtTPX2* — *Arabidopsis thaliana* TPX2, AK — aminokyseliny, TPX2 — targeting protein for Xklp2, γ TuRC — γ -tubulin ring complex, Xklp2 — *Xenopus* kinesin-like protein 2. Upraveno podle Smertenko et al. (2020)

Pro Ran GTPázu je specifické spojení cyklování mezi GTP- a GDP-stavem s transportem mezi nukleoplazmou a cytoplazmou (Obrázek 14), jenž je umožněn oddělenou lokalizací jejich regulačních faktorů — RanGEF, označovaný jako RCC1 (regulator of chromosome condensation 1), je v jádře poután na chromatin, zatímco RanGAP je spolu se svým koaktivátorem RanBP1 (Ran-binding protein 1) v blízkosti jaderných pórů (Pay et al., 2002; Patel et al., 2004) z cytoplazmatické strany prostřednictvím LINC (linker of nucleoskeleton and cytoskeleton) komplexu připojen k jadernému obalu (Obrázek 14) (Meier et al., 2017). Výsledkem je exkluzivní umístění RanGTP v jádře a RanGDP v cytoplazmě.

Proteiny určené k importu do jádra obsahují sekvenční motiv NLS (nuclear localization signal) rozeznávaný receptorovými proteiny importiny. Komplex kargo protein–importin je v cytoplazmě rozpoznáván RanGDP a transportován do jádra, kde se rozpadá v důsledku konverze RanGDP na RanGTP (jaderně lokalizovaným RCC1) blokující vazbu Ran na importin, který tím ztrácí afinitu k přenášenému proteinu. Proteiny směřované ven z jádra naopak využívají exportiny vázající signální NES (nuclear export signal) sekvenci — kargo protein–exportinový komplex se spojuje s RanGTP a putuje ven z jádra, kde je rozložen činností RanGAP posilujícího GTPázovou aktivitu Ran. RanGDP se odpojuje z komplexu a exportin následkem toho uvolňuje kargo protein. RanGDP je dopravována do jádra spolu s importovanými kargo proteiny a pomocí NTF2 (nuclear transport factor 2), který tak navyšuje koncentraci Ran v jádře. Všechny složky této dráhy byly u rostlin charakterizovány (Vernoud et al., 2003; Pay et al., 2002; Haizel et al., 1997; Kim et al., 2001; Zhao et al., 2006) s výjimkou funkčního RCC1, jehož homology sice v rostlinách existují (Vernoud et al., 2003; Yamada et al., 2017), nemají však výraznou GEF aktivitu.



Obrázek 14: RanGTPázový cyklus a struktura LINC komplexu. Obdélník v pravé části označuje LINC komplex — RanGAP je přes svůj koaktivátor RanBP, nebo jeho homology WPP (WPP1/2/3), jejichž funkce dosud není známa, z vnější strany přikotven LINC komplexem k jadernému obalu; LINC komplex je složen z dimeru WIP/WIT, který je zanořen do vnější jaderné membrány, a trimeru SUN proteinů, které procházejí vnitřní jadernou membránou a spojují se s dimerem WIP/WIT v perinukleárním prostoru; NLS — nuclear localization signal, NES — nuclear export signal, RanGTP — Ran v GTP stavu, RanGDP — Ran v GDP stavu, RanGAP — Ran GTPase-activating protein, RanBP — Ran binding protein, WPP — WPP domain protein, WIP — WPP-domain interacting protein, WIT — WPP domain-interacting tail-anchored protein, SUN — Sad1/UNC-84, LINC — linker of nucleoskeleton and cytoskeleton, RanGEF — Ran guanosine nucleotide exchange factor. *Upraveno podle Nielsen (2020).*

Výše popsaný mechanismus zaručuje směrovost nukleocytoplazmatického transportu v interfázových buňkách, pokračuje však i po rozpadu jaderného obalu, kdy vysoká koncentrace RanGTP v bezprostřední blízkosti kondenzovaných chromozomů uvolňuje z vazby na importiny důležité, sestavení vřeténka kontrolující faktory (Caudron et al., 2005; Kaláb et al., 2006) včetně TPX2. U rostlin je systém patrně ještě trochu komplikovanější, neboť součástí sekvence TPX2 je i NES, který umožňuje jeho export z jádra ještě před rozpadem jaderného obalu v prometafázi (Vos et al., 2008; Petrovská et al., 2012) — TPX2 se díky tomu může účastnit už sestavování profázového vřeténka.

Princip funkce TPX2 TPX2 je rekrutován prostřednictvím několika centrálně a C-terminálně lokalizovaných mikrotubuly vázajících domén, které spolupracují a vytvářejí interakční rozhraní (R. Zhang et al., 2017; Alfaro-Aco et al., 2017), na stěnu mikrotu-

bulů, kde se spolu s $\alpha\beta$ -tubulinovými dimery shlukuje do „kapiček“ kondenzátu (King et al., 2020; Setru et al., 2021) a lokálně tak navyšuje jejich koncentraci (King et al., 2020). Navíc má zřejmě schopnost přímou interakcí aktivovat γ TuRC — obsahuje několik konzervovaných motivů FKARP, jejichž mutace je neslučitelná s nukleací, přestože TPX2 se stále váže na mikrotubuly, rekrutuje γ TuRC a kondenzuje s tubulinem (Alfaro-Aco et al., 2017).

Depozice TPX2 na mikrotubuly tedy podle všeho předchází vazbě augminu s γ TuRC a následnému rozvětvení (Thawani et al., 2019; Alfaro-Aco et al., 2020; Setru et al., 2021) — tvorbou kondenzátu s tubulinem a aktivací γ TuRC zvyšuje TPX2 pravděpodobnost nukleace z na stěnu mikrotubulu naverbovaného γ TuRC.

TPX2 zároveň akumulací podél mikrotubulů ovlivňuje jejich dynamiku, neboť stabilizuje laterální i longitudinální interakce mezi tubulinovými dimery, čímž zpomaluje depolymeraci a snižuje frekvenci katastrof (X. Zhang et al., 2009; Roostalu et al., 2015; Reid et al., 2016). Tyto vlastnosti současně napomáhají ustalovat vznikající nukleační jádra (Obrázek 16), což představuje další způsob posílení na mikrotubulech závislé nukleace ve vřeténku.

Na platnost tohoto modelu v rostlinách poukazuje koincidence TPX2 a jeho homologů (viz TPX2 proteinová rodina v rostlinách) s γ TuRC na mitotických mikrotubulárních systémech a esencialita proteinu TPXL3 (TPX2-like 3), který má podobné doménové složení jako TPX2, stejný lokalizační vzor a u rostlin převzal ústřední roli místo TPX2 (Boruc et al., 2019).

TPX2 proteinová rodina v rostlinách U rostlin došlo, patrně v souvislosti s vývojem acentrozomálního vřeténka (Weimer et al., 2016), ke zmnožení genů pro TPX2 a následné sub- a neofunkcionalizaci členů nově vzniklé TPX2 proteinové rodiny (Obrázek 15) (Evrard et al., 2009; Dvořák Tomašítková et al., 2020). Genom *Arabidopsis thaliana* obsahuje jeden gen pro kanonický TPX2 (Vos et al., 2008), jehož sekvence zahrnuje všechny konzervované domény, a navíc NES (Obrázek 13), u jeho homologů byly zachovány pouze některé z těchto strukturně a funkčně odlišných domén, případně došlo ke vzniku domén nových, které definují specifické podskupiny (Obrázek 15, Tabulka 6) (Tomašítková et al., 2015); co je však důležité, všechny dosud identifikované proteiny z této rodiny si udržely schopnost vazby na mikrotubuly (Smertenko et al., 2020) — diverzita doménového složení společně s odlišnou genovou expresí naznačuje, že funkce jednotlivých členů se vyvinula pro doladění mikrotubulární dynamiky v kontextu odlišných a vysoce specializovaných buněčných procesů (Tabulka 7) (Smertenko et al., 2020).

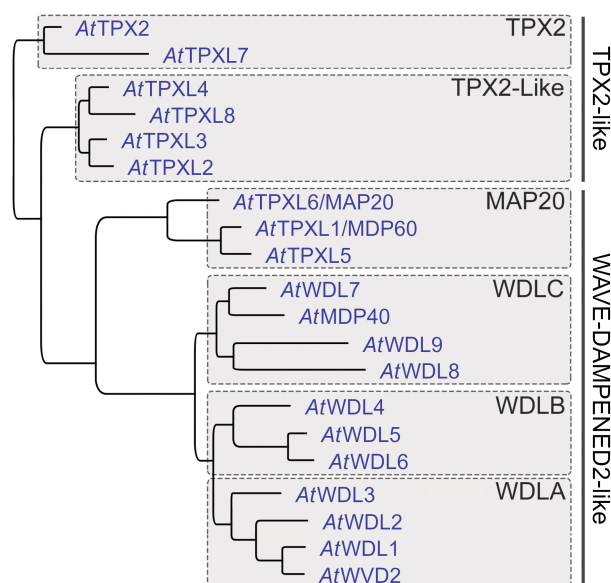
Popsanou úlohu TPX2 v na mikrotubulech závislé nukleaci mikrotubulů ve vřeténku odráží jeho poloha v buňce v průběhu buněčného cyklu: v interfázi je protein

Podskupina TPX2 proteinové rodiny	Člen	Doména				
		A	I	X	W	K
TPX2	TPX2	✓	✓	✓		✓
	TPXL7			✓		
TPX2-Like		✓	✓			✓
MAP20				✓		
WDLC	MDP40				✓	
	zbývající			✓*	✓	
WDLB				✓*		
WDLA				✓*		

Tabulka 6: Doménová architektura proteinů TPX2 rodiny. Podskupiny TPX2 a TPX2-Like tvoří skupinu TPX2-like, zbývající tvoří skupinu WAVE-DAMPENED2-like, pokud je v tabulce uveden pouze název podskupiny, mají všechny její členy stejné doménové složení; A — vazebná doména pro Aurora kinázu, I — vazebná doména pro importin, X — domnělá vazebná doména pro Xklp2, W — WAND (WDL new domain) s neznámou funkcí, K — konzervovaný motiv TPX2, * — KLEEK motiv součástí domnělé vazebné domény pro Xklp2, TPX2 — targeting protein for Xklp2, MAP — microtubule-associated protein, MDP — microtubule destabilizing protein, WDL — WVD2-like, WVD2 — WAVE-DAMPENED 2. Zdroje: Smertenko et al. (2020) a Dvořák Tomašíková et al. (2020)

Člen TPX2 proteinové rodiny	Funkce
TPX2	aktivace Aurora kinázy, sestavování vřeténka, rozpad jaderného obalu
TPXL7	exprese ve zralých semenech
TPXL2	aktivace Aurora kinázy, sestavování vřeténka
TPXL3	aktivace Aurora kinázy, sestavování vřeténka
TPXL4	aktivace Aurora kinázy, exprese ve zralých prašnicích
TPXL8	aktivace Aurora kinázy
TPXL1/MDP60	anizotropická buněčná expanze na světle v odpovědi na ethylen, tolerance k zaplavení
TPXL6/MAP20	regulace velikosti xylému, regulace velikosti ztenčení a tloušťky membrány ztenčení, tolerance k suchu, exprese v šesulích
MDP40	anizotropická buněčná expanze ve tmě v odpovědi na brassinosteroidy
WDL5	anizotropická buněčná expanze ve tmě v odpovědi na ethylen, tolerance k solnému stresu
WVD2	anizotropická buněčná expanze, kroucení orgánů
WDL1	anizotropická buněčná expanze, kroucení orgánů
WDL3	anizotropická buněčná expanze v odpovědi na světlo

Tabulka 7: Funkce proteinů TPX2 proteinové rodiny. U členů, které nejsou součástí tabulky, není funkce známa, tlustá čára uvnitř tabulky odděluje TPX2-like a WAVE-DAMPENED2-like skupinu; TPX2 — targeting protein for Xklp2, MAP — microtubule-associated protein, MDP — microtubule destabilizing protein, WDL — WVD2-like, WVD2 — WAVE-DAMPENED 2. Zdroje: Smertenko et al. (2020) a Dvořák Tomašíková et al. (2020)



Obrázek 15: Členění TPX2 proteinové rodiny u *Arabidopsis thaliana*; TPX2 — targeting protein for Xklp2, MAP — microtubule-associated protein, MDP — microtubule destabilizing protein, WDL — WVD2-like, WVD2 — WAVE-DAMPENED 2. Upraveno podle Smertenko et al. (2020).

umístěn v jádře, uvolňuje se z něj v pozdní G2 fázi, kdy se organizuje do polárních čepiček; v metafázi se přemisťuje na mikrotubuly vřeténka a během telofáze je v menší míře přítomen na distálních částech mikrotubulů fragmoplastu (Petrovská et al., 2012). Shodnou lokalizaci jako TPX2 mají TPXL2 a TPXL3 (Petrovská et al., 2012; Petrovská et al., 2013; Boruc et al., 2019), rozdíl je pouze v jejich výraznější kolokalizaci s mikrotubuly profázového vřeténka a úplné absenci na fragmoplastu — tyto tři proteiny tedy zjevně zastávají podobnou funkci (Dvořák Tomašíková et al., 2020). Kodeplece TPX2 a TPXL2 překvapivě na rozdíl od TPXL3 výrazně nenarušuje buněčné dělení, z čehož lze usuzovat, že v průběhu evoluce došlo v důsledku zmnožení počtu proteinů fungujících obdobně jako TPX2 k selekci, která upřednostnila TPXL3 na úkor TPX2 (Boruc et al., 2019).

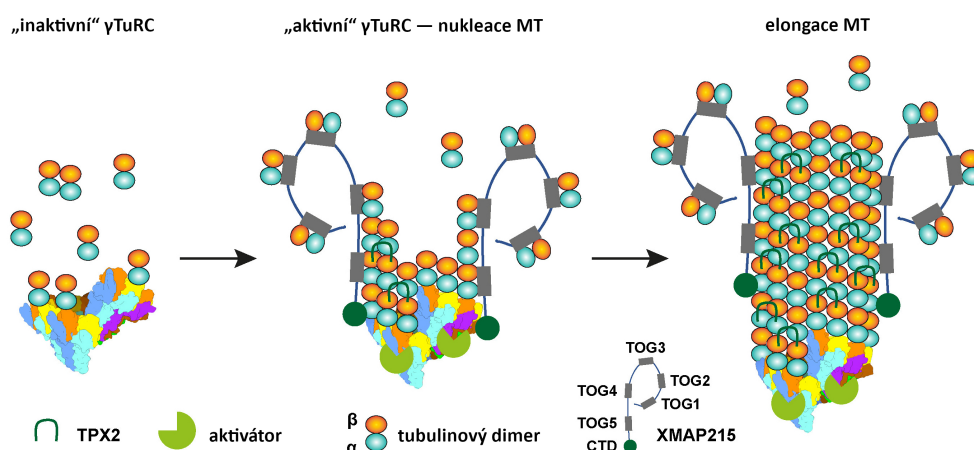
Skupina WDL (WVD2-like) TPX2 proteinové rodiny postrádá importin vázající doménu (Smertenko et al., 2020), a proto se její členy neakumulují v jádře, ale na mikrotubulech v kortexu (Perrin et al., 2007). Některé z nich modulují dynamiku mikrotubulů a jejich mutace narušuje uspořádání kortikální mikrotubulární sítě, mohou být i cílem signalizace spouštěné v odpovědi na nejruznější vývojové a enviromentální podněty (Smertenko et al., 2020). Pro některé WDL nebyla funkce dosud popsána a není proto vyloučeno, že mohou figurovat v nukleaci mikrotubulů, což by znamenalo, že TPX2 a jemu podobné proteiny fungují v rostlinné buňce jako univerzální nukleační faktory.

Význam XMAP215

XMAP215 primárně vystupuje jako polymeráza mikrotubulů, tedy jako faktor, který urychluje jejich polymeraci — k tomu využívá několika svých za sebou seřazených TOG (tumour overexpressed gene) domén (Obrázek 16), které zastávají odlišné úkony: TOG1 a TOG2 preferenčně vážou volné $\alpha\beta$ -tubulinové dimery (Widlund et al., 2011), zatímco dále umístěné TOG domény stabilizují nově se formující mikrotubul vazbou inkorporovaných podjednotek (Byrnes et al., 2017).

C-terminální část XMAP215 dosud neidentifikovaným způsobem interaguje s γ -tubulinem γ TuRC (Thawani et al., 2018), čímž umožňuje polymeráze prodlužovat nascentní mikrotubul, jenž se na γ TuRC tvoří (Lüders, 2018) (Obrázek 16). Zatímco kruhový γ TuRC je ideálním templátem pro stabilizaci laterálních kontaktů mezi tubulinovými podjednotkami, XMAP215 může zvyšovat stabilitu longitudinálních interakcí mezi $\alpha\beta$ -tubuliny — aktivity těchto dvou faktorů se doplňují a dohromady zabezpečují efektivitu nukleace (Lüders, 2018).

Rostlinný homolog MOR1 (MICROTUBULE ORGANIZATION 1) (Whittington et al., 2001) kolokalizuje s mikrotubuly po celé jejich délce nezávisle na probíhající fázi buněčného cyklu (Kawamura et al., 2006), jeho mutace je letální a buňky s teplotně senzitivní mutací *mor1* při restriktivní teplotě vykazují defektní organizaci a abnormální strukturu všech mikrotubulárních systémů — přestože všechna tato fakta nasvědčují tomu, že role XMAP215 a jeho homologů v nukleaci je konzervovaná, přímý nevyvratitelný důkaz v rostlinách dosud chybí.



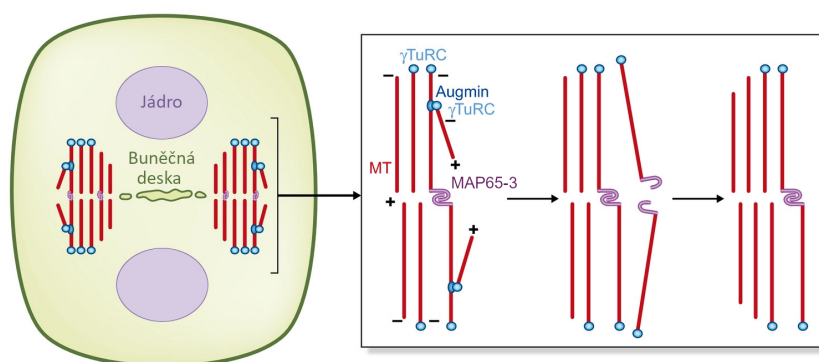
Obrázek 16: Role XMAP215 a TPX2 v na mikrotubulech závislé nukleaci mikrotubulů. Aktivátor (možná TPX2) upravuje konformaci γ TuRC, aby lépe odpovídala geometrii mikrotubulu, střední část TPX2 stabilizuje nukleační intermediát propojováním $\alpha\beta$ -tubulinových dimerů v longitudinálním i laterálním směru, XMAP215 se váže na γ TuRC skrze svoji C-terminální doménu (CTD) a posiluje nukleaci mikrotubulů rekrutováním tubulinových podjednotek na plus-konec; MT — mikrotubul, γ TuRC — γ -tubulin ring complex, XMAP215 — *Xenopus* microtubule assembly protein 215kDa, TOG — tumor overexpressed gene. *Upraveno podle P. Liu et al. (2021).*

4.3.3 Nukleace ve fragmoplastu

Cytokinezi v rostlinných buňkách zajišťuje fragmoplast, převážně mikrotubulární struktura umožňující lokalizovaný váčkový transport potřebný pro vytvoření dceřině buněčné stěny (Smertenko et al., 2017).

Fragmoplast vzniká na přechodu mezi anafází a telofází z antiparalelních interzonálních mikrotubulů centrálního vřeténka (v somatických buňkách), případně z mikrotubulů nukleovaných na proximálních stranách dceřiných jader (v buňkách endospermu) (Brown et al., 2001), které se ve střední zóně provazují, a v raných stádiích má podobu částečně se překrývajících bipolárního disku. Vzhledem ke svému původu směřuje většina plus-konců mikrotubulů do střední zóny, zatímco minus-konce jsou orientovány k periférii. K navýšení počtu mikrotubulů ve fragmoplastu dochází na mikrotubulech závislou nukleací mikrotubulů zprostředkovanou γ TuRC, který je sem rekrutován z rozpadajícího se vřeténka augminovým komplexem ve spolupráci s NEDD1/GCP-WD (Lee et al., 2017), svou roli možná hrají i MOR1 a TPX2 (Kawamura et al., 2006; Petrovská et al., 2012).

S postupující telofází fragmoplast centrifugálně expanduje směrem k místu na plazmatické membráně dříve specifikovanému PPB. Expanze je provázána depolymerací mikrotubulů ve vnitřní oblasti, tzv. vlečné zóně, a iniciací jejich polymerace na vnějším okraji, v tzv. vedoucí zóně, čímž fragmoplast získává tvar toroidu (Obrázek 17). Po připojení buněčné desky na plazmalemu se fragmoplast rozpadá.



Obrázek 17: Během expanze fragmoplastu jsou nové mikrotubuly nukleovány na existujících z γ TuRC v závislosti na augminu, nukleace je následována polymerací a provázáním antiparalelních mikrotubulů proteiny z rodiny MAP65, mikrotubuly nejvzdálenější od periférie jsou postupně zkracovány; MT — mikrotubul, γ TuRC — γ -tubulin ring complex, MAP65-3 — microtubule-associated protein 65kD 3. *Upraveno podle Lee et al. (2019).*

Uspořádání fragmoplastu ve vztahu k nukleaci

Fragmoplast obsahuje dynamické mikrotubuly a stabilní mikrotubulární svazky (Murata et al., 2013) vznikající propojováním přesahujících částí antiparalelních mikrotu-

bulů ve střední zóně svazujícími proteiny z rodiny MAP65 (Smertenko et al., 2018). Dynamické mikrotubuly jsou nukleovány na preexistujících svazcích a ustálení mikrotubulů samo o sobě je zřejmě dostatečné pro preferenční akumulaci γ TuRCs — na dynamických mikrotubulech se nukleační komplexy také hromadí, ovšem v důsledku depolymerace těchto nestabilních vláken jsou často uvolněny a nukleace nemůže proběhnout.

Počet mikrotubulů nukleovaných v jednotlivých oblastech expandujícího fragmoplastu je srovnatelný, rozhodující je právě jejich stabilita, která je vyšší ve vedoucí zóně a je regulovaná fosforylační kaskádou, jejímž cílem jsou faktory zprostředkávající svazkování (Smertenko et al., 2018). „Zrání“ fragmoplastu tedy umožňují tři opakující se kroky: 1) nukleace mikrotubulů na stabilních svazcích následovaná elongací; 2) shlukování mikrotubulů a tvorba stabilních svazků ve vrstvě nejvzdálenější od středu; 3) přichycení γ TuRC na nové stabilní mikrotubulární svazky.

Kapitola 5

Závěr

Nukleace mikrotubulů je komplexní proces, jehož základní principy zůstaly nepozměněné ve všech eukaryotických organizmech v souladu s nepostradatelností tohoto děje pro kontrolu nad organizací mikrotubulárního cytoskeletu, která je nezbytná pro zabezpečení všech jím zastávaných funkcí. V jednotlivých skupinách organizmů se nad rámec konzervovaných elementů vyvinuly přídatné mechanismy, které dále modulují jisté okolnosti spojené s nukleací, což koresponduje se specifickými požadavky daných systémů a podtrhuje jejich odlišnosti. Bohužel se výzkum v této oblasti odehrává spíše na živočišném poli, což má co do činění se souvislostí řady faktorů účastnících se iniciace polymerace mikrotubulů s nádorovým bujením. U rostlin tempo bádání v tomto směru trochu zaostává a množství domněnek přednesených v předložené práci tak zatím nebylo experimentálně ověřeno, proto je třeba brát je s rezervou.

Z dosud nashromážděných informací vyplývá, že se rostliny postavily potřebě přizpůsobení ustálených funkčních modulů rozšířením jejich kapacity a vývojem rostlinně specifických drah jejich regulace spíše než vznikem zcela nových komponent, ačkoli tento pohled může být omezený našimi současnými znalostmi. Jako příklad může posloužit augminový komplex: zatímco u živočichů se vyskytuje pouze jediná varianta podjednotky fungující jako MAP, u rostlin je jich přítomno zřejmě hned několik a přispívají pravděpodobně k nukleaci mikrotubulů za různých podmínek.

Ačkoli jsou klíčoví hráči nukleace u rostlin, γ TuRC, NEDD1/GCP-WD, augmin a nejspíš i XMAP215 (u rostlin MOR1) a TPX2 (spolu se svými homology), poměrně dobře charakterizováni, soupis není jistě kompletní a stále zůstává mnoho nezodpovězených otázek, které se týkají zejména signalizačních drah spouštějících nukleaci na povrchu jádra při vstupu do mitózy a na preexistujících mikrotubulech během ní a, v souvislosti s kortexem, usměrňujících fungování TTP komplexu.

Nukleace přirozeně sama o sobě nemůže úplně vysvětlit dynamiku mikrotubulů a její integrace do spleti všech ostatních přispěvatelů je další výzvou, před níž výzkum mikrotubulárního cytoskeletu stojí.

Literatura

- ALBRECHT, V.; ŠIMKOVÁ, K.; CARRIE, C.; DELANNOY, E.; GIRAUD, E.; WHELAN, J.; SMALL, I. D.; APEL, K.; BADGER, M. R.; POGSON, B. J., 2010. The Cytoskeleton and the Peroxisomal-Targeted SNOWY COTYLEDON3 Protein Are Required for Chloroplast Development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. Roč. 22, č. 10, s. 3423–3438.
- ALDAZ, H.; RICE, L. M.; STEARNS, Tim; AGARD, D. A., 2005. Insights into microtubule nucleation from the crystal structure of human γ -tubulin. *Nature*. Roč. 435, č. 7041, s. 523–527.
- ALFARO-ACO, R.; THAWANI, A.; PETRY, S., 2020. Biochemical reconstitution of branching microtubule nucleation. *eLife*. Roč. 9, e49797.
- ALFARO-ACO, R.; THAWANI, A.; PETRY, S., 2017. Structural analysis of the role of TPX2 in branching microtubule nucleation. *Journal of Cell Biology*. Roč. 216, č. 4, s. 983–997.
- AMBROSE, C.; WASTENEYS, G. O., 2014. Microtubule Initiation from the Nuclear Surface Controls Cortical Microtubule Growth Polarity and Orientation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*. Roč. 55, č. 9, s. 1636–1645.
- AMBROSE, J. C.; CYR, R., 2008. Mitotic Spindle Organization by the Preprophase Band. *Molecular Plant*. Roč. 1, č. 6, s. 950–960.
- AMOS, L. A.; KLUG, A., 1974. Arrangement of Subunits in Flagellar Microtubules. *Journal of Cell Science*. Roč. 14, č. 3, s. 523–549.
- ARAI, T.; KAZIRO, Y., 1976. Effect of Guanine Nucleotides on the Assembly of Brain Microtubules: Ability of 5'-Guanylyl Imidodiphosphate to Replace GTP in Promoting the Polymerization of Microtubules in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Roč. 69, č. 2, s. 369–376.
- AZIMZADEH, J.; NACRY, P.; CHRISTODOULIDOU, A.; DREVENSEK, S.; CAMILLERI, C.; AMIOUR, N.; PARCY, F.; PASTUGLIA, M.; BOUCHEZ, D., 2008. *Arabidopsis* TONNEAU1 Proteins Are Essential for Preprophase Band Formation and Interact with Centrin. *The Plant Cell*. Roč. 20, č. 8, s. 2146–2159.
- BATZENSCHLAGER, M.; HERZOG, E.; HOULNÉ, G.; SCHMIT, A.-C.; CHABOUTÉ, M.-E., 2014. GIP/MZT1 proteins orchestrate nuclear shaping. *Frontiers in Plant Science*. Roč. 5, s. 29.
- BATZENSCHLAGER, M.; MASOUD, K.; JANSKI, N.; HOULNÉ, G.; HERZOG, E.; EVRARD, J.-L.; BAUMBERGER, N.; EHRARDT, M.; NOMINÉ, Y.; KIEFFER, B.; SCHMIT, A.-C.; CHABOUTÉ, M.-E., 2013. The GIP gamma-tubulin complex-associated proteins are involved in nuclear architecture in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*. Roč. 4, s. 480.
- BENSCHOP, J. J.; MOHAMMED, S.; O'FLAHERTY, M.; HECK, A. J. R.; SLIJPER, M.; MENKE, F. L. H., 2007. Quantitative Phosphoproteomics of Early Elicitor Signaling in *Arabidopsis*. *Molecular & Cellular Proteomics*. Roč. 6, č. 7, s. 1198–1214.
- BERRY, R. W.; SHELANSKI, M. L., 1972. Interactions of Tubulin with Vinblastine and Guanosine Triphosphate. *Journal of Molecular Biology*. Roč. 71, č. 1, s. 71–80.
- BINAROVÁ, P.; CENKLOVÁ, V.; PROCHÁZKOVÁ, J.; DOSKOČILOVÁ, A.; VOLC, J.; VRLÍK, M.; BÖGRE, L., 2006. γ -Tubulin Is Essential for Acentrosomal Microtubule Nucleation and Coordination of Late Mitotic Events in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. Roč. 18, č. 5, s. 1199–1212.

- BORISY, G. G.; OLMSTED, J. B., 1972. Nucleated Assembly of Microtubules in Porcine Brain Extracts. *Science*. Roč. 177, č. 4055, s. 1196–1197.
- BORUC, J.; DENG, X.; MYLLE, E.; BESBRUGGE, N.; VAN DURME, M.; DEMIDOV, D.; DVOŘÁK TOMAŠTÍKOVÁ, E.; TAN, T.-R. C.; VANDORPE, M.; EECKHOUT, D.; BEECKMAN, T.; NOWACK, M. K.; JAEGER, G. D.; LIN, H.; LIU, B.; VAN DAMME, D., 2019. TPX2-LIKE PROTEIN3 Is the Primary Activator of α -Aurora Kinases and Is Essential for Embryogenesis. *Plant Physiology*. Roč. 180, č. 3, s. 1389–1405.
- BOWNE-ANDERSON, H.; ZANIC, M.; KAUER, M.; HOWARD, J., 2013. Microtubule dynamic instability: A new model with coupled GTP hydrolysis and multistep catastrophe. *Bioessays*. Roč. 35, č. 5, s. 452–461.
- BRINGMANN, M.; LANDREIN, B.; SCHUDOMA, C.; HAMANT, O.; HAUSER, M.-T.; PERSSON, S., 2012. Cracking the elusive alignment hypothesis: the microtubule–cellulose synthase nexus unraveled. *Trends in Plant Science*. Roč. 17, č. 11, s. 666–674.
- BROWN, R. C.; LEMMON, B. E. w., 2001. The cytoskeleton and spatial control of cytokinesis in the plant life cycle. *Protoplasma*. Roč. 215, č. 1-4, s. 35–49.
- BRYAN, J.; WILSON, L., 1971. Are Cytoplasmic Microtubules Heteropolymers? *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Roč. 68, č. 8, s. 1762–1766.
- BUEY, R. M.; DÍAZ, J. F.; ANDREU, J. M., 2006. The Nucleotide Switch of Tubulin and Microtubule Assembly: A Polymerization-Driven Structural Change. *Biochemistry*. Roč. 45, č. 19, s. 5933–5938.
- BYRNES, A. E.; SLEP, K. C., 2017. TOG–tubulin binding specificity promotes microtubule dynamics and mitotic spindle formation. *Journal of Cell Biology*. Roč. 216, č. 6, s. 1641–1657.
- CAMILLERI, C.; AZIMZADEH, J.; PASTUGLIA, M.; BELLINI, C.; GRANDJEAN, O.; BOUCHEZ, D., 2002. The Arabidopsis *TONNEAU2* Gene Encodes a Putative Novel Protein Phosphatase 2A Regulatory Subunit Essential for the Control of the Cortical Cytoskeleton. *The Plant Cell*. Roč. 14, č. 4, s. 833–845.
- CARLIER, M.-F.; DIDRY, D.; PANTALONI, D., 1987. Microtubule Elongation and Guanosine 5'-Triphosphate Hydrolysis. Role of Guanine Nucleotides in Microtubule Dynamics. *Biochemistry*. Roč. 26, č. 14, s. 4428–4437.
- CARLIER, M.-F.; PANTALONI, D., 1982. Assembly of Microtubule Protein: Role of Guanosine Di- and Triphosphate Nucleotides. *Biochemistry*. Roč. 21, č. 6, s. 1215–1224.
- CARLIER, M.-F.; PANTALONI, D., 1978. Kinetic Analysis of Cooperativity in Tubulin Polymerization in the Presence of Guanosine Di- or Triphosphate Nucleotides. *Biochemistry*. Roč. 17, č. 10, s. 1908–1915.
- CARLIER, M.-F.; PANTALONI, D., 1981. Kinetic Analysis of Guanosine 5'-Triphosphate Hydrolysis Associated with Tubulin Polymerization. *Biochemistry*. Roč. 20, č. 7, s. 1918–1924.
- CAUDRON, M.; BUNT, G.; BASTIAENS, P.; KARSENTI, E., 2005. Spatial Coordination of Spindle Assembly by Chromosome-Mediated Signaling Gradients. *Science*. Roč. 309, č. 5739, s. 1373–1376.
- CONSOLATI, T.; LOCKE, J.; ROOSTALU, J.; CHEN, Z. A.; GANNON, J.; ASTHANA, J.; LIM, W. M.; MARTINO, F.; CVETKOVIC, M. A.; RAPPILBER, J.; COSTA, A.; SURREY, T., 2020. Microtubule Nucleation Properties of Single Human γ TuRCs Explained by Their Cryo-EM Structure. *Developmental Cell*. Roč. 53, č. 5, s. 603–617.
- COOMBES, C. E.; YAMAMOTO, A.; KENZIE, M. R.; ODDE, D. J.; GARDNER, M. K., 2013. Evolving Tip Structures Can Explain Age-Dependent Microtubule Catastrophe. *Current Biology*. Roč. 23, č. 14, s. 1342–1348.
- COSTA, S., 2017. Are division plane determination and cell-cycle progression coordinated? *New Phytologist*. Roč. 213, č. 1, s. 16–21.

- COTA, R. R.; TEIXIDÓ-TRAVESA, N.; EZQUERRA, A.; EIBES, S.; LACASA, C.; ROIG, J.; LÜDERS, J., 2017. MZT1 regulates microtubule nucleation by linking γ TuRC assembly to adapter-mediated targeting and activation. *Journal of Cell Science*. Roč. 130, č. 2, s. 406–419.
- CYR, R. J.; PALEVITZ, B. A., 1995. Organization of cortical microtubules in plant cells. *Current Opinion in Cell Biology*. Roč. 7, č. 1, s. 65–71.
- DAVID-PFEUTY, T.; ERICKSON, H. P.; PANTALONI, D., 1977. Guanosinetriphosphatase activity of tubulin associated with microtubule assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Roč. 74, č. 12, s. 5372–5376.
- DENTLER, W. L.; GRANETT, S.; WITMAN, G. B.; ROSENBAUM, J. L., 1974. Directionality of Brain Microtubule Assembly *In Vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Roč. 71, č. 5, s. 1710–1714.
- DHONUKSHE, P.; MATHUR, J.; HÜLSKAMP, M.; GADELLA, T. W. J., 2005. Microtubule plus-ends reveal essential links between intracellular polarization and localized modulation of endocytosis during division-plane establishment in plant cells. *BMC Biology*. Roč. 3, č. 1, s. 1–15.
- DIMITROV, A.; QUESNOIT, M.; MOUTEL, S.; CANTALOUBE, I.; POÛS, C.; PEREZ, F., 2008. Detection of GTP-Tubulin Conformation in Vivo Reveals a Role for GTP Remnants in Microtubule Rescues. *Science*. Roč. 322, č. 5906, s. 1353–1356.
- DREVENSEK, S.; GOUSSOT, M.; DUROC, Y.; CHRISTODOULIDOU, A.; STEYAERT, S.; SCHAEFER, E.; DUVERNOIS, E.; GRANDJEAN, O.; VANTARD, M.; BOUCHEZ, D.; PASTUGLIA, M., 2012. The *Arabidopsis* TRM1–TON1 Interaction Reveals a Recruitment Network Common to Plant Cortical Microtubule Arrays and Eukaryotic Centrosomes. *The Plant Cell*. Roč. 24, č. 1, s. 178–191.
- DVOŘÁK TOMAŠTIKOVÁ, E.; RUTTEN, T.; DVOŘÁK, P.; TUGAI, A.; PTOŠKOVÁ, K.; PETROVSKÁ, B.; VAN DAMME, D.; HOUBEN, A.; DOLEŽEL, J.; DEMIDOV, D., 2020. Functional Divergence of Microtubule-Associated TPX2 Family Members in *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Molecular Sciences*. Roč. 21, č. 6, s. 2183.
- ELLIOTT, A.; SHAW, S. L., 2018. Update: Plant Cortical Microtubule Arrays. *Plant Physiology*. Roč. 176, č. 1, s. 94–105.
- 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*. Roč. 115, č. 11, s. 2423–2431.
- ERICKSON, H. P., 1974a. Assembly of Microtubules from Preformed, Ring-Shaped Protofilaments and 6-S Tubulin. *Journal of Supramolecular Structure*. Roč. 2, č. 2-4, s. 393–411.
- ERICKSON, H. P., 1974b. Microtubule Surface Lattice and Subunit Structure and Observations on Reassembly. *The Journal of Cell Biology*. Roč. 60, č. 1, s. 153–167.
- EVARD, J.-L.; PIEUCHOT, L.; VOS, J. W.; VERNOS, I.; SCHMIT, A.-C., 2009. Plant TPX2 and related proteins. *Plant Signaling & Behavior*. Roč. 4, č. 1, s. 69–72.
- FARACHE, D.; JAUNEAU, A.; CHEMIN, C.; CHARTRAIN, M.; RÉMY, M.-H.; MERDES, A.; HAREN, L., 2016. Functional analysis of γ -Tubulin Complex Proteins indicates specific lateral association via their N-terminal domains. *Journal of Biological Chemistry*. Roč. 291, č. 44, s. 23112–23125.
- FAVA, F.; RAYNAUD-MESSINA, B.; LEUNG-TACK, J.; MAZZOLINI, L.; LI, M.; GUILLEMOT, J. C.; CACHOT, D.; TOLLON, Y.; FERRARA, P.; WRIGHT, M., 1999. Human 76p: A New Member of the γ -Tubulin–Associated Protein Family. *The Journal of Cell Biology*. Roč. 147, č. 4, s. 857–868.
- FEIT, H.; SLUSAREK, L.; SHELANSKI, M. L., 1971. Heterogeneity of Tubulin Subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Roč. 68, č. 9, s. 2028–2031.
- FISHEL, E. A.; DIXIT, R., 2013. Role of nucleation in cortical microtubule array organization: variations on a theme. *The Plant Journal*. Roč. 75, č. 2, s. 270–277.

- FLOR-PARRA, I.; IGLESIAS-ROMERO, A. B.; CHANG, F., 2018. The XMAP215 Ortholog Alp14 Promotes Microtubule Nucleation in Fission Yeast. *Current Biology*. Roč. 28, č. 11, s. 1681–1691.
- GARDNER, M. K.; ZANIC, M.; GELL, C.; BORMUTH, V.; HOWARD, J., 2011. Depolymerizing Kinesins Kip3 and MCAK Shape Cellular Microtubule Architecture by Differential Control of Catastrophe. *Cell*. Roč. 147, č. 5, s. 1092–1103.
- GASKIN, F.; CANTOR, C. R.; SHELANSKI, M. L., 1974. Turbidimetric Studies of the in Vitro Assembly and Disassembly of Porcine Neurotubules. *Journal of Molecular Biology*. Roč. 89, č. 4, s. 737–755.
- GEAHLEN, R. L.; HALEY, B. E., 1977. Interactions of a photoaffinity analog of GTP with the proteins of microtubules. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Roč. 74, č. 10, s. 4375–4377.
- GEAHLEN, R. L.; HALEY, B. E., 1979. Use of a GTP Photoaffinity Probe to Resolve Aspects of the Mechanism of Tubulin Polymerization. *Journal of Biological Chemistry*. Roč. 254, č. 23, s. 11982–11987.
- GOLDBERG, Y., 1999. Protein Phosphatase 2A: Who Shall Regulate the Regulator? *Biochemical Pharmacology*. Roč. 57, č. 4, s. 321–328.
- GOMBOS, L.; NEUNER, A.; BERYNSKY, M.; FAVA, L. L.; WADE, R. C.; SACHSE, C.; SCHIEBEL, E., 2013. GTP regulates the microtubule nucleation activity of γ -tubulin. *Nature Cell Biology*. Roč. 15, č. 11, s. 1317–1327.
- GOSHIMA, G.; MAYER, M.; ZHANG, N.; STUURMAN, N.; VALE, R. D., 2008. Augmin: a protein complex required for centrosome-independent microtubule generation within the spindle. *The Journal of Cell Biology*. Roč. 181, č. 3, s. 421–429.
- GOSHIMA, G.; WOLLMAN, R.; GOODWIN, S. S.; ZHANG, N.; SCHOLEY, J. M.; VALE, R. D.; STUURMAN, N., 2007. Genes Required for Mitotic Spindle Assembly in *Drosophila* S2 Cells. *Science*. Roč. 316, č. 5823, s. 417–421.
- GROVER, S.; HAMEL, E., 1994. The magnesium–GTP interaction in microtubule assembly. *European Journal of Biochemistry*. Roč. 222, č. 1, s. 163–172.
- GROVES, M. R.; HANLON, N.; TUROWSKI, P.; HEMMINGS, B. A.; BARFORD, D., 1999. The Structure of the Protein Phosphatase 2A PR65/A Subunit Reveals the Conformation of Its 15 Tandemly Repeated HEAT Motifs. *Cell*. Roč. 96, č. 1, s. 99–110.
- GUILLET, V.; KNIBIEHLER, M.; GREGORY-PAURON, L.; REMY, M.-H.; CHEMIN, C.; RAYNAUD-MESSINA, B.; BON, C.; KOLLMAN, J. M.; AGARD, D. A.; MERDES, A.; MOUREY, L., 2011. Crystal structure of γ -tubulin complex protein GCP4 provides insight into microtubule nucleation. *Nature Structural & Molecular Biology*. Roč. 18, č. 8, s. 915.
- GUNAWARDANE, R. N.; MARTIN, O. C.; CAO, K.; ZHANG, L.; DEJ, K.; IWAMATSU, A.; ZHENG, Y., 2000. Characterization and Reconstitution of *Drosophila* γ -Tubulin Ring Complex Subunits. *The Journal of Cell Biology*. Roč. 151, č. 7, s. 1513–1524.
- GUNAWARDANE, R. N.; MARTIN, O. C.; ZHENG, Y., 2003. Characterization of a New γ TuRC Subunit with WD Repeats. *Molecular Biology of the Cell*. Roč. 14, č. 3, s. 1017–1026.
- GUNZELMANN, J.; RÜTHNICK, D.; LIN, T.; ZHANG, W.; NEUNER, A.; JÄKLE, U.; SCHIEBEL, E., 2018. The microtubule polymerase Stu2 promotes oligomerization of the γ -TuSC for cytoplasmic microtubule nucleation. *eLife*. Roč. 7, e39932.
- HAIZEL, T.; MERKLE, T.; PAY, A.; FEJES, E.; NAGY, F., 1997. Characterization of proteins that interact with the GTP-bound form of the regulatory GTPase Ran in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. Roč. 11, č. 1, s. 93–103.
- HAREN, L.; FARACHE, D.; EMORINE, L.; MERDES, A., 2020. A stable sub-complex between GCP4, GCP5 and GCP6 promotes the assembly of γ -tubulin ring complexes. *Journal of Cell Science*. Roč. 133, č. 11.
- HASEZAWA, S.; MARC, J.; PALEVITZ, B. A., 1991. Microtubule Reorganization During the Cell Cycle in Synchronized BY-2 Tobacco Suspensions. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. Roč. 18, č. 2, s. 94–106.

- HASHIMOTO, T., 2013. A ring for all: γ -tubulin-containing nucleation complexes in acentrosomal plant microtubule arrays. *Current Opinion in Plant Biology*. Roč. 16, č. 6, s. 698–703.
- HASHIMOTO, T., 2015. Microtubules in Plants. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*. Roč. 13.
- HO, C.-M. K.; HOTTA, T.; KONG, Z.; ZENG, C. J. T.; SUN, J.; LEE, Y.-R. J.; LIU, B., 2011. Augmin Plays a Critical Role in Organizing the Spindle and Phragmoplast Microtubule Arrays in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. Roč. 23, č. 7, s. 2606–2618.
- HORIO, T.; UZAWA, S.; JUNG, M. K.; OAKLEY, B. R.; TANAKA, K.; YANAGIDA, M., 1991. The fission yeast γ -tubulin is essential for mitosis and is localized at microtubule organizing centers. *Journal of Cell Science*. Roč. 99, č. 4, s. 693–700.
- HOTTA, T.; HARAGUCHI, T.; MIZUNO, K., 2007. A Novel Function of Plant Histone H1: Microtubule Nucleation and Continuous Plus End Association. *Cell Structure and Function*. Roč. 32, č. 2, s. 79–87.
- HOTTA, T.; KONG, Z.; HO, C.-M. K.; ZENG, C. J. T.; HORIO, T.; FONG, S.; VUONG, T.; LEE, Y.-R. J.; LIU, B., 2012. Characterization of the *Arabidopsis* Augmin Complex Uncovers Its Critical Function in the Assembly of the Acentrosomal Spindle and Phragmoplast Microtubule Arrays. *The Plant Cell*. Roč. 24, č. 4, s. 1494–1509.
- HSIA, K.-C.; WILSON-KUBALEK, E. M.; DOTTORE, A.; HAO, Q.; TSAI, K.-L.; FORTH, S.; SHIMAMOTO, Y.; MILLIGAN, R. A.; KAPOOR, T. M., 2014. Reconstitution of the augmin complex provides insights into its architecture and function. *Nature Cell Biology*. Roč. 16, č. 9, s. 852–863.
- HUANG, T.-L.; WANG, H.-J.; CHANG, Y.-C.; WANG, S.-W.; HSIA, K.-C., 2020. Promiscuous Binding of Microprotein Mozart1 to γ -Tubulin Complex Mediates Specific Subcellular Targeting to Control Microtubule Array Formation. *Cell Reports*. Roč. 31, č. 13, s. 107836.
- HUTCHINS, J. R. A.; TOYODA, Y.; HEGEMANN, B.; POSER, I.; HÉRICHE, J.-K.; SYKORA, M. M.; AUGSBURG, M.; HUDECZ, O.; BUSCHHORN, B. A.; BULKESCHER, J. et al., 2010. Systematic Analysis of Human Protein Complexes Identifies Chromosome Segregation Proteins. *Science*. Roč. 328, č. 5978, s. 593–599.
- CHAN, J.; CALDER, G.; FOX, S.; LLOYD, C., 2005. Localization of the Microtubule End Binding Protein EB1 Reveals Alternative Pathways of Spindle Development in *Arabidopsis* Suspension Cells. *The Plant Cell*. Roč. 17, č. 6, s. 1737–1748.
- 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*. Roč. 21, č. 8, s. 2298–2306.
- CHEN, J. W. C.; CHEN, Z. A.; ROGALA, K. B.; METZ, J.; DEANE, C. M.; RAPPSILBER, J.; WAKEFIELD, J. G., 2017. Cross-linking mass spectrometry identifies new interfaces of Augmin required to localise the γ -tubulin ring complex to the mitotic spindle. *Biology Open*. Roč. 6, č. 5, s. 654–663.
- CHOY, R. M.; KOLLMAN, J. M.; ZELTER, A.; DAVIS, T. N.; AGARD, D. A., 2009. Localization and orientation of the γ -Tubulin Small Complex components using protein tags as labels for single particle EM. *Journal of Structural Biology*. Roč. 168, č. 3, s. 571–574.
- CHRÉTIEN, D.; FULLER, S. D.; KARSENTI, E., 1995. Structure of Growing Microtubule Ends: Two-Dimensional Sheets Close Into Tubes at Variable Rates. *The Journal of Cell Biology*. Roč. 129, č. 5, s. 1311–1328.
- JACOBS, M.; SMITH, H.; TAYLOR, E. W., 1974. Tubulin: Nucleotide Binding and Enzymic Activity. *Journal of Molecular Biology*. Roč. 89, č. 3, s. 455–468.
- JANKE, C., 2014. The tubulin code: Molecular components, readout mechanisms, and functions. *Journal of Cell Biology*. Roč. 206, č. 4, s. 461–472.
- JANKE, C.; BULINSKI, J. C., 2011. Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nature reviews - Molecular cell biology*. Roč. 12, č. 12, s. 773–786.

- JANSKI, N.; HERZOG, E.; SCHMIT, A.-C., 2008. Identification of a novel small *Arabidopsis* protein interacting with γ -tubulin complex protein 3. *Cell Biology International*. Roč. 32, č. 5, s. 546–548.
- JANSKI, N.; MASOUD, K.; BATZENSCHLAGER, M.; HERZOG, E.; EVRARD, J.-L.; HOULNÉ, G.; BOURGE, M.; CHABOUTÉ, M.-E.; SCHMIT, A.-C., 2012. The GCP3-Interacting Proteins GIP1 and GIP2 Are Required for γ -Tubulin Complex Protein Localization, Spindle Integrity, and Chromosomal Stability. *The Plant Cell*. Roč. 24, č. 3, s. 1171–1187.
- JANSSENS, V.; GORIS, J., 2001. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochemical Journal*. Roč. 353, č. 3, s. 417–439.
- JOHMURA, Y.; SOUNG, N.-K.; PARK, J.-E.; YU, L.-R.; ZHOU, M.; BANG, J. K.; KIM, B.-Y.; VEENSTRA, T. D.; ERIKSON, R. L.; LEE, K. S., 2011. Regulation of microtubule-based microtubule nucleation by mammalian polo-like kinase 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Roč. 108, č. 28, s. 11446–11451.
- KALÁB, P.; PRALLE, A.; ISACOFF, E. Y.; HEALD, R.; WEIS, K., 2006. Analysis of a RanGTP-regulated gradient in mitotic somatic cells. *Nature*. Roč. 440, č. 7084, s. 697–701.
- KAWAMURA, E.; HIMMELSPACH, R.; RASHBROOKE, M. C.; WHITTINGTON, A. T.; GALE, K. R.; COLLINGS, D. A.; WASTENEYS, G. O., 2006. MICROTUBULE ORGANIZATION 1 Regulates Structure and Function of Microtubule Arrays during Mitosis and Cytokinesis in the *Arabidopsis* Root. *Plant physiology*. Roč. 140, č. 1, s. 102–114.
- KIM, S.-H.; ARNOLD, D.; LLOYD, A.; ROUX, S. J., 2001. Antisense Expression of an *Arabidopsis* Ran Binding Protein Renders Transgenic Roots Hypersensitive to Auxin and Alters Auxin-Induced Root Growth and Development by Arresting Mitotic Progress. *The Plant Cell*. Roč. 13, č. 12, s. 2619–2630.
- KING, M. R.; PETRY, S., 2020. Phase separation of TPX2 enhances and spatially coordinates microtubule nucleation. *Nature Communications*. Roč. 11, č. 1, s. 1–13.
- KIRIK, A.; EHRHARDT, D. W.; KIRIK, V., 2012. TONNEAU2/FASS Regulates the Geometry of Microtubule Nucleation and Cortical Array Organization in Interphase *Arabidopsis* Cells. *The Plant Cell*. Roč. 24, č. 3, s. 1158–1170.
- KIRSCHNER, M. W.; WILLIAMS, R. C.; WEINGARTEN, M.; GERHART, J. C., 1974. Microtubules from Mammalian Brain: Some Properties of Their Depolymerization Products and a Proposed Mechanism of Assembly and Disassembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Roč. 71, č. 4, s. 1159–1163.
- KOBAYASHI, T., 1975. Dephosphorylation of Tubulin-bound Guanosine Triphosphate during Microtubule Assembly. *The Journal of Biochemistry*. Roč. 77, č. 6, s. 1193–1197.
- KOBAYASHI, T., 1974. Nucleotides Bound to Brain Tubulin and Reconstituted Microtubules. *The Journal of Biochemistry*. Roč. 76, č. 1, s. 201–204.
- KOLLMAN, J. M.; GREENBERG, C. H.; LI, S.; MORITZ, M.; ZELTER, A.; FONG, K. K.; FERNANDEZ, J.-J.; SALI, A.; KILMARTIN, J.; DAVIS, T. N.; AGARD, D. A., 2015. Ring closure activates yeast γ TuRC for species-specific microtubule nucleation. *Nature Structural & Molecular Biology*. Roč. 22, č. 2, s. 132–137.
- KOLLMAN, J. M.; MERDES, A.; MOUREY, L.; AGARD, D. A., 2011. Microtubule nucleation by γ -tubulin complexes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Roč. 12, č. 11, s. 709–721.
- KOLLMAN, J. M.; POLKA, J. K.; ZELTER, A.; DAVIS, T. N.; AGARD, D. A., 2010. Microtubule nucleating γ -TuSC assembles structures with 13-fold microtubule-like symmetry. *Nature*. Roč. 466, č. 7308, s. 879–882.
- KOLLMAN, J. M.; ZELTER, A.; MULLER, E. G. D.; FOX, B.; RICE, L. M.; DAVIS, T. N.; AGARD, D. A., 2008. The Structure of the γ -Tubulin Small Complex: Implications of Its Architecture and Flexibility for Microtubule Nucleation. *Molecular Biology of the Cell*. Roč. 19, č. 1, s. 207–215.

- KONG, Z.; HOTTA, T.; LEE, Y.-R. J.; HORIO, T.; LIU, B., 2010. The γ -Tubulin Complex Protein GCP4 Is Required for Organizing Functional Microtubule Arrays in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*. Roč. 22, č. 1, s. 191–204.
- KOSETSU, K.; MURATA, T.; YAMADA, M.; NISHINA, M.; BORUC, J.; HASEBE, M.; VAN DAMME, D.; GOSHIMA, G., 2017. Cytoplasmic MTOCs control spindle orientation for asymmetric cell division in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Roč. 114, č. 42, E8847–E8854.
- KRAUHS, E.; LITTLE, M.; KEMPF, T.; HOFER-WARBINEK, R.; ADE, W.; PONSTINGL, H., 1981. Complete amino acid sequence of β -tubulin from porcine brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Roč. 78, č. 7, s. 4156–4160.
- KUHN, M.; HYMAN, A. A.; BEYER, A., 2014. Coiled-Coil Proteins Facilitated the Functional Expansion of the Centrosome. *PLoS Comput Biol*. Roč. 10, č. 6, e1003657.
- KUMAGAI, F.; NAGATA, T.; YAHARA, N.; MORIYAMA, Y.; HORIO, T.; NAOI, K.; HASHIMOTO, T.; MURATA, T.; HASEZAWA, S., 2003. γ -tubulin distribution during cortical microtubule reorganization at the M/G1 interface in tobacco BY-2 cells. *European Journal of Cell Biology*. Roč. 82, č. 1, s. 43–51.
- KUMAGAI, F.; YONEDA, A.; TOMIDA, T.; SANO, T.; NAGATA, T.; HASEZAWA, S., 2001. Fate of Nascent Microtubules Organized at the M/G1 Interface, as Visualized by Synchronized Tobacco BY-2 Cells Stably Expressing GFP-Tubulin: Time-Sequence Observations of the Reorganization of Cortical Microtubules in Living Plant Cells. *Plant and Cell Physiology*. Roč. 42, č. 7, s. 723–732.
- LAWO, S.; BASHKUROV, M.; MULLIN, M.; FERRERIA, M. G.; KITTLER, R.; HABERMANN, B.; TAGLIAFERRO, A.; POSER, I.; HUTCHINS, J. R. A.; HEGEMANN, B.; PINCHEV, D.; BUCHHOLZ, F.; PETERS, J.-M.; HYMAN, A. A.; GINGRAS, A.-C.; PELLETIER, L., 2009. HAUS, the 8-Subunit Human Augmin Complex, Regulates Centrosome and Spindle Integrity. *Current Biology*. Roč. 19, č. 10, s. 816–826.
- LEDBETTER, M. C.; PORTER, K. R., 1963. A "Microtubule" in Plant Cell Fine Structure. *The Journal of Cell Biology*. Roč. 19, č. 1, s. 239–250.
- LEDBETTER, M. C.; PORTER, K. R., 1964. Morphology of Microtubules of Plant Cells. *Science*. Roč. 144, č. 3620, s. 872–874.
- LEE, Y.-R. J.; HIWATASHI, Y.; HOTTA, T.; XIE, T.; DOONAN, J. H.; LIU, B., 2017. The Mitotic Function of Augmin Is Dependent on Its Microtubule-Associated Protein Subunit EDE1 in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology*. Roč. 27, č. 24, s. 3891–3897.
- LEE, Y.-R. J.; LIU, B., 2019. Microtubule nucleation for the assembly of acentrosomal microtubule arrays in plant cells. *New Phytologist*. Roč. 222, č. 4, s. 1705–1718.
- LIU, B.; JOSHI, H. C.; WILSON, T. J.; SILFLOW, C. D.; PALEVITZ, B. A.; SNUSTAD, D. P., 1994. γ -Tubulin in Arabidopsis: Gene Sequence, Immunoblot, and Immunofluorescence Studies. *The Plant Cell*. Roč. 6, č. 2, s. 303–314.
- 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*. Roč. 104, č. 4, s. 1217–1228.
- LIU, B.; PALEVITZ, B. A.; JOSHI, H. C., 1995. Experimental Manipulation of γ -Tubulin Distribution in *Arabidopsis* Using Anti-Microtubule Drugs. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. Roč. 31, č. 2, s. 113–129.
- LIU, P.; WÜRTZ, M.; ZUPA, E.; PFEFFER, S.; SCHIEBEL, E., 2021. Microtubule nucleation: The waltz between γ -tubulin ring complex and associated proteins. *Current Opinion in Cell Biology*. Roč. 68, s. 124–131.
- LIU, P.; ZUPA, E.; NEUNER, A.; BÖHLER, A.; LOERKE, J.; FLEMMING, D.; RUPPERT, T.; RUDACK, T.; PETER, C.; SPAHN, C.; GRUSS, O. J.; PFEFFER, S.; SCHIEBEL, E., 2020. Insights into the assembly and activation of the microtubule nucleator γ -TuRC. *Nature*. Roč. 578, č. 7795, s. 467–471.

- LIU, T.; TIAN, J.; WANG, G.; YU, Y.; WANG, C.; MA, Y.; ZHANG, X.; XIA, G.; LIU, B.; KONG, Z., 2014. Augmin Triggers Microtubule-Dependent Microtubule Nucleation in Interphase Plant Cells. *Current Biology*. Roč. 24, č. 22, s. 2708–2713.
- LIVANOS, P.; MÜLLER, S., 2019. Division Plane Establishment and Cytokinesis. *Annual Review of Plant Biology*. Roč. 70, s. 239–267.
- LLOYD, C.; CHAN, J., 2006. Not so divided: the common basis of plant and animal cell division. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Roč. 7, č. 2, s. 147–152.
- LÖWE, J.; LI, H.; DOWNING, K. H.; NOGALES, E., 2001. Refined Structure of $\alpha\beta$ -Tubulin at 3.5 Å Resolution. *Journal of Molecular Biology*. Roč. 313, č. 5, s. 1045–1057.
- LÜDERS, J., 2018. XMAP215 joins microtubule nucleation team. *Nature Cell Biology*. Roč. 20, č. 5, s. 508–510.
- LUDUENA, R. F.; WOODWARD, D. O., 1973. Isolation and Partial Characterization of α - and β -Tubulin from Outer Doublets of Sea-Urchin Sperm and Microtubules of Chick-Embryo Brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Roč. 70, č. 12, s. 3594–3598.
- MA, D.; GAO, L.; HAN, R., 2020. Effects of the protein GCP4 on gametophyte development in *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma*, s. 1–11.
- MA, H.; XU, L.; FU, Y.; ZHU, L., 2021. *Arabidopsis* QWRF1 and QWRF2 Redundantly Modulate Cortical Microtubule Arrangement in Floral Organ Growth and Fertility. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Roč. 9.
- MANDELKOW, E.-M.; MANDELKOW, E.; MILLIGAN, R. A., 1991. Microtubule Dynamics and Microtubule Caps: A Time-Resolved Cryo-Electron Microscopy Study. *The Journal of Cell Biology*. Roč. 114, č. 5, s. 977–991.
- MANDELKOW, E.-M.; SCHULTHEISS, R.; RAPP, R.; MÜLLER, M.; MANDELKOW, E., 1986. On the Surface Lattice of Microtubules: Helix Starts, Protofilament Number, Seam, and Handedness. *The Journal of Cell Biology*. Roč. 102, č. 3, s. 1067–1073.
- MARGOLIS, R. L.; WILSON, L., 1978. Opposite End Assembly and Disassembly of Microtubules at Steady State in Vitro. *Cell*. Roč. 13, č. 1, s. 1–8.
- MCCLINTON, R. S.; SUNG, Z. R., 1997. Organization of cortical microtubules at the plasma membrane in *Arabidopsis*. *Planta*. Roč. 201, č. 3, s. 252–260.
- MEIER, I.; RICHARDS, E. J.; EVANS, D. E., 2017. Cell Biology of the Plant Nucleus. *Annual Review of Plant Biology*. Roč. 68, s. 139–172.
- MIAO, H.; GUO, R.; CHEN, J.; WANG, Q.; LEE, Y.-R. J.; LIU, B., 2019. The γ -tubulin complex protein GCP6 is crucial for spindle morphogenesis but not essential for microtubule reorganization in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Roč. 116, č. 52, s. 27115–27123.
- MITCHISON, T.; KIRSCHNER, M., 1984. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature*. Roč. 312, č. 5991, s. 237–242.
- MITCHISON, T. J., 1993. Localization of an Exchangeable GTP Binding Site at the Plus End of Microtubules. *Science*. Roč. 261, č. 5124, s. 1044–1047.
- MORITZ, M.; BRAUNFELD, M. B.; GUÉNEBAUT, V.; HEUSER, J.; AGARD, D. A., 2000. Structure of the γ -tubulin ring complex: a template for microtubule nucleation. *Nature Cell Biology*. Roč. 2, č. 6, s. 365–370.
- MORITZ, M.; ZHENG, Y.; ALBERTS, B. M.; OEGEMA, K., 1998. Recruitment of the γ -Tubulin Ring Complex to *Drosophila* Salt-Stripped Centrosome Scaffolds. *The Journal of Cell Biology*. Roč. 142, č. 3, s. 775–786.
- MURATA, T.; SANO, T.; SASABE, M.; NONAKA, S.; HIGASHIYAMA, T.; HASEZAWA, S.; MACHIDA, Y.; HASEBE, M., 2013. Mechanism of microtubule array expansion in the cytokinetic phragmoplast. *Nature Communications*. Roč. 4, č. 1, s. 1–12.

- MURATA, T.; SONOBE, S.; BASKIN, T. I.; HYODO, S.; HASEZAWA, S.; NAGATA, T.; HORIO, T.; HASEBE, M., 2005. Microtubule-dependent microtubule nucleation based on recruitment of γ -tubulin in higher plants. *Nature Cell Biology*. Roč. 7, č. 10, s. 961–968.
- MURPHY, S. M.; PREBLE, A. M.; PATEL, U. K.; O'CONNELL, K. L.; DIAS, D. P.; MORITZ, M.; AGARD, D.; STULTS, J. T.; STEARNS, T., 2001. GCP5 and GCP6: Two New Members of the Human γ -Tubulin Complex. *Molecular Biology of the Cell*. Roč. 12, č. 11, s. 3340–3352.
- MURPHY, S. M.; URBANI, L.; STEARNS, T., 1998. The Mammalian γ -Tubulin Complex Contains Homologues of the Yeast Spindle Pole Body Components Spc97p and Spc98p. *The Journal of Cell Biology*. Roč. 141, č. 3, s. 663–674.
- 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*. Roč. 12, č. 11, s. 1064–1070.
- 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*. Roč. 122, č. 13, s. 2208–2217.
- NAKAMURA, M.; YAGI, N.; KATO, T.; FUJITA, S.; KAWASHIMA, N.; EHRHARDT, D. W.; HASHIMOTO, T., 2012. Arabidopsis GCP3-interacting protein 1/MOZART 1 is an integral component of the γ -tubulin-containing microtubule nucleating complex. *The Plant Journal*. Roč. 71, č. 2, s. 216–225.
- NAKAOKA, Y.; MIKI, T.; FUJIOKA, R.; UEHARA, R.; TOMIOKA, A.; OBUSE, C.; KUBO, M.; HIWATASHI, Y.; GOSHIMA, G., 2012. An Inducible RNA Interference System in *Physcomitrella patens* Reveals a Dominant Role of Augmin in Phragmoplast Microtubule Generation. *The Plant Cell*. Roč. 24, č. 4, s. 1478–1493.
- NAKAYAMA, T.; ISHII, T.; HOTTA, T.; MIZUNO, K., 2008. Radial Microtubule Organization by Histone H1 on Nuclei of Cultured Tobacco BY-2 Cells. *Journal of Biological Chemistry*. Roč. 283, č. 24, s. 16632–16640.
- NIELSEN, E., 2020. The Small GTPase Superfamily in Plants: A Conserved Regulatory Module with Novel Functions. *Annual Review of Plant Biology*. Roč. 71, s. 247–272.
- NOGALES, E.; WOLF, S. G.; DOWNING, K. H., 1998. Structure of the $\alpha\beta$ tubulin dimer by electron crystallography. *Nature*. Roč. 391, č. 6663, s. 199–203.
- OAKLEY, B. R., 1992. γ -Tubulin: the microtubule organizer? *Trends in Cell Biology*. Roč. 2, č. 1, s. 1–5.
- OAKLEY, B. R.; OAKLEY, C. E.; YOON, Y.; JUNG, M. K., 1990. γ -Tubulin is a Component of the Spindle Pole Body That Is Essential for Microtubule Function in *Aspergillus nidulans*. *Cell*. Roč. 61, č. 7, s. 1289–1301.
- OAKLEY, C. E.; OAKLEY, B. R., 1989. Identification of γ -tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by *mipA* gene of *Aspergillus nidulans*. *Nature*. Roč. 338, č. 6217, s. 662–664.
- ODDE, D. J.; CASSIMERIS, L.; BUETTNER, H. M., 1995. Kinetics of Microtubule Catastrophe Assessed by Probabilistic Analysis. *Biophysical Journal*. Roč. 69, č. 3, s. 796–802.
- OEGEMA, K.; WIESE, C.; MARTIN, O. C.; MILLIGAN, R. A.; IWAMATSU, A.; MITCHISON, T. J.; ZHENG, Y., 1999. Characterization of Two Related *Drosophila* γ -tubulin Complexes that Differ in Their Ability to Nucleate Microtubules. *Journal of Cell Biology*. Roč. 144, č. 4, s. 721–733.
- OH, S.-A.; JEON, J.; PARK, H.-J.; GRINI, P. E.; TWELL, D.; PARK, S. K., 2016. Analysis of *geminipollen 3* mutant suggests a broad function of AUGMIN in microtubule organization during sexual reproduction in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. Roč. 87, č. 2, s. 188–201.
- OLMSTED, J. B.; BORISY, G. G., 1973. Characterization of Microtubule Assembly in Porcine Brain Extracts by Viscometry. *Biochemistry*. Roč. 12, č. 21, s. 4282–4289.
- PASTUGLIA, M.; AZIMZADEH, J.; GOUSSOT, M.; CAMILLERI, C.; BELCRAM, K.; EVRARD, J.-L.; SCHMIT, A.-C.; GUERCHE, P.; BOUCHEZ, D., 2006. γ -Tubulin Is Essential for Microtubule Organization and Development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. Roč. 18, č. 6, s. 1412–1425.

- PATEL, S.; ROSE, A.; MEULIA, T.; DIXIT, R.; CYR, R. J.; MEIER, I., 2004. Arabidopsis WPP-Domain Proteins Are Developmentally Associated with the Nuclear Envelope and Promote Cell Division. *The Plant Cell*. Roč. 16, č. 12, s. 3260–3273.
- PAY, A.; RESCH, K.; FROHNMEYER, H.; FEJES, E.; NAGY, F.; NICK, P., 2002. Plant RanGAPs are localized at the nuclear envelope in interphase and associated with microtubules in mitotic cells. *The Plant Journal*. Roč. 30, č. 6, s. 699–709.
- PEASE, D. C., 1963. The Ultrastructure of Flagellar Fibrils. *The Journal of Cell Biology*. Roč. 18, č. 2, s. 313–326.
- PÉREZ-CALLEJÓN, E.; CASAMAYOR, A.; PUJOL, G.; CAMPS, M.; FERRER, A.; ARIÑO, J., 1998. Molecular cloning and characterization of two phosphatase 2A catalytic subunit genes from *Arabidopsis thaliana*. *Gene*. Roč. 209, č. 1-2, s. 105–112.
- PERRIN, R. M.; WANG, Y.; YUEN, C. Y. L.; WILL, J.; MASSON, P. H., 2007. WVD2 is a novel microtubule-associated protein in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. Roč. 49, č. 6, s. 961–971.
- PETROVSKÁ, B.; CENKLOVÁ, V.; POCHYLOVÁ, Ž.; KOUROVÁ, H.; DOSKOČILOVÁ, A.; PLÍHAL, O.; BINAROVÁ, L.; BINAROVÁ, P., 2012. Plant Aurora kinases play a role in maintenance of primary meristems and control of endoreduplication. *New Phytologist*. Roč. 193, č. 3, s. 590–604.
- PETROVSKÁ, B.; JEŘÁBKOVÁ, H.; KOHOUTOVÁ, L.; CENKLOVÁ, V.; POCHYLOVÁ, Ž.; GELOVÁ, Z.; KOČÁROVÁ, G.; VÁCHOVÁ, L.; KUREJOVÁ, M.; TOMAŠTÍKOVÁ, E.; BINAROVÁ, P., 2013. Overexpressed TPX2 causes ectopic formation of microtubular arrays in the nuclei of acentrosomal plant cells. *Journal of Experimental Botany*. Roč. 64, č. 14, s. 4575–4587.
- PETRY, S.; GROEN, A. C.; ISHIHARA, K.; MITCHISON, T. J.; VALE, R. D., 2013. Branching Microtubule Nucleation in *Xenopus* Egg Extracts Mediated by Augmin and TPX2. *Cell*. Roč. 152, č. 4, s. 768–777.
- PIGNOCCHI, C.; DOONAN, J. H., 2011. Interaction of a 14-3-3 protein with the plant microtubule-associated protein EDE1. *Annals of Botany*. Roč. 107, č. 7, s. 1103–1109.
- PIGNOCCHI, C.; MINNS, G. E.; NESI, N.; KOUMPROGLOU, R.; KITSIOS, G.; BENNING, C.; LLOYD, C. W.; DOONAN, J. H.; HILLS, M. J., 2009. ENDOSPERM DEFECTIVE1 Is a Novel Microtubule-Associated Protein Essential for Seed Development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. Roč. 21, č. 1, s. 90–105.
- PINYOL, R.; SCROFANI, J.; VERNOS, I., 2013. The Role of NEDD1 Phosphorylation by Aurora A in Chromosomal Microtubule Nucleation and Spindle Function. *Current Biology*. Roč. 23, č. 2, s. 143–149.
- PONSTINGL, H.; KRAUHS, E.; LITTLE, M.; KEMPF, T., 1981. Complete amino acid sequence of α -tubulin from porcine brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Roč. 78, č. 5, s. 2757–2761.
- REID, T. A.; SCHUSTER, B. M.; MANN, B. J.; BALCHAND, S. K.; PLOOSTER, M.; MCCLELLAN, M.; COOMBES, C. E.; WADSWORTH, P.; GARDNER, M. K., 2016. Suppression of microtubule assembly kinetics by the mitotic protein TPX2. *Journal of Cell Science*. Roč. 129, č. 7, s. 1319–1328.
- RICE, L. M.; MONTABANA, E. A.; AGARD, D. A., 2008. The lattice as allosteric effector: Structural studies of $\alpha\beta$ - and γ -tubulin clarify the role of GTP in microtubule assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Roč. 105, č. 14, s. 5378–5383.
- ROOSTALU, J.; CADE, N. I.; SURREY, T., 2015. Complementary activities of TPX2 and chTOG constitute an efficient importin-regulated microtubule nucleation module. *Nature Cell Biology*. Roč. 17, č. 11, s. 1422–1434.
- SDELICI, S.; SCHÜTZ, M.; PINYOL, R.; BERTRAN, M. T.; REGUÉ, L.; CAELLES, C.; VERNOS, I.; ROIG, J., 2012. Nek9 Phosphorylation of NEDD1/GCP-WD Contributes to Plk1 Control of γ -Tubulin Recruitment to the Mitotic Centrosome. *Current Biology*. Roč. 22, č. 16, s. 1516–1523.
- SELTZER, V.; JANSKI, N.; CANADAY, J.; HERZOG, E.; ERHARDT, M.; EVRARD, J.-L.; SCHMIT, A.-C., 2007. Arabidopsis GCP2 and GCP3 are part of a soluble γ -tubulin complex and have nuclear envelope targeting domains. *The Plant Journal*. Roč. 52, č. 2, s. 322–331.

- SELTZER, V.; PAWLOWSKI, T.; CAMPAGNE, S.; CANADAY, J.; ERHARDT, M.; EVRARD, J.-L.; HERZOG, E.; SCHMIT, A.-C., 2003. Multiple microtubule nucleation sites in higher plants. *Cell Biology International*. Roč. 27, č. 3, s. 267–269.
- SETRU, S. U.; GOUVEIA, B.; ALFARO-ACO, R.; SHAEVITZ, J. W.; STONE, H. A.; PETRY, S., 2021. A hydrodynamic instability drives protein droplet formation on microtubules to nucleate branches. *Nature Physics*, s. 1–6.
- SHAW, S. L.; KAMYAR, R.; EHRHARDT, D. W., 2003. Sustained Microtubule Treadmilling in *Arabidopsis* Cortical Arrays. *Science*. Roč. 300, č. 5626, s. 1715–1718.
- SHELANSKI, M. L.; TAYLOR, E. W., 1968. Properties of the Protein Subunit of Central-Pair and Outer-Douplet Microtubules of Sea Urchin Flagella. *The Journal of Cell Biology*. Roč. 38, č. 2, s. 304–315.
- SCHAEFER, E.; BELCRAM, K.; UYTTEWAAL, M.; DUROC, Y.; GOUSSOT, M.; LEGLAND, D.; LARUELLE, E.; TAUZIA-MOREAU, M.-L. de; PASTUGLIA, M.; BOUCHEZ, D., 2017. The preprophase band of microtubules controls the robustness of division orientation in plants. *Science*. Roč. 356, č. 6334, s. 186–189.
- SCHATZ, C. A.; SANTARELLA, R.; HOENGER, A.; KARSENTI, E.; MATTAJ, I. W.; GRUSS, O. J.; CARAZO-SALAS, R. E., 2003. Importin α -regulated nucleation of microtubules by TPX2. *The EMBO Journal*. Roč. 22, č. 9, s. 2060–2070.
- SCHEK III, H. T.; GARDNER, M. K.; CHENG, J.; ODDE, D. J.; HUNT, A. J., 2007. Microtubule Assembly Dynamics at the Nanoscale. *Current Biology*. Roč. 17, č. 17, s. 1445–1455.
- SCHLAITZ, A.-L.; SRAYKO, M.; DAMMERMAN, A.; QUINTIN, S.; WIELSCH, N.; MACLEOD, I.; ROBILLARD, Q. de; ZINKE, A.; YATES III, J. R.; MÜLLER-REICHERT, T.; SHEVCHENKO, A.; OEGEMA, K.; HYMAN, A. A., 2007. The *C. elegans* RSA Complex Localizes Protein Phosphatase 2A to Centrosomes and Regulates Mitotic Spindle Assembly. *Cell*. Roč. 128, č. 1, s. 115–127.
- SINGLA, V.; ROMAGUERA-ROS, M.; GARCIA-VERDUGO, J. M.; REITER, J. F., 2010. *Ofd1*, a Human Disease Gene, Regulates the Length and Distal Structure of Centrioles. *Developmental Cell*. Roč. 18, č. 3, s. 410–424.
- SMERTENKO, A.; ASSAAD, F.; BALUŠKA, F.; BEZANILLA, M.; BUSCHMANN, H.; DRAKAKAKI, G.; HAUSER, M.-T.; JANSON, M.; MINEYUKI, Y.; MOORE, I.; MÜLLER, S.; MURATA, T.; OTEGUI, M. S.; PANTERIS, E.; RASMUSSEN, C.; SCHMIT, A.-C.; ŠAMAJ, J.; SAMUELS, L.; STAEHELIN, L. A.; VAN DAMME, D.; WASTENEYS, G.; ŽÁRSKÝ, V., 2017. Plant Cytokinesis: Terminology for Structures and Processes. *Trends in Cell Biology*. Roč. 27, č. 12, s. 885–894.
- SMERTENKO, A.; CLARE, S. J.; EFFERTZ, K.; PARISH, A.; ROSS, A.; SCHMIDT, S., 2020. A guide to plant TPX2-like and WAVE-DAMPENED2-like proteins. *Journal of Experimental Botany*.
- SMERTENKO, A.; HEWITT, S. L.; JACQUES, C. N.; KACPRZYK, R.; LIU, Y.; MARCEC, M. J.; MOYO, L.; OGDEN, A.; OUNG, H. M.; SCHMIDT, S.; SERRANO-ROMERO, E. A., 2018. Phragmoplast microtubule dynamics – a game of zones. *Journal of Cell Science*. Roč. 131, č. 2.
- SONG, J.-G.; KING, M. R.; ZHANG, R.; KADZIK, R. S.; THAWANI, A.; PETRY, S., 2018. Mechanism of how augmin directly targets the γ -tubulin ring complex to microtubules. *Journal of Cell Biology*. Roč. 217, č. 7, s. 2417–2428.
- SPINNER, L.; GADEYNE, A.; BELCRAM, K.; GOUSSOT, M.; MOISON, M.; DUROC, Y.; EECKHOUT, D.; DE WINNE, N.; SCHAEFER, E.; VAN DE SLIJKE, E.; PERSIAU, G.; WITTERS, E.; GEVAERT, K.; DE JAEGER, G.; BOUCHEZ, D.; VAN DAMME, D.; PASTUGLIA, M., 2013. A protein phosphatase 2A complex spatially controls plant cell division. *Nature Communications*. Roč. 4, č. 1, s. 1–13.
- SPINNER, L.; PASTUGLIA, M.; BELCRAM, K.; PEGORARO, M.; GOUSSOT, M.; BOUCHEZ, D.; SCHAEFER, D. G., 2010. The function of TONNEAU1 in moss reveals ancient mechanisms of division plane specification and cell elongation in land plants. *Development*. Roč. 137, č. 16, s. 2733–2742.

- STEARNS, T.; EVANS, L.; KIRSCHNER, M., 1991. γ -Tubulin Is a Highly Conserved Component of the Centrosome. *Cell*. Roč. 65, č. 5, s. 825–836.
- STEVENS, R. E.; RENAUD, F. L.; GIBBONS, I. R., 1967. Guanine Nucleotide Associated with the Protein of the Outer Fibers of Flagella and Cilia. *Science*. Roč. 156, č. 3782, s. 1606–1608.
- 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*. Roč. 6, č. 8, s. 1099–1106.
- SUGIYAMA, N.; NAKAGAMI, H.; MOCHIDA, K.; DAUDI, A.; TOMITA, M.; SHIRASU, K.; ISHIHAMA, Y., 2008. Large-scale phosphorylation mapping reveals the extent of tyrosine phosphorylation in *Arabidopsis*. *Molecular Systems Biology*. Roč. 4, č. 1, s. 193.
- SUI, H.; DOWNING, K. H., 2010. Structural Basis of Interprotofilament Interaction and Lateral Deformation of Microtubules. *Structure*. Roč. 18, č. 8, s. 1022–1031.
- SULIMENKO, V.; HÁJKOVÁ, Z.; KLEBANOVYCH, A.; DRÁBER, P., 2017. Regulation of microtubule nucleation mediated by γ -tubulin complexes. *Protoplasma*. Roč. 254, č. 3, s. 1187–1199.
- SUZUKI, T.; NAKAJIMA, S.; MORIKAMI, A.; NAKAMURA, K., 2005. An *Arabidopsis* Protein with a Novel Calcium-Binding Repeat Sequence Interacts with TONSOKU/MGOUN3/BRUSHY1 Involved in Meristem Maintenance. *Plant and Cell Physiology*. Roč. 46, č. 9, s. 1452–1461.
- TEIXIDÓ-TRAVESA, N.; VILLÉN, J.; LACASA, C.; BERTRAN, M. T.; ARCHINTI, M.; GYGI, S. P.; CAELLES, C.; ROIG, J.; LÜDERS, J., 2010. The γ TuRC Revisited: A Comparative Analysis of Interphase and Mitotic Human γ TuRC Redefines the Set of Core Components and Identifies the Novel Subunit GCP8. *Molecular Biology of the Cell*. Roč. 21, č. 22, s. 3963–3972.
- THAWANI, A.; KADZIK, R. S.; PETRY, S., 2018. XMAP215 is a microtubule nucleation factor that functions synergistically with the γ -tubulin ring complex. *Nature Cell Biology*. Roč. 20, č. 5, s. 575–585.
- THAWANI, A.; STONE, H. A.; SHAEVITZ, J. W.; PETRY, S., 2019. Spatiotemporal organization of branched microtubule networks. *eLife*. Roč. 8, e43890.
- TIAN, J.; KONG, Z., 2019. The role of the augmin complex in establishing microtubule arrays. *Journal of Experimental Botany*. Roč. 70, č. 12, s. 3035–3041.
- TILNEY, L. G.; BRYAN, J.; BUSH, D. J.; FUJIWARA, K.; MOOSEKER, M. S.; MURPHY, D. B.; SNYDER, D. H., 1973. Microtubules: Evidence for 13 Protofilaments. *The Journal of Cell Biology*. Roč. 59, č. 2, s. 267–275.
- TOMAŠTÍKOVÁ, E.; DEMIDOV, D.; JEŘÁBKOVÁ, H.; BINAROVÁ, P.; HOUBEN, A.; DOLEŽEL, J.; PETROVSKÁ, B., 2015. TPX2 Protein of *Arabidopsis* Activates Aurora Kinase 1, But Not Aurora Kinase 3 In Vitro. *Plant Molecular Biology Reporter*. Roč. 33, č. 6, s. 1988–1995.
- TRAN, P. T.; WALKER, R. A.; SALMON, E. D., 1997. A Metastable Intermediate State of Microtubule Dynamic Instability That Differs Significantly between Plus and Minus Ends. *The Journal of Cell Biology*. Roč. 138, č. 1, s. 105–117.
- UEHARA, R.; NOZAWA, R.; TOMIOKA, A.; PETRY, S.; VALE, R. D.; OBUSE, C.; GOSHIMA, G., 2009. The augmin complex plays a critical role in spindle microtubule generation for mitotic progression and cytokinesis in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Roč. 106, č. 17, s. 6998–7003.
- UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021, 2021. *Nucleic Acids Research*. Roč. 49, č. D1, s. D480–D489.
- VAN LEENE, J.; STALS, H.; EECKHOUT, D.; PERSIAU, G.; VAN DE SLIJKE, E.; VAN ISTERDAEL, G.; DE CLERCQ, A.; BONNET, E.; LAUKENS, K.; REMMERIE, N.; HENDERICKX, K.; DE VIJDER, T.; ABDELKRIM, A.; DE JAEGER, G., 2007. A Tandem Affinity Purification-based Technology Platform to Study the Cell Cycle Interactome in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular & Cellular Proteomics*. Roč. 6, č. 7, s. 1226–1238.

- VAVRDOVÁ, T.; ŠAMAJ, J.; KOMIS, G., 2019. Phosphorylation of Plant Microtubule-Associated Proteins During Cell Division. *Frontiers in Plant Science*. Roč. 10, s. 238.
- VERNOUD, V.; HORTON, A. C.; YANG, Z.; NIELSEN, E., 2003. Analysis of the Small GTPase Gene Superfamily of Arabidopsis. *Plant Physiology*. Roč. 131, č. 3, s. 1191–1208.
- VÉROLLET, C.; COLOMBIÉ, N.; DAUBON, T.; BOURBON, H.-M.; WRIGHT, M.; RAYNAUD-MESSINA, B., 2006. *Drosophila melanogaster* γ -TuRC is dispensable for targeting γ -tubulin to the centrosome and microtubule nucleation. *The Journal of Cell Biology*. Roč. 172, č. 4, s. 517–528.
- VOS, J. W.; DOGTEROM, M.; EMONS, A. M. C., 2004. Microtubules Become More Dynamic But Not Shorter During Preprophase Band Formation: A Possible “Search-and-Capture” Mechanism for Microtubule Translocation. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. Roč. 57, č. 4, s. 246–258.
- VOS, J. W.; PIEUCHOT, L.; EVRARD, J.-L.; JANSKI, N.; BERGDOLL, M.; RONDE, D. de; PEREZ, L. H.; SARDON, T.; VERNOS, I.; SCHMIT, A.-C., 2008. The Plant TPX2 Protein Regulates Prospindle Assembly before Nuclear Envelope Breakdown. *The Plant Cell*. Roč. 20, č. 10, s. 2783–2797.
- WALIA, A.; NAKAMURA, M.; MOSS, D.; KIRIK, V.; HASHIMOTO, T.; EHRHARDT, D. W., 2014. GCP-WD Mediates γ -TuRC Recruitment and the Geometry of Microtubule Nucleation in Interphase Arrays of Arabidopsis. *Current Biology*. Roč. 24, č. 21, s. 2548–2555.
- WALKER, R. A.; O'BRIEN, E. T.; PRYER, N. K.; SOBOEIRO, M. F.; VOTER, W. A.; ERICKSON, H. P.; SALMON, E. D., 1988. Dynamic Instability of Individual Microtubules Analyzed by Video Light Microscopy: Rate Constants and Transition Frequencies. *The Journal of Cell Biology*. Roč. 107, č. 4, s. 1437–1448.
- WEIMER, A. K.; DEMIDOV, D.; LERMONTOVA, I.; BEECKMAN, T.; VAN DAMME, D., 2016. Aurora Kinases Throughout Plant Development. *Trends in Plant Science*. Roč. 21, č. 1, s. 69–79.
- WEINGARTEN, M. D.; LOCKWOOD, A. H.; HWO, S.; KIRSCHNER, M. W., 1975. A Protein Factor Essential for Microtubule Assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Roč. 72, č. 5, s. 1858–1862.
- WEINGARTNER, M.; BINAROVA, P.; DRYKOVA, D.; SCHWEIGHOFER, A.; DAVID, J.-P.; HEBERLE-BORS, E.; DOONAN, J.; BÖGRE, L., 2001. Dynamic Recruitment of Cdc2 to Specific Microtubule Structures during Mitosis. *The Plant Cell*. Roč. 13, č. 8, s. 1929–1943.
- WEISENBERG, R. C., 1972. Microtubule Formation in vitro in Solutions Containing Low Calcium Concentrations. *Science*. Roč. 177, č. 4054, s. 1104–1105.
- WEISENBERG, R. C.; BORISY, G. G.; TAYLOR, E. W., 1968. The Colchicine-Binding Protein of Mammalian Brain and Its Relation to Microtubules. *Biochemistry*. Roč. 7, č. 12, s. 4466–4479.
- WEISENBERG, R. C.; DEERY, W. J., 1976a. Role of nucleotide hydrolysis in microtubule assembly. *Nature*. Roč. 263, č. 5580, s. 792–793.
- WEISENBERG, R. C.; DEERY, W. J.; DICKINSON, P. J., 1976b. Tubulin-Nucleotide Interactions During the Polymerization and Depolymerization of Microtubules. *Biochemistry*. Roč. 15, č. 19, s. 4248–4254.
- WEA, S.; HEMMINGS, B. A., 1995. Serine/threonine protein phosphatases. *Biochemical Journal*. Roč. 311, č. 1, s. 17–29.
- WHITTINGTON, A. T.; VUGREK, O.; WEI, K. J.; HASENBEIN, N. G.; SUGIMOTO, K.; RASHBROOKE, M. C.; WASTENEYS, G. O., 2001. MOR1 is essential for organizing cortical microtubules in plants. *Nature*. Roč. 411, č. 6837, s. 610–613.
- WIDLUND, P. O.; STEAR, J. H.; POZNIAKOVSKY, A.; ZANIC, M.; REBER, S.; BROUHARD, G. J.; HYMAN, A. A.; HOWARD, J., 2011. XMAP215 polymerase activity is built by combining multiple tubulin-binding TOG domains and a basic lattice-binding region. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Roč. 108, č. 7, s. 2741–2746.
- WIECZOREK, M.; HUANG, T.-L.; URNAVICIUS, L.; HSIA, K.-C.; KAPOOR, T. M., 2020a. MZT Proteins Form Multi-Faceted Structural Modules in the γ -Tubulin Ring Complex. *Cell Reports*. Roč. 31, č. 13, s. 107791.

- WIECZOREK, M.; URNAVICIUS, L.; TI, S.-C.; MOLLOY, K. R.; CHAIT, B. T.; KAPOOR, T. M., 2020b. Asymmetric Molecular Architecture of the Human γ -Tubulin Ring Complex. *Cell*. Roč. 180, č. 1, s. 165–175.
- WU, G.; LIN, Y.-T.; WEI, R.; CHEN, Y.; SHAN, Z.; LEE, W.-H., 2008. Hice1, a Novel Microtubule-Associated Protein Required for Maintenance of Spindle Integrity and Chromosomal Stability in Human Cells. *Molecular and Cellular Biology*. Roč. 28, č. 11, s. 3652–3662.
- WU, J.; AKHMANOVA, A., 2017. Microtubule-Organizing Centers. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. Roč. 33, s. 51–75.
- XIONG, Y.; OAKLEY, B. R., 2009. In vivo analysis of the functions of γ -tubulin-complex proteins. *Journal of Cell Science*. Roč. 122, č. 22, s. 4218–4227.
- YAGI, N.; MATSUNAGA, S.; HASHIMOTO, T., 2018. Insights into cortical microtubule nucleation and dynamics in *Arabidopsis* leaf cells. *Journal of Cell Science*. Roč. 131, č. 2.
- YAMADA, M.; GOSHIMA, G., 2017. Mitotic Spindle Assembly in Land Plants: Molecules and Mechanisms. *Biology*. Roč. 6, č. 1, s. 6.
- YAN, X.; HABEDANCK, R.; NIGG, E. A., 2006. A Complex of Two Centrosomal Proteins, CAP350 and FOP, Cooperates with EB1 in Microtubule Anchoring. *Molecular Biology of the Cell*. Roč. 17, č. 2, s. 634–644.
- YOON, J.-T.; AHN, H.-K.; PAI, H.-S., 2018. The subfamily II catalytic subunits of protein phosphatase 2A (PP2A) are involved in cortical microtubule organization. *Planta*. Roč. 248, č. 6, s. 1551–1567.
- YU, R. M. K.; WONG, M. M. L.; JACK, R. W.; KONG, R. Y. C., 2005. Structure, evolution and expression of a second subfamily of protein phosphatase 2A catalytic subunit genes in the rice plant (*Oryza sativa* L.) *Planta*. Roč. 222, č. 5, s. 757–768.
- ZENG, C. J. T.; LEE, Y.-R. J.; LIU, B., 2009. The WD40 Repeat Protein NEDD1 Functions in Microtubule Organization During Cell Division in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*. Roč. 21, č. 4, s. 1129–1140.
- ZHANG, R.; ROOSTALU, J.; SURREY, T.; NOGALES, E., 2017. Structural insight into TPX2-stimulated microtubule assembly. *eLife*. Roč. 6, e30959.
- ZHANG, X.; CHEN, Q.; FENG, J.; HOU, J.; YANG, F.; LIU, J.; JIANG, Q.; ZHANG, C., 2009. Sequential phosphorylation of Nedd1 by Cdk1 and Plk1 is required for targeting of the γ TuRC to the centrosome. *Journal of Cell Science*. Roč. 122, č. 13, s. 2240–2251.
- ZHANG, X.; WU, J.; YU, Q.; LIU, R.; WANG, Z.-Y.; SUN, Y., 2020. AtOFPs regulate cell elongation by modulating microtubule orientation via direct interaction with TONNEAU2. *Plant Science*. Roč. 292, s. 110405.
- ZHAO, Q.; LEUNG, S.; CORBETT, A. H.; MEIER, I., 2006. Identification and Characterization of the Arabidopsis Orthologs of Nuclear Transport Factor 2, the Nuclear Import Factor of Ran. *Plant Physiology*. Roč. 140, č. 3, s. 869–878.
- ZHENG, Y.; JUNG, M. K.; OAKLEY, B. R., 1991. γ -Tubulin is Present in *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens* and Is Associated with the Centrosome. *Cell*. Roč. 65, č. 5, s. 817–823.
- ZHENG, Y.; WONG, M. L.; ALBERTS, B.; MITCHISON, T., 1995. Nucleation of microtubule assembly by a γ -tubulin-containing ring complex. *Nature*. Roč. 378, č. 6557, s. 578–583.
- ZHU, H.; COPPINGER, J. A.; JANG, C.-Y.; YATES III, J. R.; FANG, G., 2008. FAM29A promotes microtubule amplification via recruitment of the NEDD1- γ -tubulin complex to the mitotic spindle. *The Journal of Cell Biology*. Roč. 183, č. 5, s. 835–848.