

UNIVERSITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra experimentální biologie rostlin

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2012

Pavel BOKVAJ

UNIVERSITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra experimentální biologie rostlin

Role transportu tubulinu mezi jádrem a cytoplazmou

Pavel Bokvaj

Školitel: RNDr. Kateřina Schwarzerová, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně s použitím uvedené literatury a pod vedením školitele diplomové práce. Souhlasím s použitím této práce pro studijní účely.

Pavel Bokvaj, 25. 8. 2012



PODĚKOVÁNÍ

V první řadě upřímně děkuji mé školitelce za veškerou její nekonečnou trpělivost, ochotu, rychlost a pochopení, s kterými se věnovala mé práci a obtížím, s kterými jsem se při experimentování setkal.

Zároveň děkuji mé milé kolegyni Erice Bellinvia za ochotu a nasazení, s kterými mně předávala své zkušenosti a učila mě prvním dětským krokům v molekulární biologii. Díky Erice mimo jiné také vím, kde v Praze sehnat nejlepší pizzu. 😊

Z celého srdce děkuji oběma mým starostlivým rodičům za jejich péči, veškerou pomoc, obětavost a vlídnost, s kterými vždy byli a jsou připraveni mě jakkoliv podpořit.

Děkuji mému dědovi Bohumilovi za to, jak mi s láskou a celým srdcem "fandí", prožívá mé úspěchy a stojí při mě.

I also deeply thank my best friend Julie Fishman for being such a special person and for the long talks which have always been very important, very helpful and pleasant for me.

Taktéž děkuji mé milé kamarádce Lucii Maňákové za to, že jsem právě po jejím boku mohl překonat jednu z největších duševních překážek mého života.

Děkuji Honzovi Petráškovu za radost, vědecké nadšení a pozitivní náladu, které jej obklopují a které rozdává. Děkuji Honzovi také za jeho vědeckou profesionalitu a důkladné debaty nejen nad tématy této práce.

Nemohu opomenout Janu Krtkovou a její přátelskost, otevřenost, dobré srdce a mnohá povídání, která mi velmi zpříjemňovala práci v laboratoři.

Mirkovi Srbovi také děkuji za příjemné rozhovory, a pomoc s chladovými experimenty.

Můj vděk patří i Lence Dvořákové a Lukášovi Fišerovi za rady a ochotu, s kterou mé četné dotazy zodpovídali.

Děkuji Lukášovi Falteiskovi a Janě Dvořákové z Katedry buněčné biologie za zaučení do práce se savčími kulturami a pomoc s kultivací a transfekcí HeLa buněk.

Také děkuji Eleně Kozlové, která byla vždy s nepochopitelnou připraveností a nasazením ochotná okamžitě řešit jakékoliv mé problémy, byť ne přímo související s touto prací.

ABSTRACT

Tubulin is the basic building block of microtubules which ensure intracellular transport, morphological changes, the connection of proteins of metabolic pathways, the segregation of chromosomes during mitosis and many other essential processes in plant cells.

The localization of tubulin regarding nucleus is strictly controlled and during the interphase, tubulin is usually not present in the nucleus. As we previously showed, one of the exceptions of the presence of tubulin in the nucleus is the cold stress condition. Also, we discovered several plant-specific nuclear export sequences (NES) in tubulin molecules: one in α -tubulin and two in β -tubulin.

In this work I found that double mutation of both functional β -tubulin NESes cause slight accumulation of the protein in the nuclei. However, the phenotype of the transgenic plants expressing β -tubulin with mutations is probably not affected by the presence of the mutated protein.

The effect of the expression of the mutated β -tubulins was observed in *Nicotiana tabacum* BY-2 cells as well. The expression of β -tubulin carrying a single NES3 mutation or double mutation of both NESes bring changes of the division activity of the cells, while the NES2 mutation does not have any effect.

Furthermore, it was discovered that the 0°C cold treatment does not cause massive accumulation of tubulin in the nuclei of the cells of whole *Arabidopsis thaliana* plants. This information adds to our previous findings of tubulin accumulation in cold treated nuclei of the plant suspension cells.

In an effort to elucidate the mechanism of β -tubulin export from the nucleus, we tested the effect of nuclear export inhibitor leptomycin B. We found out that the growth of the BY-2 suspension cells was steadily halted, however the growth of *Arabidopsis thaliana* plants was not affected at all. The reasons for this resistance of *Arabidopsis thaliana* are discussed.

We also tested the function of α - and β -tubulin NESes in fusion with GFP in animal HeLa cells. We found out that the GFP type used was not suitable for expression in these cells.

ABSTRAKT

Tubulin je základní stavební jednotkou mikrotubulů, které zajišťují vnitrobuněčný transport, morfologické změny, propojení proteinů metabolických drah, segregaci chromozómů během mitózy a mnohé další nezbytné procesy v rostlinných buňkách. Lokalizace tubulinu vzhledem k jádru je však přísně kontrolována a během interfáze se v jádře tubulin běžně nevyskytuje. Jak jsme dříve ukázali, jednou z výjimek přítomnosti tubulinu v jádře je chladový stres. Zároveň jsme v molekulách tubulinů odhalili několik rostlinně specifických jaderných exportních sekvencí (NES): jednu v α -tubulinu a dvě v β -tubulinu.

V této práci jsem zjistil, že mutace obou funkčních NES v β -tubulinu zároveň způsobuje slabou akumulaci tohoto proteinu v jádrech. Fenotyp transgenních rostlin exprimujících β -tubulin s mutacemi však pravděpodobně není přítomností mutovaného proteinu ovlivněn. Vliv exprese mutovaných β -tubulinů byl sledován i u buněk kultury *Nicotiana tabacum* BY-2. Exprese β -tubulinů nesoucích mutace v jednom z NES (NES3) či v obou NES způsobuje změny v dělivé aktivitě buněk, zatímco mutace v NES2 vliv nemá.

Dále bylo zjištěno, že chlad 0°C nezpůsobuje masivní akumulaci tubulinu v jádrech rostlinných buněk v kontextu celých rostlin *Arabidopsis thaliana*, čímž jsou doplněna naše dřívější zjištění o akumulaci tubulinu v jádrech chladem ošetřených rostlinných suspenzních buněk.

Ve snaze objasnit mechanismus exportu β -tubulinu z jádra jsme testovali vliv inhibitoru jaderného exportu leptomycinu B. Bylo zjištěno, že růst suspenzních buněk BY-2 byl spolehlivě zastaven, avšak růst rostlin *Arabidopsis thaliana* nebyl vůbec ovlivněn. Důvody odolnosti rostlin *Arabidopsis thaliana* vůči tomuto inhibitoru jsou diskutovány.

Testována byla též funkčnost jaderných exportních sekvencí α - a β -tubulinu ve fúzi s GFP v živočišných buňkách HeLa. Bylo zjištěno, že použitá forma GFP nebyla vhodná pro expresi v buňkách HeLa.

KEY WORDS

tubulin; nucleus; nuclear export sequence; nuclear export

KLÍČOVÁ SLOVA

tubulin; jádro; jaderná exportní sekvence; jaderný export

OBSAH

ABSTRACT	5
ABSTRAKT	6
SEZNAM ZKRATEK:	10
1. CÍLE PRÁCE	11
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	12
2.1. Mikrotubulární cytoskelet	12
2.2. Kompartmentace tubulinu v buňce.....	16
2.3. Jaderný transport	21
2.4. Shrnutí	24
3. MATERIÁL A METODY.....	26
3.1. Materiál	26
3.1.1. Rostlinný materiál	26
3.1.2. Bakteriální materiál	26
3.1.3. DNA	26
3.1.4. Kultivační media	28
3.2. Metody	29
3.2.1. Kultivace buněk HeLa	29
3.2.2. Transfekce tumorových buněk epitelu cervixu <i>Homo sapiens</i> HeLa vektory pTub-GFPNES	30
3.2.3. Kultivace kalusů a suspenzních buněk <i>Nicotiana tabacum</i> BY-2 a <i>Arabidopsis thaliana</i> Landsberg Erecta .	32
3.2.4. Sterilizace semen, stratifikace a kultivace rostlin <i>Arabidopsis thaliana</i>	33
3.2.5. Transformace <i>Arabidopsis thaliana</i> wt vektory pER8-tubulin metodou "floral dip"	33
3.2.6. Transformace kalusu <i>Nicotiana tabacum</i> BY-2 vektory pER8-tubulin pomocí <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	35
3.2.7. Klonování buněk kalusu BY-2	36
3.2.8. Výběr rostlin dostatečně exprimujících pER8-GFP-tubulin	36
3.2.9. Chladové experimenty s <i>Arabidopsis thaliana</i>	36
3.2.10. Imunologická vizualizace α -tubulinu v kořenech <i>Arabidopsis</i>	37
3.2.11. Imunologická vizualizace α -tubulinu v suspenzních rostlinných buňkách	38
3.2.12. Indukce exprese 17- β -estradiolem a ošetření leptomycinem B	40
3.2.13. Počítání mitotického indexu a množství buněk suspenzní kalusové kultury BY-2	40
3.2.14. Analýza fenotypu transgenních rostlin <i>Arabidopsis thaliana</i>	41
3.2.15. Projasnění klíčnicích rostlin <i>Arabidopsis</i> natrium jodidem	42
3.2.16. Analýza množství fluorescenčního signálu v jádrech a cytoplasmě	42

4. VÝSLEDKY	43
4.1. Studium funkčnosti NES z molekul tubulinů v živočišných buňkách	43
4.2. Studium exprese β-tubulinu nesoucími mutacemi v NES sekvencích v buňkách BY-2.....	47
4.2.1. Lokalizace β -tubulinu nesoucími mutacemi v NES sekvencích v buňkách BY-2	47
4.2.2. Mitotický index po indukci	48
4.2.3. Efekt leptomycinu B	49
4.3. Studium exprese β-tubulinu nesoucími mutacemi v NES sekvencích v <i>Arabidopsis thaliana</i> .	50
4.3.1. Lokalizace GFP-tubulinů v buňkách <i>Arabidopsis</i> po indukci.....	51
4.3.2. Fenotyp transgenních rostlin <i>Arabidopsis</i>	55
4.3.3. Efekt leptomycinu B	61
4.3.4. Lokalizace tubulinu po chladovém stresu u rostlin <i>Arabidopsis thaliana</i> wt	64
4.3.5. Lokalizace tubulinu po chladovém stresu u suspenzních buněk <i>Arabidopsis thaliana</i> wt	67
5. DISKUSE.....	70
5.1. Studium funkce NES v živočišných buňkách	70
5.2. Studium exprese WT a mutovaných tubulinů v buňkách BY-2	71
5.2.1. Mitotický index po indukci	71
5.3. Studium exprese WT a mutovaných tubulinů v <i>Arabidopsis thaliana</i>.....	72
5.3.1. Lokalizace GFP-tubulinů v buňkách po indukci	72
5.3.2. Fenotyp transgenních rostlin exprimujících β -tubuliny mutované v NES sekvencích.....	74
5.5. Monomer či heterodimer?	77
6. ZÁVĚR.....	79
7. ODKAZY	81

SEZNAM ZKRATEK:

ΔNES: jaderná exportní sekvence mutovaná tak, že její exportní funkce je eliminována

GFPNES: GFP fúzovaný s jadernou exportní sekvencí NES

HeLa: Henrietta Lacks, dárce buněk karcinomu epitelu cervixu

lepB: leptomycin B

MI: mitotický index

β-tub: vektor pER8-GFP-AtTUB6

NES2: vektor pER8-GFP-AtTUB6 Δ NES2

NES3: vektor pER8-GFP-AtTUB6 Δ NES3

NES23: vektor pER8-GFP-AtTUB6 Δ NES23

PCR: polymerázová řetězová reakce

TRITC: tetramethylrhodamin isothiokyanát

wt: wild type; v případě *Arabidopsis thaliana* ekotyp Columbia, není-li uvedeno jinak

1. CÍLE PRÁCE

1. Otestovat funkčnost jaderných exportních sekvencí α - a β -tubulinu v živočišných buňkách.
2. Otestovat vliv exprese β -tubulinů nesoucích mutace v jaderných exportních sekvencích na buňky tabákové kultury BY-2.
3. Zjistit lokalizaci mutovaných tubulinů v rostlinách *Arabidopsis thaliana*.
4. Otestovat vliv exprese mutovaného tubulinu na rostliny *Arabidopsis thaliana*.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. Mikrotubulární cytoskelet

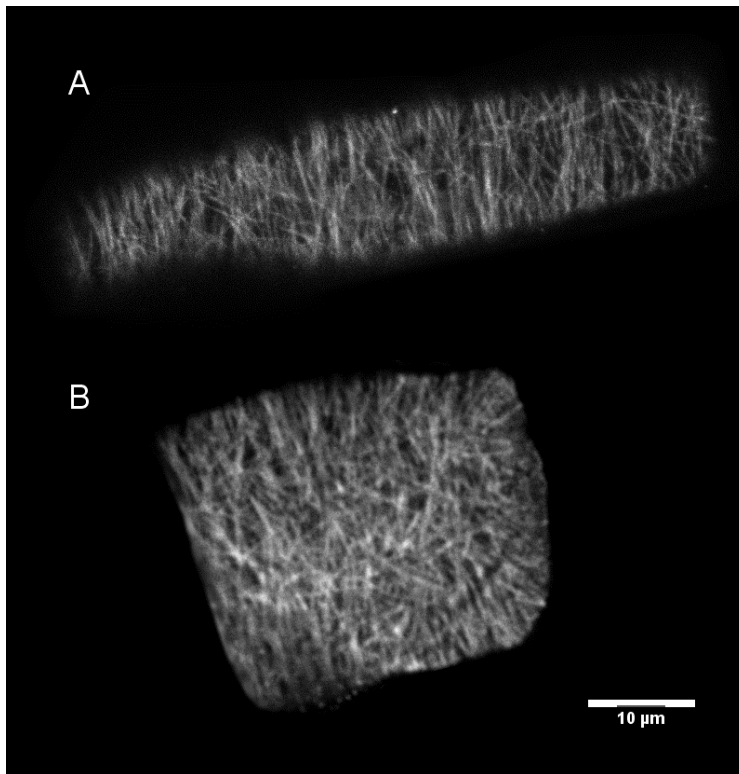
Cytoskelet je silně konzervovaná struktura eukaryotních buněk, zajišťující mnoho základních procesů – vnitrobuněčný transport, morfologické změny, dělení buňky, prostorové propojení proteinů metabolických drah, aj. V rostlinných buňkách nacházíme dvě hlavní složky cytoskeletu: mikrotubuly a aktinová mikrofilamenta.

Ve všech eukaryotních buňkách mikrotubuly zajišťují především transport membránových váčků, pozici jádra a segregaci chromosomů během mitosy, cytokinezi a “lešení” pro proteiny stejných metabolických drah. Aktinová mikrofilamenta se taktéž podílejí na transportu membránových váčků, cytokinezi a lokalizaci enzymů; aktin je zároveň důležitou součástí procesů změny morfologie, pohybů a mechanorecepce.

Mikrotubuly jsou vysoce dynamické polární struktury složené z laterálně spojených protofilament, polymerů heterodimeru α - a β -tubulinu; β -tubulin je vždy konsenzuálně na + konci protofilamenta, kde dochází k rychlejší polymeraci než na opačném konci. Protofilament je v mikrotubulu nejčastěji 13, v helikálním uspořádání. α - a β -tubulin jsou 55 kDa proteiny vázající GTP, přičemž β -tubulin má schopnost toto GTP hydrolyzovat. Hydrolýza GTP probíhá spontánně, a její produkt, β -tubulin-GDP, má destabilizační efekt na mikrotubulus. Tato skutečnost, spolu s přítomností mnoha proteinů modifikujících stabilitu mikrotubulů, reprezentuje silnou dynamiku mikrotubulárního cytoskeletu. Většina mikrotubulárních struktur existuje pouze krátkou dobu, avšak lze nalézt i velmi stabilní mikrotubuly, např. v řasinkách a bičících. Třetí neopomenutelnou molekulou se vztahem k mikrotubulům je γ -tubulin, který se účastní první fáze vzniku mikrotubulů, tzv. nukleace.

Nejznámější mikrotubulární strukturou, přítomnou pravděpodobně ve všech eukaryotních buňkách, je dělicí vřetenko (Obr. 3). Tato polární struktura zajišťuje segregaci chromosomů do budoucích dceřinných jader (Maiza, 1961). V průběhu buněčného cyklu jsou v rostlinných buňkách vytvářeny další mikrotubulární struktury, typické pouze pro buňky rostlin. Jedná se o kortikální mikrotubuly, předprofázový prstenec a fragmoplast. Kortikální mikrotubuly jsou typickou rostlinnou strukturou, která

udává směry, kterými buňka může expandovat svoji buněčnou stěnu, potažmo celé své tělo. Tyto mikrotubuly jsou přímo asociovány s celuloza-syntázovými komplexy (Li et al., 2012), které ve směru uspořádání kortikálních mikrotubulů deponují celulosové mikrofibrily do buněčné stěny; buňka může růst především ve směru kolmém na svazky těchto celulosových mikrofibril (Paredez et al., 2006; pro ilustraci viz obr. 1).



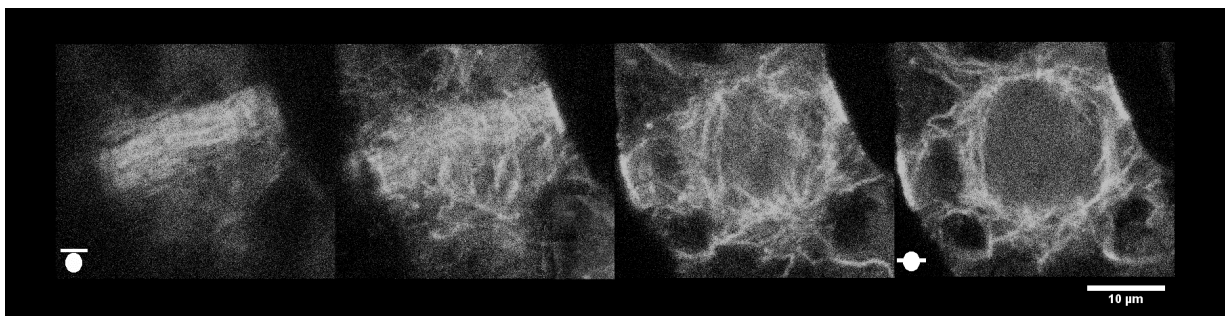
Obr. 1: **Kortikální mikrotubuly buněk kořene *Arabidopsis thaliana*.**

Imunologicky označen α -tubulin (anti- α -tubulin primární protilátka) pomocí TRITC konjugovaným se sekundární protilátkou. A. Příčné uspořádání kortikálních mikrotubulů, longitudálně rostoucí buňka. B. Kortikální mikrotubuly uspořádané do různých směrů, buňka rostoucí všemi směry. Fotografie pořízeny konfokálním mikroskopem.

Předprofázový prstenec (Obr. 2) představuje specifické obručovitě uspořádání mikrotubulů, aktinových mikrofilament a dalších komponent kolem jádra v ekvatoriální rovině buňky na konci G2 fáze buněčného cyklu. Známymi funkcemi předprofázového prstence je orientování mitotického vřeténka do správné pozice, "označení" místa v

cytoplasmatické membráně pro budoucí fragmoplast a účast na organizaci mitotického vřeténka (Mineyuki 1999; Ambrose and Cyr, 2008).

Fragmoplast je další unikátní rostlinnou mikrotubulární strukturou (avšak lze jej najít i u některých Bryophyt a řas, Lopéz-Bautista, 2003), která je zodpovědná za zdárné rozdělení buňky. Fragmoplast je velmi dynamické uspořádání mikrotubulů, aktinových mikrofilament, endoplasmatického retikula, Golgiho aparátu a dalších struktur. Komponenty fragmoplastu syntézou složek buněčné stěny a jejich transportem zajišťují centrifugální růst nové buněčné stěny mezi dceřinými buňkami (Asada et al., 1994).



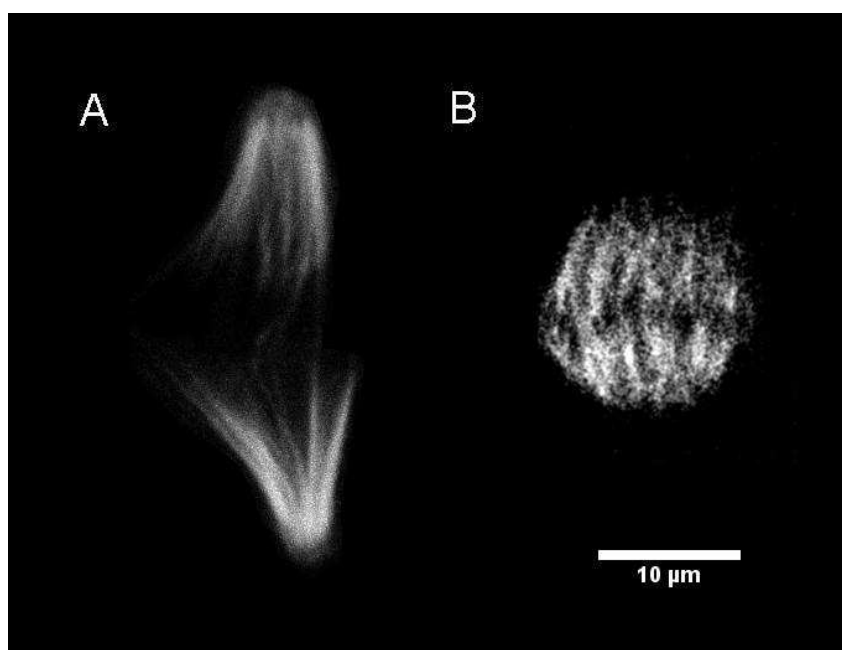
Obr. 2: **Optické řezy předprofázovým prstencem buněk kalusu *Nicotiana tabacum* BY-2.**

Imunologicky označen α -tubulin (anti- α -tubulin primární protilátka) pomocí TRITC konjugovaným se sekundární protilátkou. První řez zleva je na povrchu jádra, poslední řez je uprostřed jádra. Fotografie pořízeny konfokálním mikroskopem.

Polymerace mikrotubulů vyžaduje struktury, které zajišťují jejich nukleaci – mikrotubuly nukleující struktury (MTOC z angl. **m**icro**t**ubules **o**rganizing **c**entre). Živočišné buňky obsahují jedinou mikrotubuly-nukleační strukturu, tzv. centrosom (Karsenti et al., 1984). Centrosom se skládá z dvou ortogonálně orientovaných centriol obklopených pericentriolární matrix (PCM). Centrioly jsou složeny z devíti trojic mikrotubulů. V PCM dochází ke vzniku γ -TuRC (γ -tubulin ring complex) z γ -TuSC (γ -tubulin small complex) a dalších proteinů. K nukleaci mikrotubulů s nejvyšší pravděpodobností dochází právě v γ -TuSC (Kollman et al., 2010).

Rostlinné buňky a většina hub centrosom nemají a jsou proto nazývány acentrozomální organismy. Navzdory absenci konkrétního centrosómu buňky vyšších

rostlin jsou samozřejmě schopné mikrotubuly nukleovat. Procesu nukleace rozumíme u těchto buněk méně, nicméně se zdá, že molekulární mechanismus je totožný s mechanismem nukleace na centrozómu. Hlavní roli hraje γ -tubulin a komplexy, které vytváří s vysoce konzervovanými proteiny – γ -tubulin ring komplexy (Zheng et al., 1995). Vyšší rostliny vytvářejí nové mikrotubuly v závislosti na fázi buněčného cyklu buď na povrchu jádra, nebo v kortikální vrstvě pod cytoplasmatickou membránou na základě interakce γ -tubulinu s již existujícími mikrotubuly (Shimamura et al., 2004, Murata et al., 2005). Decentralizovaný způsob nukleace mikrotubulů lze vidět i u typického dělicího vřeténka rostlinných buněk (Obr. 3). V současnosti je mechanismus rostlinné nukleace mikrotubulů jen málo objasněn; je známa pouze účast γ -tubulinu, dále proteinu homologního k Spc98p, který je u centrosomálních organismů součástí γ -TuSC, a několika dalších proteinů (Erhardt et al., 2002; Binarová et al., 2006; Wiese a Zheng, 2006).



Obr. 3: **Mitotické vřeténko živočišných a rostlinných buněk.**

A. Centrosomální mitotické vřeténko lidských buněk tumoru cervixu HeLa. EGFP- α -tubulin exprimovaný transformovanou buňkou. B. Typické acentrosomální difuzní mitotické vřeténko suspenzních kalusových buněk *Nicotiana tabacum* BY-2. Imunologicky označen α -

tubulin (anti- α -tubulin primární protilátka) pomocí TRITC konjugovaným se sekundární protilátkou.

2.2. Kompartmentace tubulinu v buňce

α -/ β -tubulin je během interfáze výlučně cytoplasmatický protein a jeho vztah k jádru je většinou vázán na mitosu. Existují tři typy mitosy: mitosa, při které dochází k celkovému rozpadu jaderné obálky (otevřená mitosa), uzavřená mitosa, během které se všechny mitotické děje odehrávají v jádře s neporušenou, celistvou jadernou obálkou, a třetí, přechodný typ, polo-otevřená mitosa, při které se jaderná obálka rozpadá jen z části (de Souza a Osmani, 2007). Přítomnost α -/ β -tubulinu v jádře, či v místě chromatinu bez jaderné obálky u otevřené mitosy, je nutná z důvodu segregace chromosomů kinetochorovými mikrotubuly. Po ukončení mitosy a rekonstrukci jaderné obálky je tubulin opět lokalizován výlučně v cytoplasmě. U primitivnějších eukaryot s uzavřenou mitosou, jako např. u některých protist, hub a řas (review Heath, 1980), se musí α -/ β -tubulin, spolu s některými komponenty MTOC, těsně před mitosou importovat do jádra, jelikož nedochází k rozpadu jaderné obálky (*Aspergillus nidulans* Ovechkina et al., 2003, *Saccharomyces cerevisiae* Pereira et al., 1998) a po ukončení mitózy opět exportovat do cytoplasmy. De Souza a Osmani, 2007 navrhuje možnost importu tubulinu do jádra skrz částečně rozložené NPC, podrobnější mechanismus transportu tubulinu do jádra před mitózou a z jádra po mitóze však zůstává neznámý. Rychlý export tubulinu z jádra po mitóze (Ovechkina et al., 2003) naznačuje, že přítomnost tubulinu v jádře během interfáze je pečlivě regulovaný proces.

Akumulace β -tubulinu v jádře byla pozorována i v případě polo-otevřené mitosy v embryích *Caenorhabditis elegans*, a to po tzv. permeabilizaci jader na začátku mitosy, kdy se jaderná obálka rozpadá jen z části a mitotické vřeténko se formuje uvnitř permeabilizovaného jádra (Hayashi et al., 2012).

Vzhledem ke striktně cytoplasmatické lokalizaci tubulinu je vhodné prozkoumat možné interaktory α -/ β -tubulinu v jádře; jejich interakce s tubulinem by během interfáze mohla mít fatální následky. V interfázových jádrech savčích buněk byl nalezen γ -tubulin asociovaný s jadérky a tumor-supresorovým proteinem C53 (Hořejší et al., 2012). γ -

tubulin se vyskytuje během interfáze i u rostlinných buněk – u *Vicia faba* je γ -tubulin přítomen v jádrech v G2 fázi (Binarová et al., 2000). V tabákových buňkách BY-2 byla dokázána schopnost histonu H1 nukleovat mikrotubuly na vnějším povrchu jádra, není však vyloučeno, že je H1 schopen nukleovat mikrotubuly i uvnitř jádra (Hotta et al., 2007).

Protein **TPX2** (Targeting protein for Xklp2, člen rodiny kinesinů č.15), který se běžně vyskytuje v interfázových jádrech *Arabidopsis*, se před rozpadem jaderné obálky při nástupu mitosy přímo účastní nukleace mikrotubulů (Wittmann et al., 2000; Gruss et al., 2001; Perrin et al., 2007; Vos et al., 2008). Dále byla v savčích buňkách prokázána schopnost monomerního α - β -tubulinu asociovat s jadernou obálkou a inhibovat vazbu **Heterochromatin Proteinu 1** na jadernou obálku (Kourmouli et al., 2001). V neposlední řadě byla dokázána interakce jaderného proteinu **HMG1** (High mobility group) s tubulinem a DNA (Briolay et al., 1994).

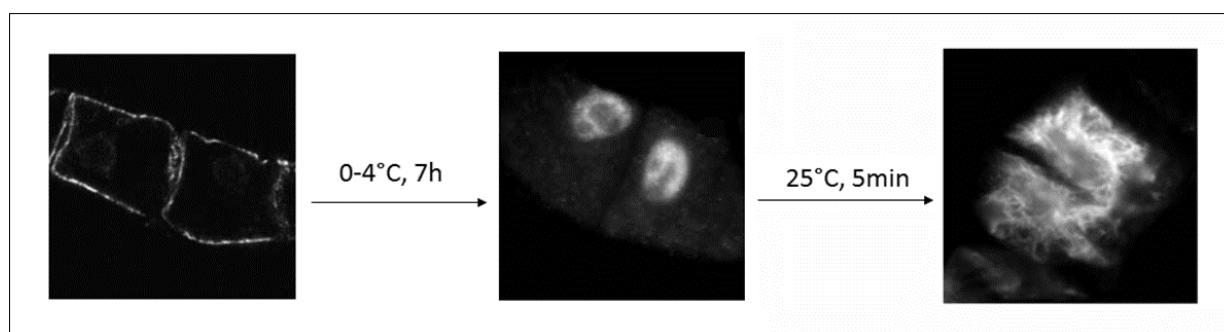
Existence těchto jaderných proteinů a jejich interakcí s α - β -tubulinem implikuje nutnost přísně kontrolovat transport α - β -tubulinu mezi jádrem a cytoplasmou, vzhledem k fázi buněčného cyklu. Tuto představu podporuje i skutečnost, že tubulin je během mitosy vždy v přímém kontaktu s nukleoplasmou.

I přes uvedené skutečnosti jsou známy výjimky, kdy se α - β -tubulin v interfázových jádrech vyskytuje. U myší buněčné linie SV3T3 nalezen byl tubulin v jádrech nemitotických buněk (Menko and Tan, 1980). α - β II-tubulinové heterodimery byly nalezeny i v interfázových jádrech potkaních mesangiálních ledvinových buněk (Walls et al., 1999) a lze je reverzibilně z jader odstranit vinblastinem (Walls-Bass et al., 2003). β II-tubulin v těchto buňkách interaguje s komponentou signální dráhy Notch, která hraje důležitou úlohu při proliferaci, apoptose a diferenciaci (Yeh et al., 2004). β II isoforma tubulinu s jadernou lokalizací se zároveň běžně vyskytuje u různých typů rakovinných buněk, včetně HeLa (Xu et al., 2002). U rostlin byly pozorovány vnitrojaderné svazky mikrotubulů v kambiálních buňkách a jejich derivátech ve stoncích *Aesculus hippocastanum* L. (Barnett, 1991).

Dosavadní výsledky ukazují, že přítomnost tubulinu v jádrech je přísně regulována v průběhu buněčného cyklu. Naše skupina však ukázala, že přítomnost

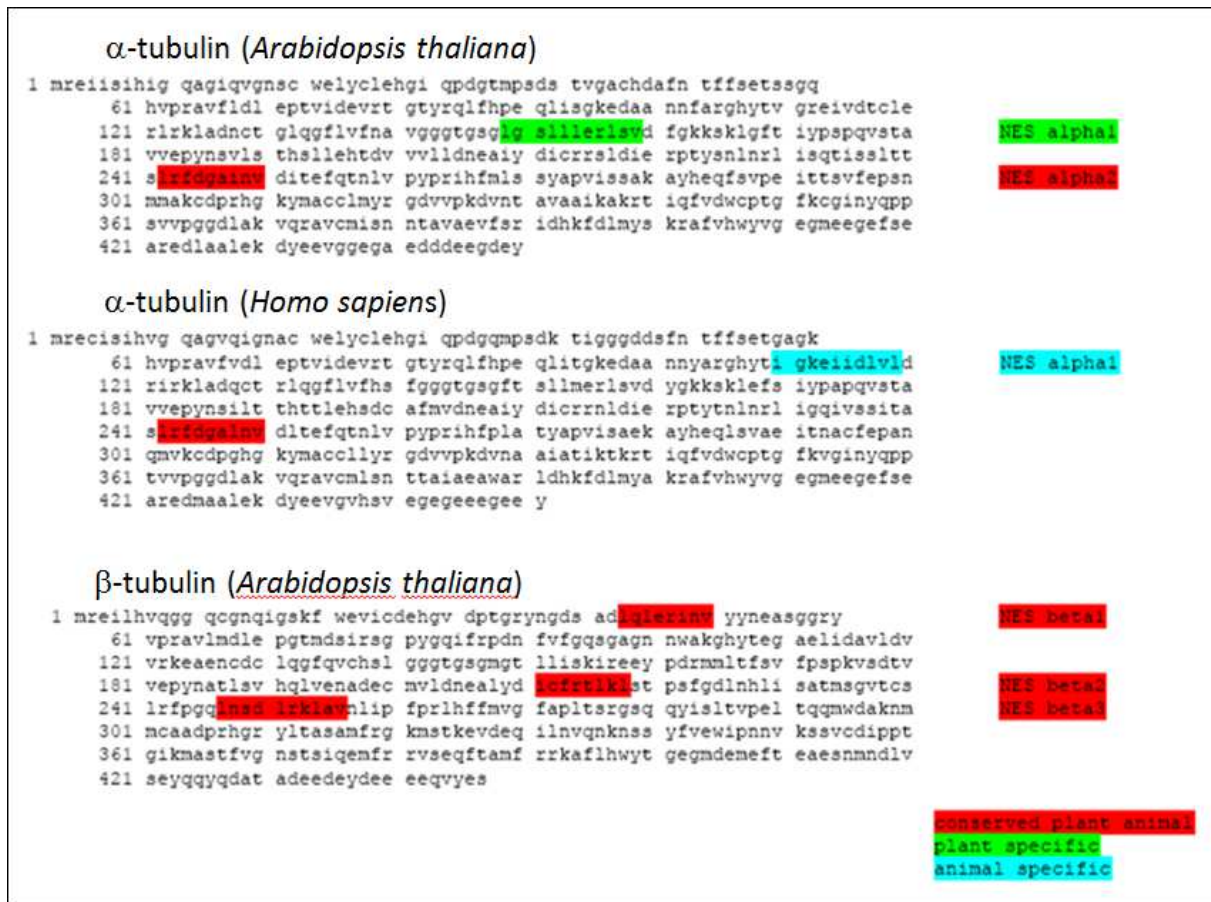
tubulinu v jádře může být způsobena i specifickými stresovými podmínkami. Poprvé byl tento jev pozorován v rostlinných buňkách BY-2 (Schwarzerová et al., 2006). V sérii experimentů ve jmenované publikaci byla prokázána reverzibilní depolymerace mikrotubulů a akumulace tubulinu v jádrech buněk BY-2 ošetřených chladem 0°C po dobu 7-8 hodin (Obr. 4). Po navrácení buněk do původní teploty byl tubulin z jader rychle exportován zpět do cytoplasmy a mikrotubulární cytoskelet byl rekonstruován. Tyto poznatky vedly k otázce, jakým mechanismem je tubulin importován do jádra a jak je exportován z jádra. V této souvislosti je vhodné zmínit pozorování Hicks et al., 1996, akumulaci fúzního proteinu O2-HSA (lidský serum albumin s bipartitním NLS /jaderným lokalizačním signálem/ kukuřičného proteinu O2) v jádrech protoplastů *Nicotiana tabacum*: v ledu byla pozorována akumulace proteinu v jádrech po 2x delší dobu než při teplotě 23°C (2 hodiny).

Prozkoumáním sekvence α -/ β -tubulinu bylo objeveno 5 sekvencí, které odpovídají konsenzu jaderné exportní sekvence (NES, obr. 5, Schwarzerová et al., 2006).



Obr. 4: **Působení chladu na lokalizaci tubulinu v suspenzních buňkách BY-2.**

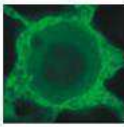
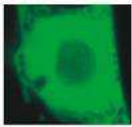
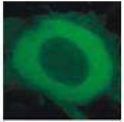
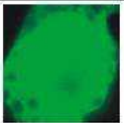
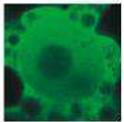
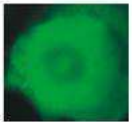
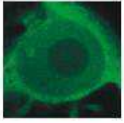
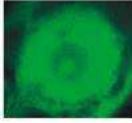
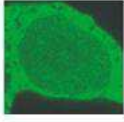
Imunologicky označen α -tubulin (anti- α -tubulin primární protilátka) pomocí TRITC konjugovaným se sekundární protilátkou. Vlevo: buňky za normálních podmínek. Uprostřed: buňky po ošetření chladem, zřetelná akumulace tubulinu v nukleoplasmě. Vpravo: navrácení do původních podmínek, rychlá exkluze tubulinu z jader a repolymerace mikrotubulů (Schwarzerová et al., 2006).



Obr. 5: Jaderné exportní sekvence (NES) α - a β -tubulinu.

Červeně jsou znázorněny NES specifické jak pro rostliny tak živočichy, zeleně rostlinně-specifický NES a modře živočišně specifický NES (Schwarzerová et al., 2006).

Následně byly nalezené NES podrobeny testu exportní aktivity ve fúzi s GFP v rostlinných buňkách BY-2. Exportní aktivitu prokázaly u α -tubulinu rostlinně i živočišně specifické NES1 a u β -tubulinu NES2 a NES3. Dále byla potvrzena ztráta exportní aktivity mutační změnou těchto NES v sekvenci, která již neodpovídá NES konsensu (Obr. 6, Schwarzerová et al., nepublikovaná data). Je tedy možné, že rychlý export tubulinu z jádra, pozorovaný během recovery periody, byl založen na existenci funkčních NES v molekulách tubulinu.

		NES test	mutovaný NES test
rostlinný α - tubulin NES	NES1a (NESplant alfa): LGSLLLERLSV ttg ggt tct tta ctg ttg gag cgc ttg tcc gta taa L G S L L L E R L S V - mutNES1a: ttg ggt tct tta gct tct gag cgc ttg tcc gta taa L G S L A S E R L S V -		
	NES2a: IRFDGAINV		
	NES1b: LQLERINV		
β - tubulinové NESy	NES2b: ICFRTLKL atc tgt ttc cgc act ctc aaa ctc taa I C F R T L K L - mutNES2b: agc tgt gcc cgc act ctc aaa ctc taa S C A R T L K L -		
	NES3b: LNSDLRKLAV ctc aac tct gac ctt agg aaa ctc gcc gtg taa L N S D L R K L A V - mutNES3b: agc aac tct gac gct agg aaa ctc gcc gtg taa S N S D A R K L A V -		
	živočišný α - tubulin NES	NESanim alfa: IGKEIIDLCL att ggc aag gag atc att gac ctt gtg ttg I G K E I I D L V L mut NESanim alfa: att ggc aag gag gcc tct gac ctt gtg ttg I G K E A S D L V L	

Obr. 6: Test exportní aktivity NES a zrušení exportní aktivity NES α - a β -tubulinu.

Sekvence NES ve fúzi s GFP, exprese v buňkách BY-2. Potvrzení exportní aktivity α -tubulin NES1 a β -tubulin NES2 a NES3 (levé fotografie). Zrušení exportní funkce NES mutací (fotografie vpravo, mutace znázorněny v každém druhém řádku, Schwarzerová, nepublikovaná data)

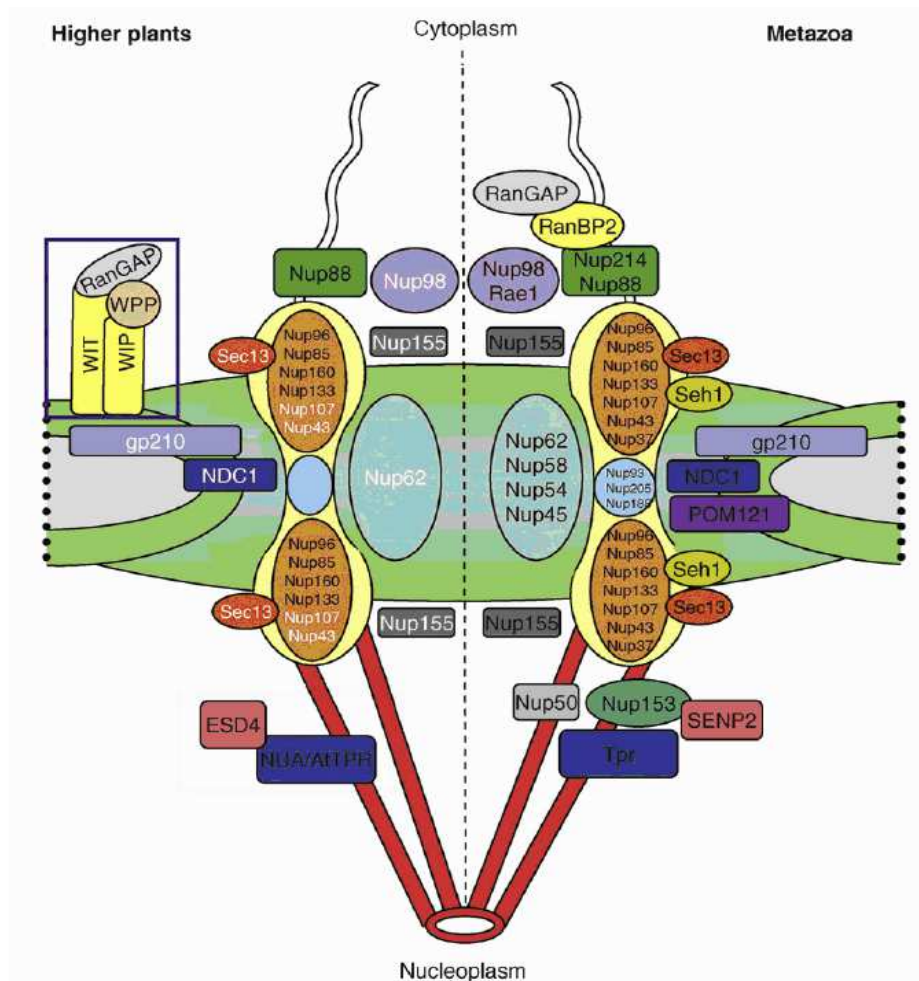
Podobný jev byl pozorován u lidských buněk HeLa; u buněk ošetřených chladem, nocodazolem a inhibítorem jaderného exportu leptomycinem B byla demonstrována akumulace tubulinu v jádrech. Autoři dále popisují akumulaci jaderného tubulinu, uvěznění v G0-G1 fázi a hynutí buněk transformovaných β -tubulinem s mutovaným NES1, z čehož lze usoudit možnost interference tubulinu s kritickými procesy v jádře (Akoumianaki et al., 2009).

Mechanismus importu tubulinu do jádra není znám. α/β - tubulin neobsahuje známý NLS (Schwarzerová et al., 2006). Může být však do jádra transportován pomocí jiné molekuly, která obsahuje NLS. Podobným způsobem je do jádra transportována např. γ -tubulin, který je přes jadernou obálku transportován v komplexu Tub4p (γ -tubulin Tub4p, Spc98p, Spc97p), přičemž lokalizace do jádra je zprostředkována NLS v proteinu Spc98p (Pereira et al., 1998). α/β tubulin může také „uvíznout“ v jádře během rekonstituce jaderné obálky po mitose. V případě jaderného importu β II-tubulin isotypu (běžně přítomen v jádrech mesangiálních buněk ledvin potkana), Walls-Bass et al., 2001 dokazují časovou vazbu transportu β II-tubulinu do jádra na mitosu a konstatují pravděpodobnost souvislosti importu tohoto tubulinu s GTPázou Ran, která je zcela integrovanou součástí nukleocytoplasmatického transportu.

Další vodítko k objasnění importu tubulinu do jádra poskytují Ishiguro et al., 2011; v lidských T-lymfocytech byla prokázána interakce proteinu NFAT (Nuclear factor of activated T-cells) a importinu- β přes α -tubulin (avšak ne β -tubulin). Výsledný ternární komplex, včetně α -tubulinu, je transportován do jádra. Interakce tubulinu s NFAT a importinem- β je potlačena acetylací tubulinu- α na lysinu 40.

2.3. Jaderný transport

Jaderný transport u eukaryotních buněk probíhá skrz NPC (nuclear pore complex). NPC je cca 40-60 MDa velký proteinový komplex (Rout et al., 2000), skládající se z cca 20-30 druhů proteinů (Nup, nukleoporiny), prostupující celou jadernou obálkou. Přesná funkce většiny nukleoporinů není popsána. Rostlinný a živočišný NPC jsou si značně podobné, avšak obsahují také mnoho rozdílů (Obr. 7). Asi nejvýznamnějším známým rozdílem jaderného transportu rostlin a živočichů je lokalizace a funkce RanGAP (RanGTPase-activating protein, Meier, 2000, viz dále).



Obr. 7: Srovnání rostlinného a živočišného NPC.

Vyjma WIP/WIT/WPP/RanGAP1 a NUA(AtTPR)/ESD4 komplexů (v modrém), všechny lokalizace a asociace byly odvozeny od savčích homologů. Rostlinné Nups indentifikované pouze na základě sekvenční podobnosti jsou bílým písmem; barvy rámečků znázorňují homologní komplexy, odvozené na základě sekvenční či funkční podobnosti (Meier a Brkljadic, 2009)

Nukleocytoplasmatický transport je proces, který je specifický jak vzhledem k organismu či orgánu, kde probíhá, tak vzhledem k nákladu, který je transportován. Jak již bylo řečeno, proteiny o velikosti zhruba 40-60 kDa NPC propouští pasivně, difuzí; větší proteiny podléhají přísné kontrole transportu, která obvykle vyžaduje v případě importu do jádra NLS, v případě exportu NES sekvenci.

Jedním z nejvýznamnějších účastníků jaderného transportu je GTPáza Ran (**Ras-related nuclear protein**). Podle využití Ran v daném transportním procesu lze nukleocytoplasmatický transport rozdělit na Ran-dependentní a Ran-independentní. Transport je dále ve většině případů spojen s proteiny skupiny importinů a exportinů; importiny regulují transport do jádra, exportiny regulují transport z jádra do cytoplasmy. Transport za účasti těchto proteinů v některých případech nevyžaduje přítomnost Ran, avšak většinou je s Ran spojen.

Jedním z nejvýznamnějších a nejčastěji používaných exportinů je protein Crm1/Xpo1, jehož exportní funkce je inhibována leptomycinem B, a který rozpoznává klasické hydrofobní NES. Tyto NES byly nalezeny právě v α - a β -tubulinu (viz kap. 2.2.). Neuber et al., 2008 představili fyzické propojení Crm1/Xpo1 se SPB (spindle pole body, MTOC *Saccharomyces cerevisiae*), tedy souvislost exportinu s nukleací mikrotubulů u uzavřené mitosy. V neposlední řadě je známa interakce importinu- α s mikrotubuly a aktinovými mikrofilamenty (Smith and Raikhel, 1998).

Ran-dependentní transport je nejčastějším způsobem nukleocytoplasmatického transportu. Ran má slabou GTPázovou aktivitu, měnící vázané GTP na GDP, přičemž obě formy Ran představují pro další účastníky transportu výrazně odlišné molekuly. GTPázová aktivita Ran je výrazně modifikována dalšími proteiny, díky čemuž je významně rozšířeno spektrum možností regulace transportu. Mezi tyto proteiny patří zejména výše zmíněný RanGAP, který zesiluje GTPázovou aktivitu Ran až 100000x (Bischoff et al., 1995); je důležité zmínit, že RanGAP se vyskytuje pouze na cytoplasmatické straně jádra. Druhým významným spoluhráčem Ran je RanGEF (Ran guanine exchange factor), který zajišťuje rychlou výměnu GDP za GTP na Ran a je přítomen v jádře v komplexu s histony H2A a H2B (Bischoff a Postingsl, 1991). Lokalizace RanGAP a RanGEF vede k asymetrické distribuci obou forem Ran: GDP forma Ran je přítomna především v cytoplasmě, koncentrace RanGTP je naopak nejvyšší v jádře (Sorokin et al., 2007).

Ran-dependentní nukleocytoplasmatický transport probíhá za účasti importinů či exportinů a RanGTP, přičemž vždy dochází k hydrolýze GTP vázaného na Ran na cytoplasmatické straně jádra, a to jak v případě exportu, tak importu, pomocí RanGAP.

V jádře je GDP na Ran vyměněno za GTP pomocí RanGEF, čímž je jaderný pool RanGTP regenerován.

Ran-independentní transport je zcela specifický vzhledem k translokované molekule; může probíhat jak pomocí exportinů či importinů, tak nezávisle na nich. Příkladem může být transport STAT proteinů (z angl. **s**ignal **t**ransducers and **a**ctivators of **t**ranscription): STAT1 může opustit jádro i bez pomoci Ran či exportinu, neboť může přímo interagovat s nukleoporiny Nup153 a Nup214 (Marg et al., 2004).

Jak již bylo zmíněno, asi nejvýznamnějším známým rozdílem jaderného transportu živočichů a rostlin je lokalizace a funkce RanGAP: v živočišných buňkách je RanGAP asociován přímo s NPC přes Nup358; tato vazba je umožněna SUMOylací RanGAP. Rostlinný RanGAP neobsahuje sekvenci, který by mohla být SUMOylována, a zároveň, rostlinné NPC neobsahují Nup358, tudíž RanGAP musí s NPC či jadernou obálkou asociovat jiným způsobem. Meier, 2000 ukazuje, že RanGAP *Arabidopsis* se neváže přímo na NPC, ale na jadernou obálku interakcí své WPP domény s WIP (WPP-domain interacting protein), který je ukotven v jaderné obálce transmembránovými doménami.

2.4. Shrnutí

Tubulin je, až na několik výjimek, výlučně cytoplasmatický protein. Jeho přítomnost v jádře je u savčích buněk projevem vážného narušení proliferační kontroly buněk. Na základě dostupných informací je zcela evidentní, že transport tubulinu mezi jádrem a cytoplasmou je vysoce kontrolovaný a regulovaný proces, vázaný především na mitosu. Výzkum naší skupiny představil výjimku či porušení této kontroly, a to reverzibilní akumulaci tubulinu v jádrech interfázních rostlinných buněk za chladových stresových podmínek (Schwarzerová et al., 2006). Podle dosavadních výzkumů naší skupiny nemají α -tubulin ani β -tubulin známé jaderné lokalizační sekvence, avšak obsahují dokonce několik funkčních klasických hydrofobních NES. Biologický význam importu tubulinu do jádra a jeho exportu z jádra není dosud zřejmý.

Pro objasnění role exportu tubulinu z jádra jsem v této práci testoval vliv exprese rostlinného β -tubulinu se zrušenými NES v rostlinách *Arabidopsis thaliana* a z menší

části v suspenzních kalusových buňkách *Nicotiana tabacum* BY-2. Byla použita indukovatelná exprese, přičemž mutovaný tubulin byl označen GFP molekulární značkou pro snadné sledování lokalizace tubulinu v buňkách.

3. MATERIÁL A METODY

3.1. Materiál

3.1.1. Rostlinný materiál

Pro transformaci rostlin jsem použil rostliny *Arabidopsis thaliana*, ekotyp Columbia. Transgenní kalusy byly získány transformací tabákových buněk BY-2 (Schwarzerová et al., nepublikováno) odvozených z rostlin *Nicotiana tabacum* Bright Yellow-2 (BY-2, Nagata et al., 1992). Tyto transgenní kultury jsem již měl k dispozici. Jako reprezentativní suspenzní buňky *Arabidopsis thaliana* byly použity suspenzní buňky ekotypu Landsberg Erecta (May et al., 1993).

3.1.2. Bakteriální materiál

Pro transformaci rostlinného materiálu jsem použil *Agrobacterium tumefaciens*, kmen C58C1 s pomocným plastidem pGV2260 (Deblaere et al., 1985). Pro klonování a množení plasmidů jsem použil *Escherichia coli*, kmen XL-1 blue (Sambrook and Russel, 2001).

3.1.3. DNA

3.1.3.1. Plasmidy

pDrive klonovací vektor (Obr. 8, Qiagen)

Binární konstrukt pER8 (Obr. 8, Zuo et al., 2000), 17- β -estradiolem indukovatelný promotor P35S ve fúzi s transaktivátorem XVE, rezistence na hygromycin (rostliny), rezistence na spektinomycin (bakterie)

Binární konstrukt pEGFP-Tub (Obr. 8, Ebiotrade), rezistence na neomycin a kanamycin (bakterie)

Binární konstrukt pBIN19 (Obr. 8, Ueda et al., 1999), rezistence na kanamycin (bakterie)

Testované fúzní proteiny v rostlinném materiálu:

Vektor pER8:

GFP

GFP-AtTUB6 (fúze na C-konci GFP; NC_003076; lab Prof. Hashimoto)

GFP-AtTUB6 Δ NES2 (NES2, ICFRTLKL, mutována na **SCARTLKL**)

GFP-AtTUB6 Δ NES3 (NES3, LNSDLRKLAV, mutována na **SNSDARKLAV**)

GFP-AtTUB6 Δ NES23 (NES23, uvedené mutace NES2 a NES3 zároveň)

Vektor pBIN19:

GFP-AtTUA6 (Ueda et al., 1999)

Testované fúzní proteiny v živočišném materiálu (vektor pTub):

YFPcitrine (Heikal et al., 2000)

smrsGFP- β NES2 (soluble-modified red-shifted GFP, GenBank: AAB16958.1)

smrsGFP- β NES3

smrsGFP-rst α NES1 (rostlinně specifická NES α -tubulinu, LGSLLLERLSV)

smrsGFP-zoo α NES1 (živočišně specifická NES α -tubulinu, IGKEIIDLVL)

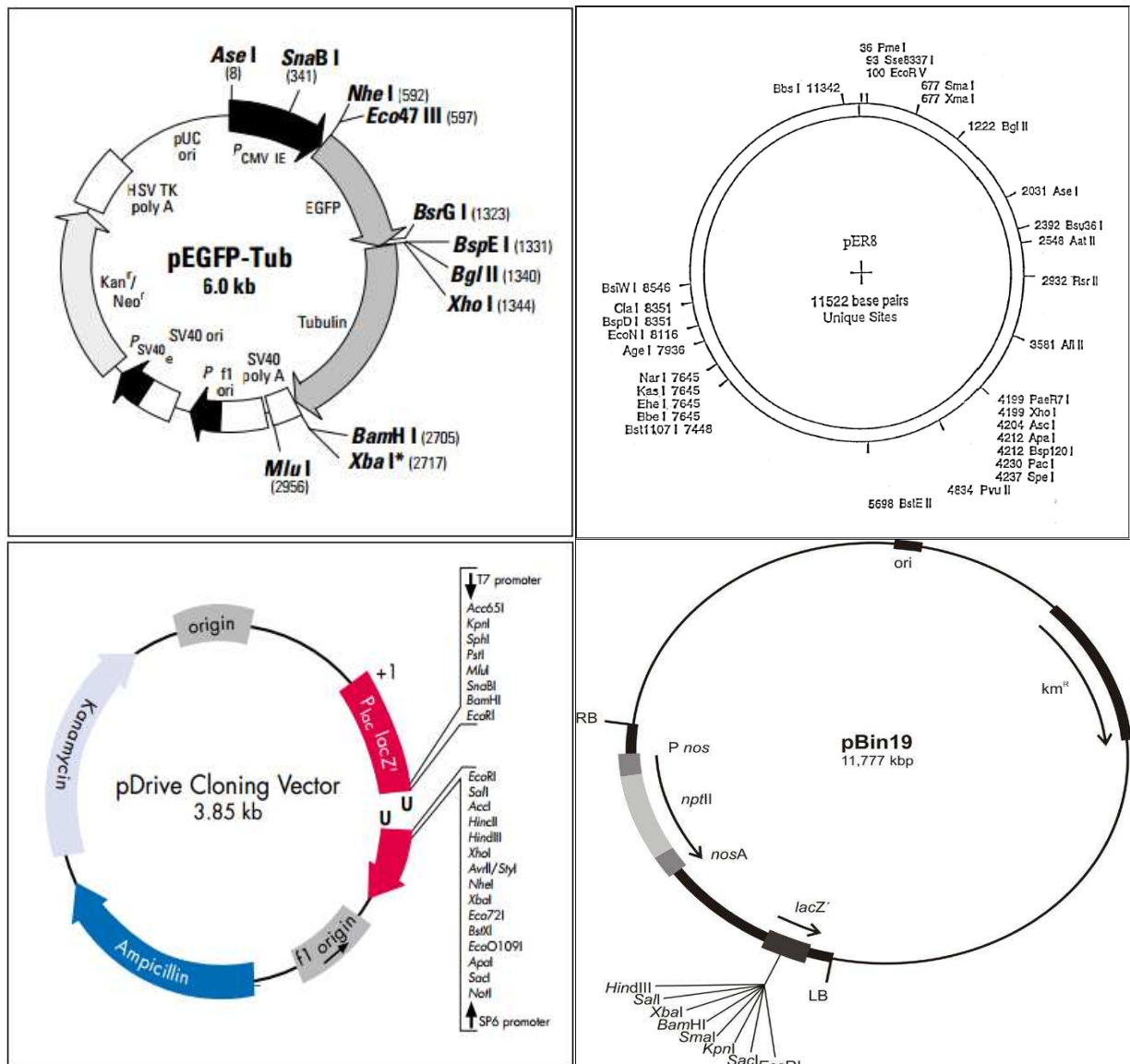
smrsGFP- Δ β NES2

smrsGFP- Δ β NES3

smrsGFP- Δ rst α NES1 (LGSLLLERLSV mutována na LGSL**AS**ERLSV)

mGFP5- Δ zoo α NES1 (mGFP5, GenBank: AAB47998.1; NES IGKEIIDLVL mutována na IGKE**AS**DLVL)

Pokud neuvedeno jinak, použité vektory byly připraveny RNDr. Kateřinou Schwarzerovou, Ph.D. (nepublikováno).



Obr. 8: Použité vektory pDrive, pEGFP-Tub, pER8 a pBIN19.

3.1.4. Kultivační media

LB (lysogeny broth) medium:

pepton (Serva) 10 g/l, yeast extract (Serva) 5 g/l, NaCl 10 g/l

YEB (yeast extract and beef) medium:

pepton 5 g/l, yeast extract 0,5 g/l, sacharosa (Lach-Ner) 2,5 g/l, MgSO₄ 1 g/l

MS (Murashige a Skoog) medium pro buňky kalusu *Nicotiana tabacum* BY-2 a buňky kalusu *Arabidopsis thaliana* Landsberg Erecta:

MS soli 4,517 g/l (Sigma), 30 g sacharosa, 200 mg/l KH_2PO_4 , 100 mg/l inositol (MP Biomedicals), 0,2 mg/l 2,4-D (Sigma), 1 mg/l thiamin (Sigma), pH = 5,8

MS minimální medium pro rostliny *Arabidopsis*:

2,2 g/l MS solí, 10 g/l sacharosa, 12 g/l agar (Duchefa Biochemie), pH = 5,7

SOC (super optimal broth with catabolic repression):

2% pepton, 0,5% yeast extract, glukosa 20 mM, 10 mM NaCl, KCl 2,5 mM, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, sterilizace filtrací

D-MEM (Dulbecco modifikované Eagle medium, výrobce Gibco): esenciální a neesenciální aminokyseliny bez glutaminu (0,2-0,8 mM), CaCl_2 (1,8 mM), $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ (0,2 μM), KCl (5,37 mM), MgSO_4 (0,08 mM), NaCl (110 mM), NaHCO_3 (44 mM) NaH_2PO_4 (0,91 mM), glukosa (25 mM), cholin chlorid (29 μM), i-inositol (40 μM), kyselina folová (9 μM), niacinamid (33 μM), pyridoxal-HCl (12 μM), riboflavin (1 μM), thiamin (12 μM), bez fenolové červeně. Dodatky: přidán glutamin 4 mM, antibiotikum dle potřeby, 10% FBS (Gibco). Trypsin pro uvolnění buněk 0,25-0,5% (Gibco).

3.2. Metody

3.2.1. Kultivace buněk HeLa

HeLa buňky byly kultivovány v mediu D-MEM při 37°C a 5% CO_2 , pasážování 1-2x týdně (zahrnuje trypsinaci buněk: 0,25-0,5% trypsin 10 min, zastavení D-MEM s 10% FBS).

3.2.2 Transfekce tumorových buněk epitelu cervixu *Homo sapiens* HeLa vektory pTub-GFPNES

Buňky HeLa jsem transfekoval živočišnými konstrukty pTub kódujícími GFP s C-terminálními fúzemi se všemi zmíněnými variantami jaderných exportních sekvencí β NES2, β NES3, rst α NES1, zoo α NES1, Δ β NES2, Δ β NES3, Δ rst α NES1 a Δ zoo α NES1. Jako kontrola byl použit pTub-YFP citrine. Tato kontrolní varianta GFP byla již dříve v buňkách HeLa úspěšně testována. pTub-YFPcitrine byl darován RNDr. Lenkou Libusovou, Ph.D. z Katedry buněčné biologie PĚFUK.

Nejprve bylo potřeba překlonať GFPNES z pDrive do živočišného vektoru pTub. Od školitelky jsem měl k dispozici pDrive kódující varianty β NES2, β NES3, rst α NES1, Δ β NES2, Δ β NES3, Δ rst α NES1 a Δ zoo α NES1. pDrive-GFP-zoo α NES1 jsem připravil pomocí PCR (3.2.2.1.).

3.2.2.1. Příprava vektoru pDrive-GFP-zoo α NES1

PCR fúzi GFP se zoo α NES1 jsem provedl na templátu kódujícím smrsGFP pomocí primerů

5'-CTACAACACAAGGTCAATGATCTCCTTGCCAATGTATTTGTATAGTTCATCCATG-3' (C-konec GFP s NES) a 5'-ATGAGTAAAGGAGAAGAAC-3' (N-konec GFP). Pro PCR byl vždy použit cycler MJ Research PTC-200.

PCR směs: 5 μ l pufr, 3 μ l MgCl₂, 1 μ l dNTP, 37,5 μ l H₂O, 1 μ l forward primer, 1 μ l reverse primer, 0,5 μ l polymeráza Taq, 1 μ l templátové DNA.

PCR cyklus:

- 1) denaturace DNA 94°C 3'
- 2) denaturace DNA 94°C 30"
- 3) nasednutí primerů 50°C 45"
- 4) polymerace 72°C 45"
- 5) opakovat bod 2) 30x

- 6) dosyntetizování nedokončených vláken 72°C 5'
- 7) 4°C

PCR produkt jsem nanesl na 1,2% agarosový gel a připojil zdroj s nastavením 100 mV a 50 mA. GFP-zoo α NES1 jsem z gelu izoloval kitem Qiagen gel extraction kit (150) a spolu s pDrive podrobil restričnímu štěpení enzymy XbaI a BamHI (oba enzymy v poměru k pufru Tango 1:2, pufr k celkovému objemu 1:10, inkubace 2h při teplotě 37°C). Produkty restričního štěpení byly elektroforézou separovány a izolovány. GFP-zoo α NES1 a otevřený pDrive jsem následně ligoval T4 ligázou (enzym v poměru k pufru 1:50, pufr k celkovému objemu 1:10, přes noc při teplotě 4°C). Koncentrace DNA byly měřeny spektrofotometrem Thermo Spectronics BioMate 5. Ligační směsí jsem transformoval *E. Coli* (transformace viz 3.2.2.2.) a pDrive-GFP-zoo α NES1 namnožil kitem Wizard Plus SV Minipreps (Promega).

Správně provedenou ligaci plasmidu jsem potvrdil pomocí kontrolní PCR se stejnými primery, které jsou použil k syntéze GFP-zoo α NES1. Elektroforézou jsem na základě množství a porovnání délky PCR produktu s otevřeným pDrive potvrdil inserci GFP-zoo α NES1 do pDrive.

3.2.2.2. Transformace *Escherichia coli* metodou heat shock

- 1) Rozmrazit heat shock kompetentní *E. coli* XL1-Blue na ledu
- 2) Přidat 3-4 μ l ligační směsí či jiné DNA, lehce zamíchat pohybáním špičky pipety
- 3) Nechat inkubovat 30 minut na ledu
- 4) 42°C po dobu 1 minuty bez míchání
- 5) 2 minuty na ledu
- 6) Přidat 1 ml SOC media (rt)
- 7) Nechat růst na třepačce 1 hodinu při 37°C
- 8) Vysít na agarové LB medium s příslušným selekčním markerem

3.2.2.3. Příprava vektorů pTub-GFPNES

Všechny varianty GFPNES v pDrive byly překlonovány do pTub následujícím způsobem: pDrive-GFPNES a pTub byly namnoženy v *E. Coli*. Plasmidy následně byly restriktivně štěpeny enzymy NheI a BamHI (oba enzymy v poměru k pufru 1:2, pufr k celkovému objemu 1:10, inkubace 2h při teplotě 37°C). Produkt restriktivního štěpení byl elektroforézou na agarozovém 1,2% gelu separován; z gelu jsem vyřízl otevřený pTub a GFPNES, izoloval a ligoval varianty GFPNES do pTub T4 ligázou (enzym v poměru k pufru 1:50, pufr k celkovému objemu 1:10). Ligační směsí jsem transformoval *E. Coli* a plasmidy namnožil. Nakonec jsem ověřil správnou délku konstruktů po ligaci na elektroforéze.

3.2.2.4. Transfekce buněk HeLa

Transfekce byla provedena metodou lipofekce, kitem Lipofectamine 2000 (Invitrogen) do 0,5 ml buněk ve 24-jamkových destičkách, cca 0,8 µg DNA a 2,0 µl Lipofectamine na variantu, dle návodu dodaného výrobcem. Po transfekci byly buňky ponechány kultivaci 24 hodin při 37°C a 5% CO₂, a následně byly mikroskopovány konfokálním mikroskopem (Leica TCS NT, Heidelberg, Spolková Republika Německo). Veškerá další mikroskopická práce byla provedena tímto mikroskopem, není-li uvedeno jinak.

3.2.3. Kultivace kalusů a suspenzních buněk *Nicotiana tabacum* BY-2 a *Arabidopsis thaliana* Landsberg Erecta

Kalusy byly udržovány pasážováním do čerstvého agarového MS media s cefotaximem (0,1 mg/ml, Sandoz) a hygromycinem (0,025 mg/ml, MP Biomedicals) se subkultivačním intervalem 3 týdny. Podobným způsobem byly udržovány suspenzní buňky *Nicotiana* i *Arabidopsis* v tekutém MS mediu, subkultivačním intervalem 1 týden, na orbitální třepačce (IKA KS501, IKA Labortechnik, Staugen, Spolková Republika Německo; 120 rpm; průměr orbity 30 mm). Oba typy kultur byly kultivovány ve tmě při 26°C.

3.2.4. Sterilizace semen, stratifikace a kultivace rostlin *Arabidopsis thaliana*

Pro *in vitro* experimenty jsem semena *Arabidopsis* vždy sterilizoval následujícím způsobem:

- 1) Nasypat do 2 ml mikrozkušavky cca 100 μ l semen
- 2) Přidat 1 ml sterilizačního roztoku (Savo: ethanol 96% : Triton X-100 (Serva) v poměru 1 : 5 : 0,003)
- 3) Třepat 10 minut
- 4) 2x promýt 1 ml ethanolu 96%
- 5) Odsát maximální množství ethanolu a „rozetřít“ semena po stěně mikrozkušavky
- 6) Nechat ve flowboxu vyschnout, až se semena k sobě nebudou lepit. Nesušit déle než 2h. Semena jsou připravena k výsevu či uskladnění.

Po sterilizaci byla semena vyseta na MS minimální medium, stratifikována minimálně 2 dny při teplotě 4°C a poté kultivována při fotoperiodě 16/8 a teplotě 23°C. *Ex vitro* byly rostliny *Arabidopsis* kultivovány v rašelinových válečcích jiffy (Jiffy Products International) ve stejné kultivační místnosti.

3.2.5. Transformace *Arabidopsis thaliana* wt vektory pER8-tubulin metodou "floral dip"

Před samotnou transformací *Arabidopsis* bylo potřeba nejprve transformovat *Agrobacterium tumefaciens* příslušnými inducibilními pER8 vektory (β -tub, GFPfree, NES2, NES3 a NES23, již jsem měl k dispozici) a ověřit přítomnost genu v bakteriálních transformantech pomocí PCR.

3.2.5.1. Transformace *Agrobacterium tumefaciens* elektroporací

- 1) Kompetentní buňky rozmrazit na ledu
- 2) Kyvety zchládit na ledu
- 3) Nastavení elektroporátoru: 25 μ F, 2 kV, 200 ohm (BioRad Gene Pulser)
- 4) Přidat 1-4 μ l DNA k 40 μ l suspenze buněk a inkubovat 1 minutu na ledu
- 5) Přenést buňky do kyvety a aplikovat el. puls
- 6) Po pulsu rychle přidat 1 ml YEB media do kyvety a přepipetovat do zkumavky
- 7) Nechat růst 2-3 hodiny ve 28°C
- 8) Vysít 100-200 μ l na pevné YEB medium s rifampicinem (0,1 mg/ml, MP Biomedicals) a spectinomycinem (0,1 mg/ml, MP Biomedicals). Nechat 2 dny růst při 28°C

3.2.5.2. PCR ověření přítomnosti genu pro GFP-tubulin v transformantech *Agrobacterium tumefaciens*

PCR směs:

2 μ l pufr, 1,5 μ l MgCl₂, 0,5 dNTP, 14,5 μ l H₂O, 0,5 μ l forward primer (5'-CCTCGAGATGAGTAAAGGAGAAG-3' pro β -tubuliny a volné GFP), 0,5 μ l reverse primer (5'-CACTAGTTCACTCATGATCCAATATC-3' pro β -tubuliny a 5'-CACTAGTTTATTTGTATAGTTCATC-3' pro volné GFP), 0,2 μ l polymeráza Taq, bakterie ze špičky namočené v kolonii transformanta

PCR cyklus:

- 1) denaturace DNA 94°C 3'
- 2) denaturace DNA 94°C 30"
- 3) nasednutí primerů 55°C 30"
- 4) polymerace 72°C 2,5'
- 5) opakovat bod 2) 30x

- 6) dosyntetizování nedokončených vláken 72°C 5'
- 7) 4°C

PCR produkt na gelu z elektroforézy se shodoval s kontrolním plasmidem, kterým jsem *Agrobacterium* transformoval, postupoval jsem tedy dále.

3.2.5.3. Transformace *Arabidopsis thaliana* metodou "floral dip"

(Převzato ze Zhang et al., 2006) Bakteriálními klony, jejichž transformaci jsem ověřil pomocí PCR, jsem inokuloval 300 ml YEB media s rifampicinem a spectinomycinem – inokulum tvořilo 0,6 ml bakteriální suspenze rostoucí přes noc. Suspenze byla kultivována při 28°C do druhého dne.

Druhý den:

- 1) Centrifugovat bakteriální suspenzi 15 min, 3700g, 4°C, ve 250 ml kyvetách.
- 2) Vylít supernatant, resuspendovat sediment ve zbytku media a poté v 5% sacharose
- 3) Přidat smáčedlo Silwet (AgroBio Opava) do konečné koncentrace 0,05%
- 4) Ostříhat z rostlin šešule a otevřené květy
- 5) V suspenzi ve vhodné nádobě namáčet po dobu 3-5 vteřin celé nadzemní části rostlin
- 6) Zabalit do igelitového pytle, nechat přes noc a přenést do kultivační místnosti
- 7) Po dopěstování rostlin do semen selektovat transformovaná semena na hygromycinu (0,025 mg/ml)

3.2.6. Transformace kalusu *Nicotiana tabacum* BY-2 vektory pER8-tubulin pomocí *Agrobacterium tumefaciens*

Již jsem měl k dispozici, bylo provedeno metodou popsanou v An, 1985.

3.2.7. Klonování buněk kalusu BY-2

Jelikož buňky kalusu BY-2 postupem času ztrácí expresi GFP, je nutno kulturu před pokusem klonovat, tedy získat kulturu pocházející z dobře exprimující ancestorové buňky. Pro účely mých pokusů jsem optimalizoval protokol klonování kalusů BY-2 publikovaný v Nocarová a Fischer, 2009.

Postup:

- 1) Smíchat 1,5 ml 6-denní suspenzní wt BY-2 kultury s 400 μ l čerstvého MS media
- 2) Přidat 25 μ l 3-denní kultury, kterou klonujeme, dobře promíchat
- 3) Napipetovat 500 μ l na každou ze dvou středních Petriho misek s tuhým MS a hygromycinem (0,025 mg/ml). Ne“hokejkovat“, pouze rozlít, roztřepat po povrchu plotny. Od každé varianty tedy budou dvě misky, každá s 500 μ l směsi. Hrudkovitost směsi není na závadu.
- 4) Nechat růst 3-4 týdny; jednotlivé klony se většinou vyznačují růstem směrem nahoru a jsou světlejší, průhlednější.
- 5) V případě inducibilního vektoru je nutno vždy polovinu jednotlivých kolonií převést v suspenzi, indukovat a opticky selektovat pod fluorescenčním mikroskopem.

3.2.8. Výběr rostlin dostatečně exprimujících pER8-GFP-tubulin

Selekci transgenních rostlin exprimujících GFP-fúzní proteiny jsem prováděl na rostlinách indukovaných 2 μ M 17- β -estradiolem po dobu 5 dnů pomocí fluorescenčního mikroskopu Provis (Olympus Provis AX 70; Olympus Optical Co., Ltd., Japonsko). Selektovány byly rostliny, kterým v kořenech svítilo více než 50% buněk. Tyto rostliny byly použity pro experimenty.

3.2.9. Chladové experimenty s *Arabidopsis thaliana*

Provedl jsem pět testů vlivu chladu na kompartmentaci tubulinu v kořenech 7-denních rostlin *Arabidopsis*, po dobu 4,5h, 6,5h, 11,5h, 12h a 16h při teplotě 0°C. Po

ošetření chladem jsem v rostlinách imunologicky označil α -tubulin (3.2.10.) a vizualizoval chromatin barvivem Hoechst 33258 (0,5 μ g/ml). Při mikroskopii jsem se zaměřil na kořenové špičky a elongační zónu kořenů, jelikož do těchto pletiv fixáží a protilátky snáze penetrují. V případě suspenzních buněk *Arabidopsis* jsem vyzkoušel vliv 8h chladu 0°C na 4-denní suspenzní buňky rostoucí v MS mediu, odvozené ze stonku *Arabidopsis thaliana* Landsberg Erecta. Buňky byly imunologicky barveny dle postupu v kap. 3.2.11. s fixáží vychlazenou na 0°C. Chromatin jsem opět označil barvivem Hoechst 33258.

Při všech chladových experimentech byly rostliny na agarovém mediu a suspenzní buňky v tekutém mediu zcela ponořeny v ledové vodě (T=0°C) ve vodotěsně uzavřených plastových miskách. S rostlinným materiálem dále bylo následně zacházeno výhradně pomocí nástrojů a nádob vychlazených na 0°C, a to v chladové místnosti, tj. při teplotě vzduchu 8-10°C.

3.2.10. Imunologická vizualizace α -tubulinu v kořenech *Arabidopsis*

Metoda imunofluorescenční vizualizace byla provedena jak popsáno v Krtková et al. 2012. Pro pokus byly vždy použity 3-5 dní staré rostliny kultivované *in vitro*, mezi jednotlivými kroky byly rostliny přenášeny v košíčkách s nylonovým propustným dnem.

Použité roztoky:

Mikrotubuly stabilizující pufr (MTSB): 50 mM PIPES (MP Biomedicals, LLC), 5mM EGTA (Sigma), 5mM MgSO₄·7H₂O, 0,1% TRITON-X100, pH 7,0

Fixáží: 4% paraformaldehyd (PFA, Serva) v MTSB

Enzymová lázeň: 0,05% pektolyáza Y-23 (Duchefa Biochemie), 0,4M manitol (Sigma) v MTSB, inhibitory proteáz: 0,3 mM PMSF, 10 μ M leupeptin, 1,25 μ M pepstatin

Fosfátový pufr (PBS): NaCl 8 g, KCl 0,2 g, KH₂PO₄ 0,158 g, NaHPO₄·12H₂O 2,31 g na 1 litr

Protilátky: primární: monoklonální myší anti- α -tubulin, klon DM1 α (Sigma), ředění 1:1000; sekundární: anti-myší Ig-TRITC (Sigma), ředění 1:300

Postup:

- 1) fixace ve 4% PFA v MTSB za tlaku 400-500 hPa, 1,5 h
- 2) promýt MTSB 3x10 min
- 3) inkubovat v enzymové lázni 20 min
- 4) promýt v MTSB 3x10 min
- 5) inkubovat v methanolu při -20°C, 15 min
- 6) zavodnit v PBS, 10 min
- 7) blokovat v 2% BSA (MP Biomedicals) v PBS, 30 min
- 8) inkubovat v primární protilátce v PBS přes noc ve 4°C
- 9) promýt v PBS 3x5 min
- 10) inkubovat v sekundární protilátce v PBS, 2 hod. ve 37°C
- 11) promýt v PBS 5x5 min
- 12) zhotovit preparát za použití 50% glycerolu

3.2.11. Imunologická vizualizace α -tubulinu v suspenzích rostlinných buňkách

Imunofluorescenční vizualizace byla provedena jak popsáno v Krtková et al. (2012).

Pro pokus byly vždy použity 3-denní buněčné kultury, mezi jednotlivými kroky byly buňky přenášeny v košíčkách s nylonovým propustným dnem.

Použité roztoky:

Stabilizující pufr (ASB): 100 mM PIPES (MP Biomedicals, LLC), 5mM MgCl \cdot 6H $_2$ O, 10 mM EGTA, pH 6,4.

ASB fixáž: 400 μ M MBS v ASB

PMSF fixáž: 2% PFA, 1% glutaraldehyd, 0,05% TRITON-X100 v ASB fixáži, inhibitory proteáz (300 μ M PMSF, 5 μ g/ml leupeptin, 1 μ g/ml pepstatin)

Enzymová lázeň: 0,05% pektolyáza Y-23 v ASB + inhibitory proteáz

Inkubační pufr: 1% BSA, 0,1% TRITON-X100 v PBS

Protilátky: primární: monoklonální myší anti- α -tubulin, klon DM1 α (Sigma), ředění 1:1000; sekundární: anti-myší Ig-TRITC (Sigma), ředění 1:300

Postup:

- 1) fixace v ASB fixáži, 20 min
- 2) fixace v PMSF 30 min
- 3) promýt ASB 2x10 min
- 4) inkubovat v enzymové lázni, 20 min
- 5) promýt ASB 3x10 min
- 6) inkubace v methanolu v -20 $^{\circ}$ C, 10 min
- 7) zavodnit v PBS, 10 min
- 8) blokovat v 1% BSA v PBS, 30 min
- 9) inkubovat v primární protilátce v PBS přes noc ve 4 $^{\circ}$ C
- 10) promýt v PBS 3x5 min
- 11) inkubovat v sekundární protilátce v PBS, 2 hod. ve 37 $^{\circ}$ C
- 12) promýt v PBS 3x5 min
- 13) zhotovit preparát za použití 50% glycerolu

3.2.12. Indukce exprese 17- β -estradiolem a ošetření leptomycinem B

17- β -estradiol (Sigma) byl vždy aplikován v koncentraci 2 μ M (Zuo et al., 2000), zásobní roztok 20 mM v DMSO). Leptomycin B byl aplikován v koncentracích 10, 100 a 500 nM (zásobní roztok 22 μ g/ml v metOH, Sigma).

3.2.13. Počítání mitotického indexu a množství buněk suspenzní kalusové kultury BY-2

Pro počítání mitotického indexu jsem jádra vizualizoval barvivem Hoechst 33258 (0,5 μ g/ml, 0,1% Triton X-100). Buňky byly kultivovány ve tmě v MS mediu na orbitální třepačce. Mitotický index jsem počítal u každé varianty ve třech nezávislých odběrech buněk. Celkem bylo v jedné variantě počítáno cca 1000 buněk.

Buňky z odebraných vzorků byly ponechány sedimentovat, medium bylo odsáto a buňky byly fixovány směsí ethanol : kyselina octová 3 : 1 při 4°C až do doby po čítání.

Při počítání množství buněk v testu účinku leptomycinu B na přežití/buněčný cyklus buněk BY-2 jsem pro lepší vizualizaci buněk taktéž použil Hoechst 33258. Počítání jsem provedl v Fuchs-Rosenthalově počítací komůrce (plocha 4x4 mm, hloubka 0,2 mm, objem 3,2 mm³). Množství buněk v celé komůrce tedy odpovídá množství buněk v 3,2 μ l. V pokusu s 10 nM leptomycinu B byla počítána v každém odběru jen $\frac{1}{4}$ celé počítací komůrky, v pokusu se 100 nM leptomycinu B celá počítací komůrka. V obou pokusech byla každá varianta počítána ve čtyřech nezávislých odběrech buněk. Celkem bylo v každé variantě spočteno cca 500-1000 buněk. Všechna mikroskopická práce uvedená v této kapitole byla provedena použitím mikroskopu Provis.

3.2.14. Analýza fenotypu transgenních rostlin *Arabidopsis thaliana*

Semena rostlin wt, GFPfree, β -tub, NES2, NES3 a NES23 selektovaných na resistenci vůči hygromycinu, jsem vysel na MS minimální medium a stratifikoval 4 dny při 4°C. Po 7 dnech kultivace jsem polovinu klíčících rostlin přesadil na MS minimální medium bez estradiolu a polovinu na medium s indukcí.

Po cca 42 hodinách indukce jsem zkontroloval expresi indukovaných rostlin. Pro analýzu jsem vybral jen rostliny, kterým svítila pod fluorescenčním mikroskopem většina kořenů intenzivněji než polovině všech exprimujících rostlin.

Následně jsem tyto klíčící rostliny projasnil pomocí natrium jodidu (viz následující kapitola).

Po uzavření preparátů do Nal jsem porovnal (mikroskop Provis) existenci a architekturu trichomů, orientaci buněk hypokotylu, zastoupení a charakter průduchů, charakter kořenových vlásků, tloušťku kořenů v místě započetí diferenciaci kořenových vlásků, strukturu apikálního meristému hlavního kořene a jakékoliv znatelné aberace indukovaných rostlin oproti neindukovaným rostlinám a oproti wt.

Všechny jmenované struktury byly pozorovány za účelem odhalení odchylek reprezentujících možné dopady mutovaných tubulinů na stabilitu mikrotubulárního cytoskeletu nebo na regulaci buněčného cyklu. Zároveň jsem pozoroval jakékoliv další aberace a fenotyp variant kontrolních, včetně GFPfree, z důvodu eventuálních netušených dopadů např. samotných DNA konstruktů, použitého GFP a 17- β -estradiolu na růst a vývoj studovaných rostlin.

Výchozí předlohou pro tuto analýzu jsou parametry rostlinných struktur z mikrofotografií varianty wt. Zároveň jsem zhodnotil, zda se neindukované varianty neliší od wt.

3.2.15. Projasnění klíčních rostlin *Arabidopsis* natrium jodidem

(RNDr. Aleš Soukup, Ph.D.)

Použité látky:

Aceton, fosforečnanový pufr Soerensen (39 ml 0,2 M NaH₂PO₄ + 61 ml 0,2 M Na₂HPO₄ + 200 ml H₂O, pH 7,0), glycerolová řada 15%, 30%, 50% a 65% v DMSO, projasňovací roztok (0,04 g Na₂S₂O₃ ve 20 ml 65% glycerolu, po rozpuštění přidáno 17 g NaI a 0,4 ml DMSO)

Postup:

- 1) Klíčnicí rostliny vložit na 30 minut do acetonu vychlazeného na -20°C
- 2) 2x promýt fosforečnanovým pufrem při laboratorní teplotě
- 3) Odvzdušnit při 0 Pa, 1 hodina
- 4) Odvodnit v glycerolové řadě po 30 minutách
- 5) Zavření do projasňovacího roztoku na sklíčka (aspoň 100 µl roztoku na sklíčko, krycí sklo lze podložit např. parafilmem)

3.2.16. Analýza množství fluorescenčního signálu v jádrech a cytoplasmě

Analýza byla provedena programem ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). V případě experimentů v kap. 4.3.3., 4.3.4. a 4.4. jsem ze série mikrofotografií optických průřezů kořeny/buňkami u každé buňky vždy vybral centrální řez jádrem a jadérkem. V tomto řezu jsem označil kruhovou oblast (Elliptical selection), která sahala od jaderné obálky k hranici jadérka, tj. část nukleoplasmy vyjma jadérka. Změřil jsem integrovanou hustotu signálu (Measure, integrated density) a tutéž masku označení jsem přesunul do takové oblasti cytoplasmy, která byla nejjasnější a zároveň nejhomogennější, tj. ideálně bez organel a bez mikrotubulů. Zde jsem provedl totéž měření.

Následně jsem vydělil integrovanou hustotu signálu v cytoplasmě hodnotou signálu z jádra a získal číslo reprezentující poměr signálu v cytoplasmě a jádře.

4. VÝSLEDKY

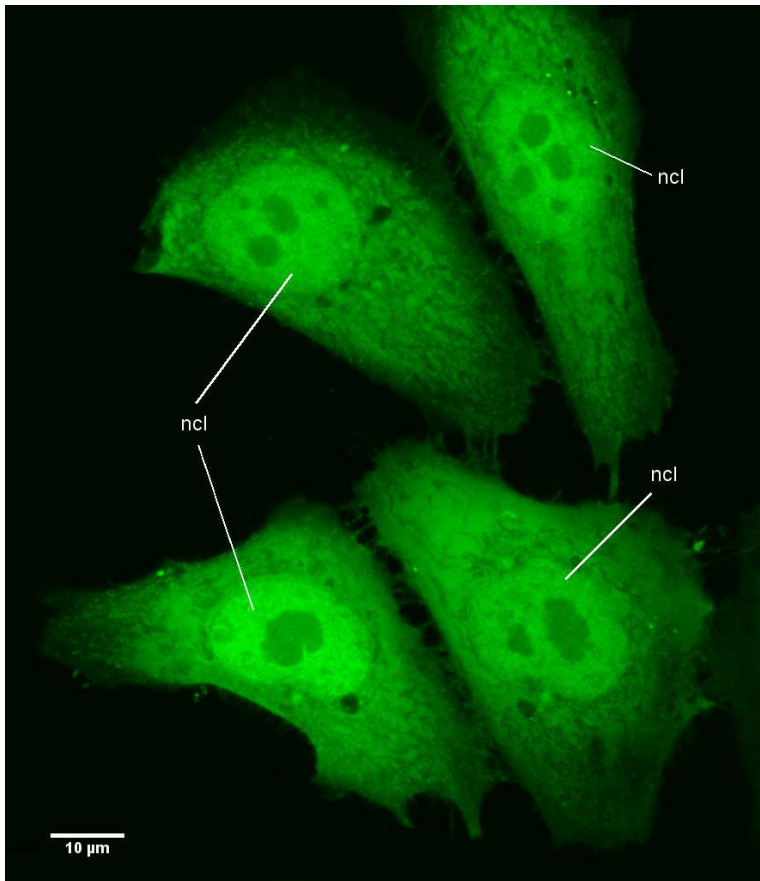
4.1. Studium funkčnosti NES z molekul tubulinů v živočišných buňkách

Prvním úkolem v rámci mé diplomové práce bylo studovat lokalizaci proteinu GFP s připojenými sekvencemi NES z molekul tubulinů v živočišných buňkách. Jako modelové byly vybrány buňky HeLa. Použit byl vždy pTub vektor, ve kterém byl tubulin-YFPcitrine nahrazen GFP-NES fúzemi.

Výsledek transfekce variant GFP-zoo α NES1, β NES2, β NES3, rst α NES1, Δ β NES2, Δ β NES3 a Δ rst α NES1 byl ve všech případech transfekce podobný, buňky většinou málo exprimovaly, podstoupily apoptosu či přestaly adherovat k podkladu a byl u nich častý tzv. blebbing (tvorba kulatých útvarů cytoplasmatické membrány, běžně pozorovaných u umírajících buněk typu HeLa, obr. 10). U kontrolní varianty pTub-YFPcitrine exprimovala transgen mnohem větší část buněk (alespoň třetina) a buňky nevykazovaly výše zmíněné aberace (obr. 9).

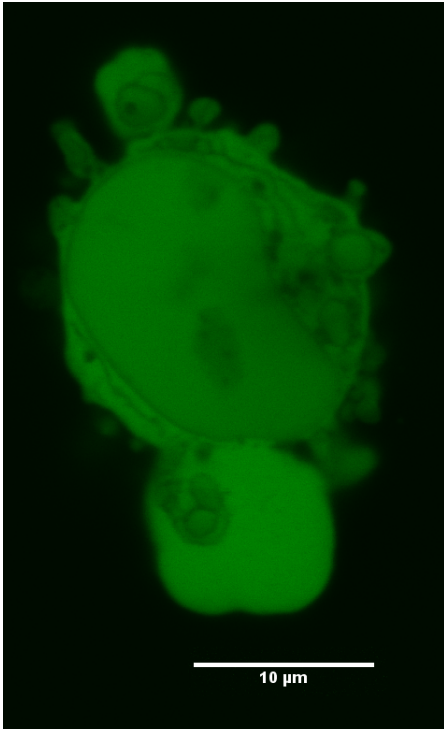
Výsledky transfekcí Δ zoo α NES1, který obsahuje mGFP5 byly v porovnání s ostatními nekontrolními konstrukty úspěšnější a většinou docházelo k akumulaci GFP v jádrech, více než v kontrolních buňkách (obr. 11).

Bylo tedy zjištěno, že varianta GFP smrsGFP, která byla použita na konstrukci GFP-NES vektorů s výjimkou Δ zoo α NES1 pro expresi v HeLa buňkách, není vhodná pro expresi v živočišném systému. Nahrazení nevhodné varianty GFP za variantu vhodnou pro expresi v živočišných buňkách bylo provedeno v rámci mezikatedrové spolupráce RNDr. Lenkou Libusovou, Ph.D. (Katedra buněčné biologie), a v této diplomové práci jsem se dále expresí v živočišných buňkách nezabýval.

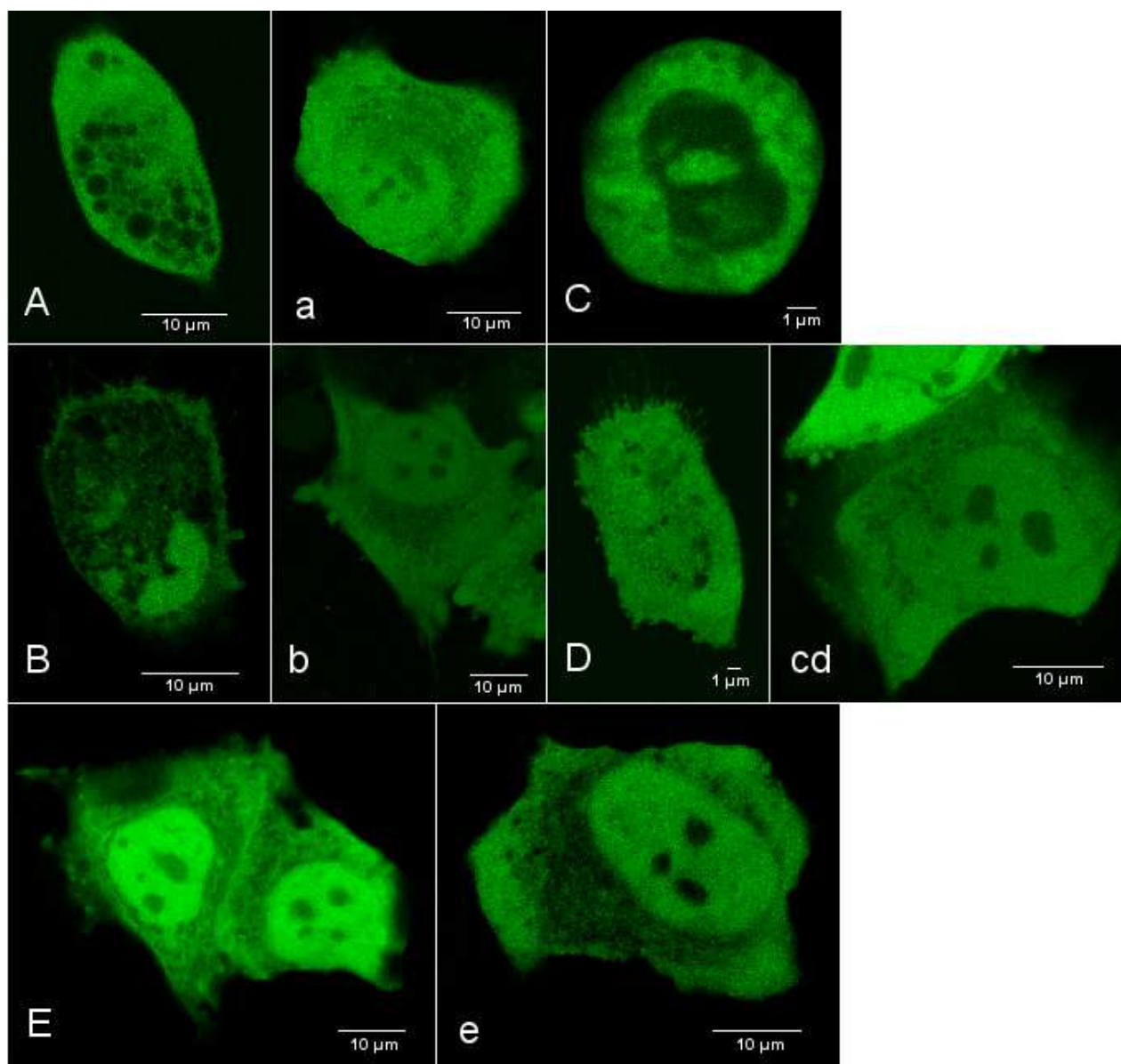


Obr. 9: **Kontrolní HeLa buňky exprimující YFPcitrine**

Zobrazené buňky jsou v dobré kondici, typicky adherují k podkladu a jsou tak velmi zploštělé, vysílají panožky, jádra (vyznačna) dobře viditelná.



Obr. 10: Blebbing, HeLa buňka exprimující GFP- Δ β NES3.



Obr 11: Výsledky transfekce HeLa buněk konstrukty pTub-zoo α NES1 (A), β NES2 (B), rst α NES1 (C), Δ rst α NES1 (D) a Δ zoo α NES1 (E).

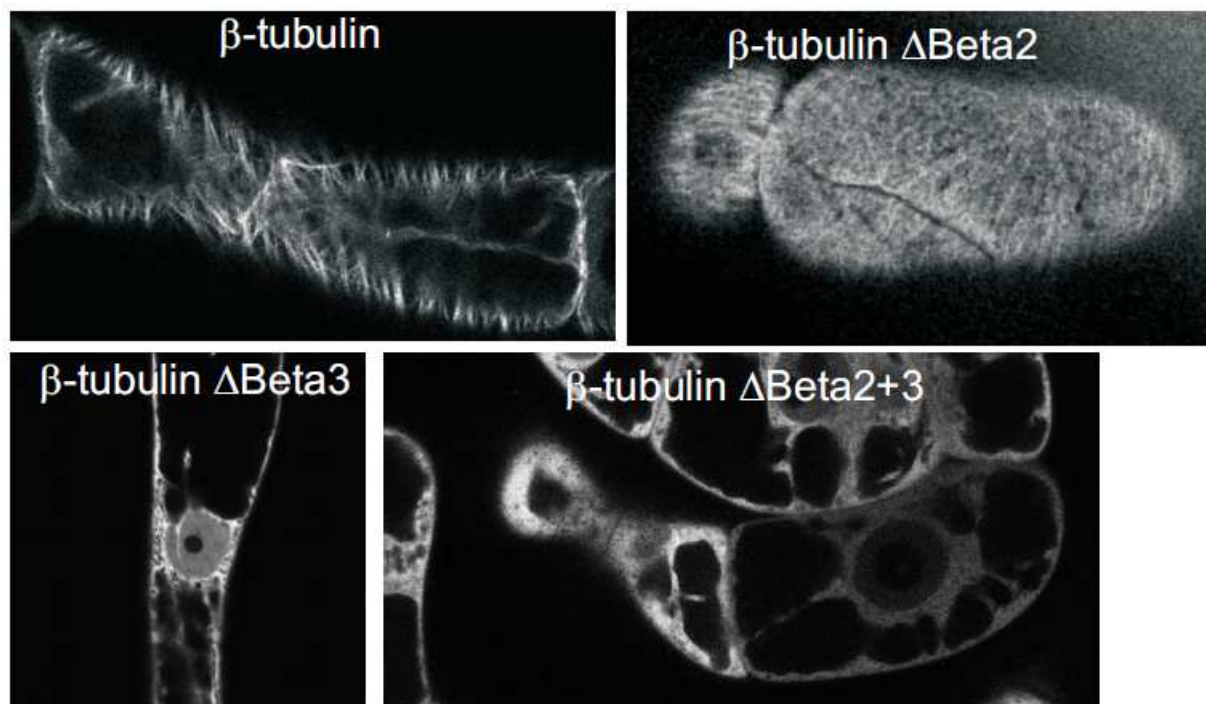
Malým písmenem vždy vyznačena kontrola YFPcitrine. Buňky s GFPNES většinou umírají, neadherují, podstupují blebbing anebo mají špatně viditelná či disintegrovaná jádra. Varianty β NES3, Δ β NES2 a Δ β NES3 nezobrazeny. Četnost transfekce Δ zoo α NES1 nebyla u HeLa buněk tak častá jako u kontroly, avšak buňky vypadaly méně poškozené než v případě ostatních variant s smrsGFP. Fotografie pocházejí ze 4 separátních transfekcí, z toho důvodu je víckrát zobrazena kontrola.

4.2. Studium exprese β -tubulinu nesoucím mutaci v NES sekvencích v buňkách BY-2

U transgenních buněk BY-2 exprimujících β -tub, NES2, NES3 a NES23 ve vektoru s indukovatelnou expresí, které jsem měl k dispozici, postupem času dochází k umlčování exprese, bylo tedy nutno klonovat intenzivně exprimující buňky (3.2.3).

4.2.1. Lokalizace β -tubulinu nesoucího mutaci v NES sekvencích v buňkách BY-2

Pro ilustraci uvádím fotografie indukovaných buněk BY-2 variant β -tub, NES2, NES3 a NES23 (Obr. 12). Přípravu buněk a pozorování zajistila školitelka.



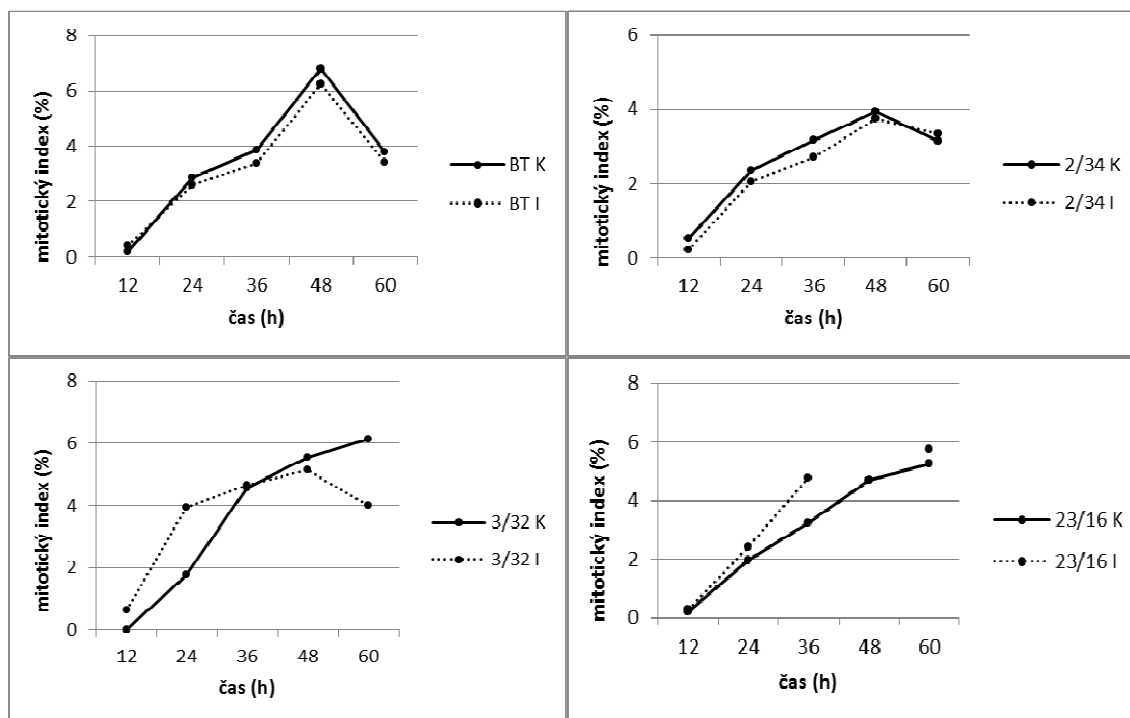
Obr. 12: Transgenní BY-2 variant β -tub, NES2, NES3 a NES23 *in vivo*.

Je vidět, že nemutovaný β -tubulin tvoří neporušený mikrotubulární cytoskelet; mutace NES2 (Δ Beta2) způsobuje zhoršení inkorporace tubulinu do mikrotubulů, přičemž mutace NES3 (Δ Beta3) a NES23 (Δ Beta2+3) inkorporaci ruší.

Lokalizace varianty β -tub je výlučně v mikrotubulech, NES2 tvoří frakci monomerního tubulinu, který není součástí mikrotubulů. NES3 a NES23 se do mikrotubulů neinkorporují.

4.2.2. Mitotický index po indukci

Pro studium vlivu exprese mutovaných tubulinů na buněčný cyklus jsem u indukovaných variant transgenních BY-2 hodnotil mitotický index (MI), jakožto běžně používaný ukazatel průběhu buněčného cyklu. K 3 dny starým suspenzním kulturám BY-2 β -tub, NES2, NES3 a NES23 jsem přidal indukční agens a počítal mitotický index po 12 hodinách až do 60 hodin po indukci, v celkem pěti odběrech. Po celou dobu byly buňky třepány. Mitotický index jsem stanovil jak pro indukované kultury, tak pro kultury kontrolní bez indukce.



Obr. 13: Srovnání průměrných mitotických indexů transgenních BY-2 u indukovaných a kontrolních variant.

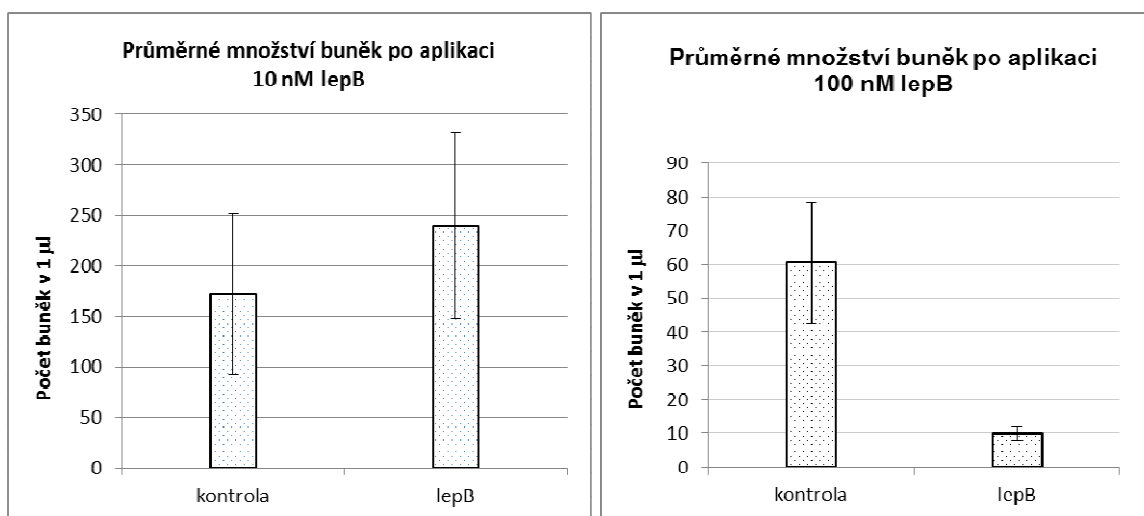
Data získaná z počítání mitotického indexu indukovaných transgenních suspenzních kultur kalusu BY-2 nasvědčují tomu, že 17- β -estradiolem indukovaná exprese GFP- β -tubulinu významně neinterferuje s frekvencí mitóz suspenzních buněk. Výsledky jsou dále diskutovány v kap. 5.2.1.

4.2.3. Efekt leptomycinu B

Za účelem narušení jaderného exportu a retence mutovaných tubulinů v jádře jsem použil drogu leptomycin B, který v koncentraci 10 nM u živočišných buněk interferuje s jaderným exportem všech molekul používajících nejobecnější exportní cestu pomocí exportinu Xpo1/Crm1 a způsobuje zástavu buněčného cyklu (Yoshida et al., 1990). Provedl jsem test vlivu leptomycinu B na rostlinné buňky kalusu BY-2.

K 3-denním buňkám BY-2 jsem přidal leptomycinem B do výsledné koncentrace 10 nM. Po 5 dnech byla hodnocena hustota buněk pomocí počítání v počítačící komůrce. Výsledek viz obr. 14.

Jelikož výsledek aplikace 10 nM leptomycinu B na BY-2 nasvědčoval zanedbatelnému či jen slabému vlivu drogy na buněčný cyklus, pokus jsem opakoval. 7-denní buňky jsem přenesl do čerstvého media a zároveň jsem aplikoval 100 nM leptomycin B. Hodnocení hustoty buněk jsem provedl po třech dnech inkubace.



Obr. 14: Vliv 10 nM a 100 nM leptomycinu B na růst suspenzních buněk BY-2 wt.

Vlevo 10 nM lepB aplikovaný na 3-denní kulturu po dobu 5 dní, vpravo 100 nM lepB aplikovaný na 7-denní kulturu po dobu 3 dní. Výsledek aplikace 10 nM lepB je nejasný, proto byla zvolena vyšší koncentrace drogy, kde je jasně znát zastavení dělení buněk.

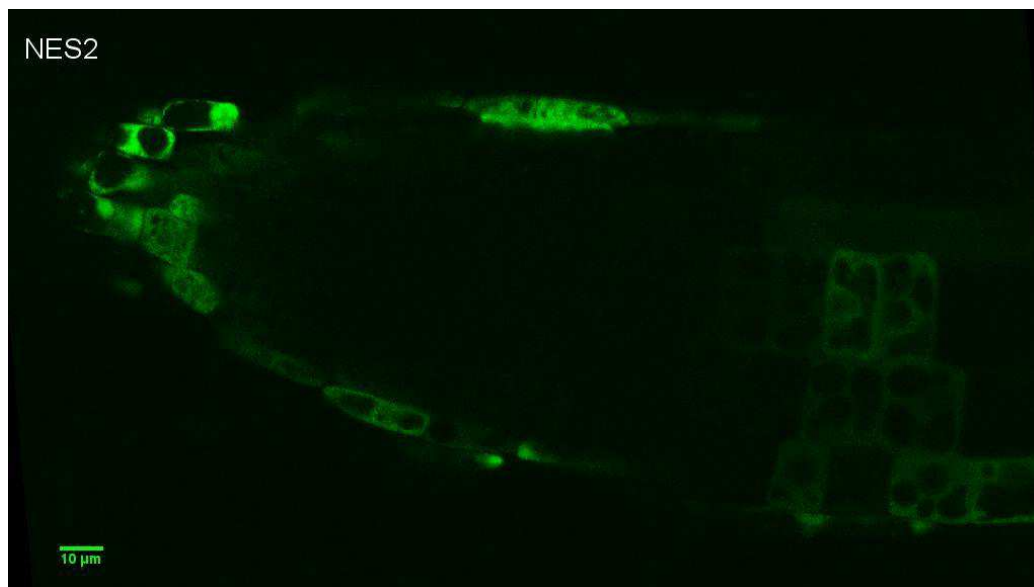
Leptomycin B v koncentraci 100 nM zcela průkazně interferuje s buněčným cyklem suspenzních buněk kalusu BY-2, tato koncentrace drogy tedy byla použita pro studium vlivu mutovaných tubulinů na celé rostliny *Arabidopsis thaliana*.

V experimentu s 10 nM leptomycinem B pravděpodobně došlo k zanešení výrazné chyby počítáním pouze ¼ počítačící komůrky, tím vysvětlují nepravděpodobně vysoké počty buněk v přepočtu 1 µl. K uvědomění si této chyby došlo až poté, co jsem provedl experimenty se 100 nM leptomycinem B.

4.3. Studium exprese β -tubulinu nesoucího mutaci v NES sekvencích v *Arabidopsis thaliana*

Pro experimenty jsem používal rostliny z první generace transformovaných rostlin. K expresi GFP-tubulinů v rostlinách transformovaných konstrukty NES2, NES3, NES23 a β -tub docházelo pouze u některých jedinců, s četností cca 1:4 až 1:10. Zároveň, míra exprese byla mezi rostlinami značně různorodá a často mozaikovitá (obr. 15). Rostliny exprimující NES23 vykazovaly většinou nejvyšší míru exprese ve většině

buněk. Postup, kterým jsem se vždy řídil při výběru rostlin pro každý experiment či pozorování, je popsán v kapitole 3.2.8. Je vždy nutno brát zřetel na skutečnost, že v případě mutovaných tubulinů se v každém experimentu pokus odehrává na pozadí velkého množství endogenních tubulinů a pod vlivem indukčního činidla 17- β -estradiolu.



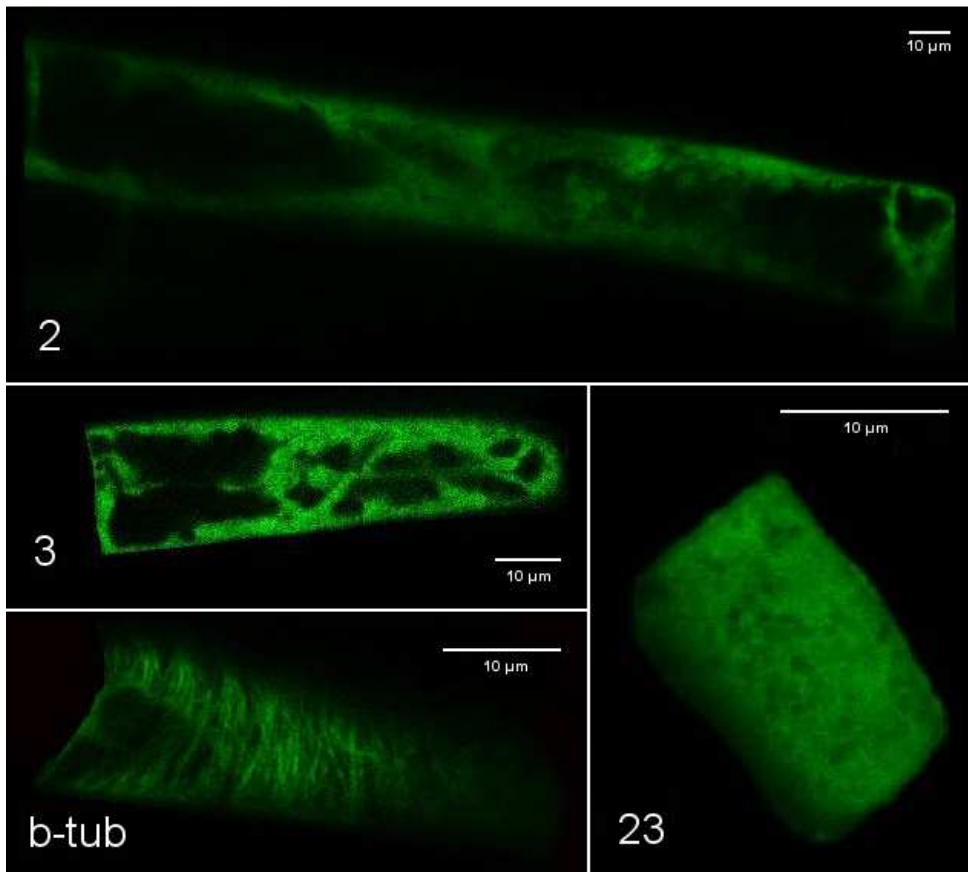
Obr. 15: Příklad mozaikovitosti exprese konstruktů NES2 v kořeni *Arabidopsis thaliana*.

Kořenová špička hlavního kořene 5-denní rostliny rostoucí na indukci. Podobně exprimující rostliny byly vyřazeny jako nevhodné pro experiment.

4.3.1. Lokalizace GFP-tubulinů v buňkách *Arabidopsis* po indukci

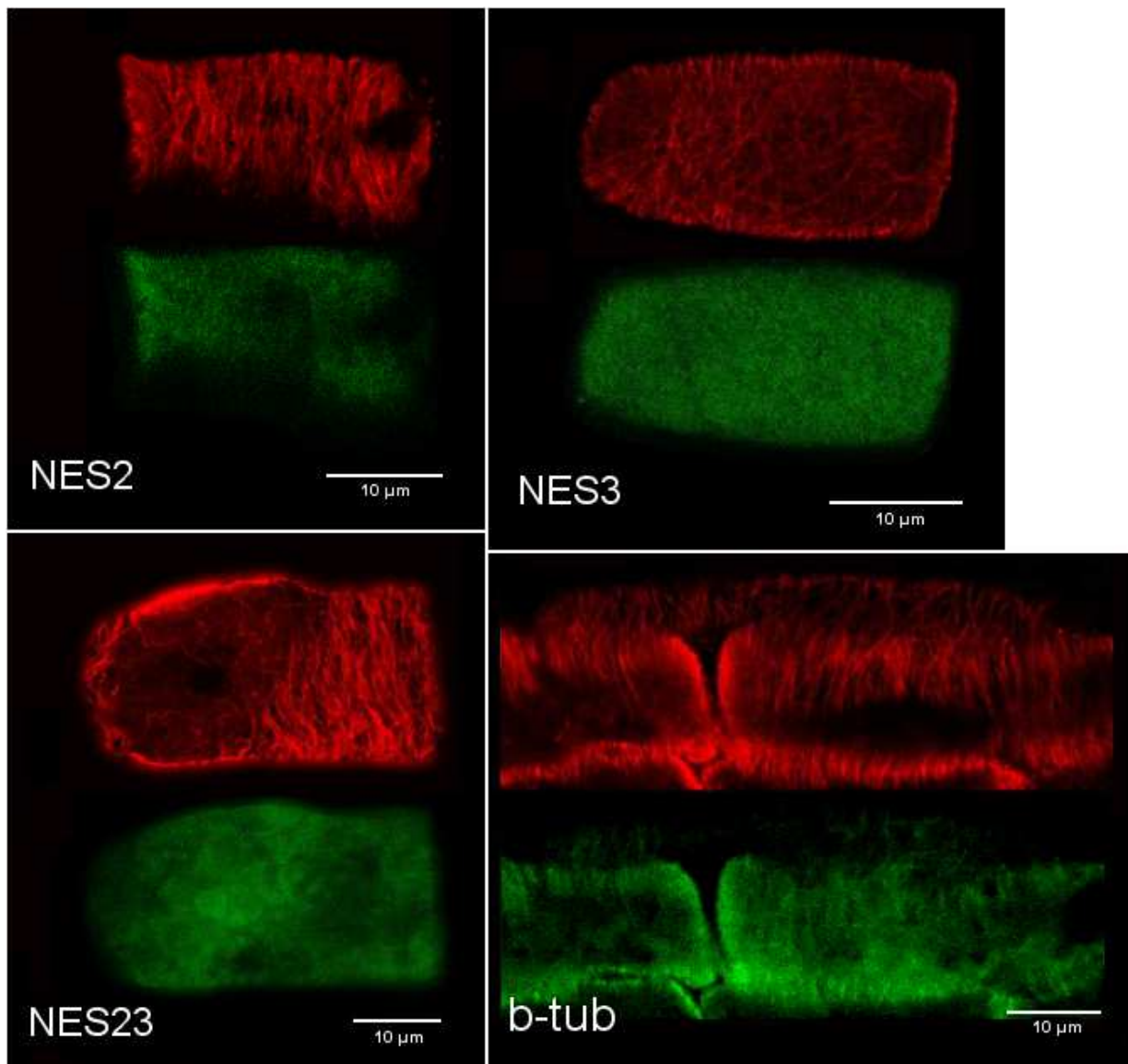
Bylo zjištěno, že mutace v molekule tubulinu významně ovlivňuje schopnost tubulinu inkorporovat se do mikrotubulu.

In vivo nebyla u indukovaných rostlin NES2, NES3 a NES23 inkorporace mutovaných tubulinů do mikrotubulů viditelná (Obr. 16). V případě rostlin NES2 však jiný člen našeho týmu slabou inkorporaci pozoroval. Pro lepší rozlišení a možnost studia kolokalizace GFP s endogenním tubulinem jsem vizualizoval mikrotubuly těchto rostlin pomocí imunofluorescence (Obr. 17).



Obr. 16: **Kortikální vrstva buněk kořene *Arabidopsis in vivo*, exprese GFP-tubulinů.**

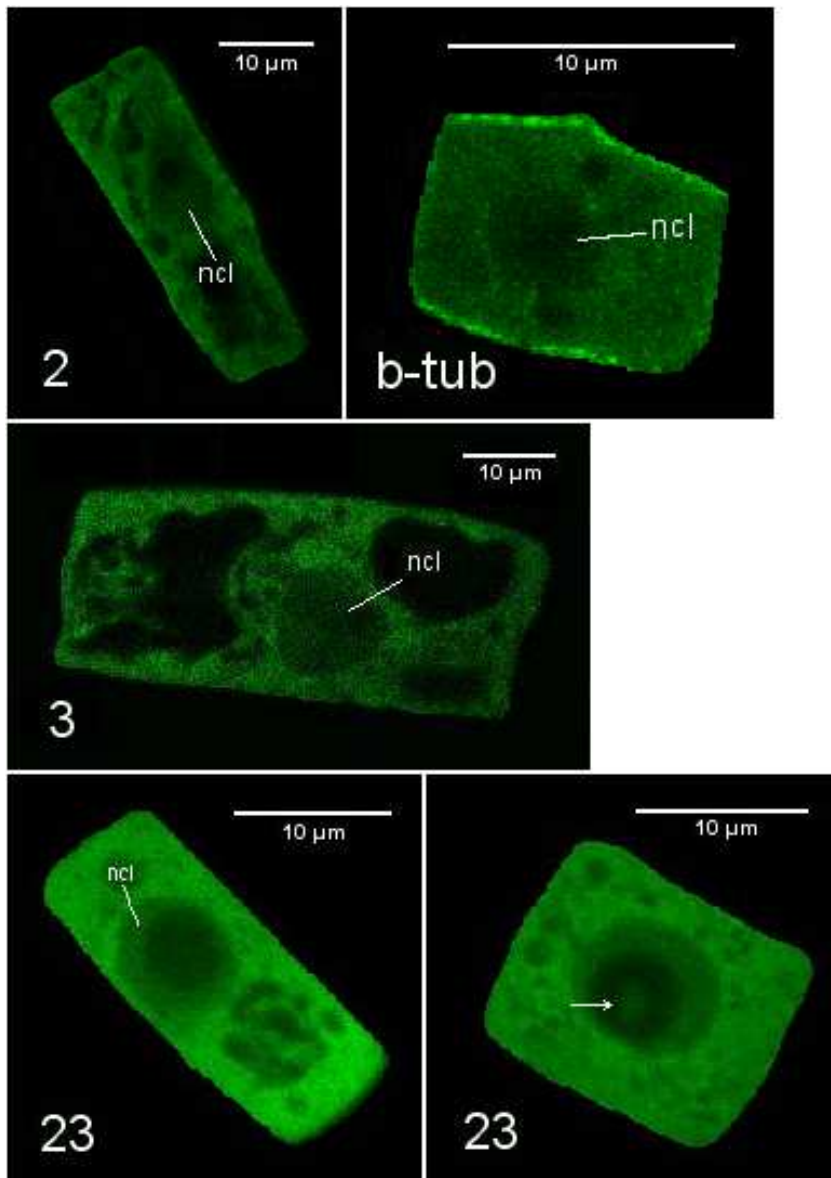
Vlevo dole na každém obrázku symbol varianty NES2, NES3, NES23 a β -tub. In vivo je inkorporace do mikrotubulů zřetelná pouze u varianty β -tub.



Obr. 17: Optické řezy kortexem kořenových buněk *Arabidopsis* indukovaných variant β -tub, NES2, NES3, NES23 exprimujících GFP-tubuliny, s imunologicky označenými mikrotubuly.

V červeném kanálu (vrchní buňky) označen α -tubulin (anti- α -tubulin primární protilátka) pomocí TRITC konjugovaným se sekundární protilátkou. V zeleném kanálu (spodní buňky) exprese GFP-tubulinů. Varianta NES3 a NES23 se do mikrotubulů zřejmě vůbec neinkorporuje. U varianty NES2 je inkorporace znát, avšak velká část tubulinu je přítomna v monomerní formě; totéž lze pozorovat u nemutovaného β -tubulinu.

Jaderná lokalizace mutovaných tubulinů *in vivo* se nijak výrazně neodlišuje od nemutovaného β -tubulinu (Obr. 18).



Obr. 18: Jaderná lokalizace nemutovaného β -tubulinu a NES2, NES3 a NES23 tubulinů *in vivo*.

Na každém obrázku vlevo dole číslo varianty. Je zřetelné, že GFP-tubulin vždy proniká i do jádra, do jadérka téměř vůbec. Výjimkou je NES23, u posledního obrázku lze vidět přítomnost GFP-NES23-tubulinu v části jadérka, pravděpodobně v jadéřkové vakuole (vyznačeno šipkou).

Z pozorování plyne, že lokalizace mutovaných tubulinů v buňkách kořenové špičky *Arabidopsis thaliana* je *in vivo* majoritně cytoplasmatická. V nukleoplasmě je GFP-tubulin vždy také v menší míře přítomen, v jadérku však není skoro vůbec, až na

výjimku NES23, kde lze ve většině buněk nalézt NES23 tubulin v části jádérka, pravděpodobně v jadéřkové vakuole.

Pro tuto práci je zcela zásadní skutečnost, že mutace NES2, NES3 či dvojitá mutace NES23 nezpůsobují výraznou retenci GFP- β -tubulinu v jádře těchto buněk. Konstrukt NES23 je v jádrech však přítomen ve větší míře, než nemutovaný α -tubulin (viz obr. 22, str. 61). Jako kontrola nemohl být použit nemutovaný β -tubulin, jelikož nebyl k dispozici dostatek dobře exprimujících rostlin.

Do mikrotubulů se inkorporuje pouze nemutovaný β -tubulin a z menší části NES2 tubulin. NES3 a NES23 tubulin nelze v mikrotubulech nalézt ani po fixaci buněk a imunologické vizualizaci mikrotubulárního cytoskeletu.

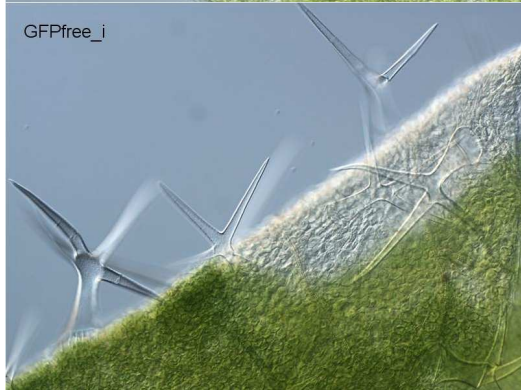
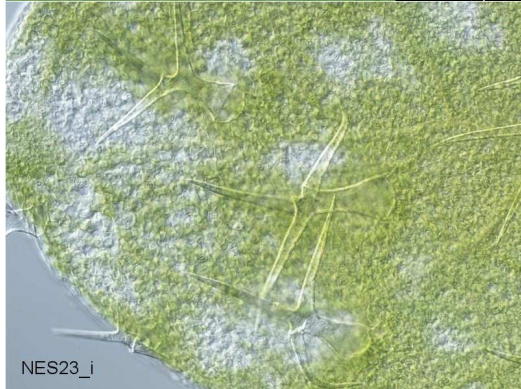
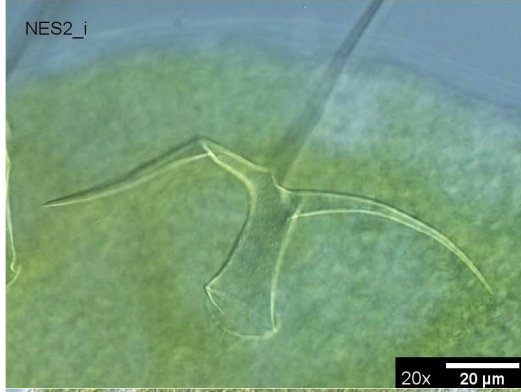
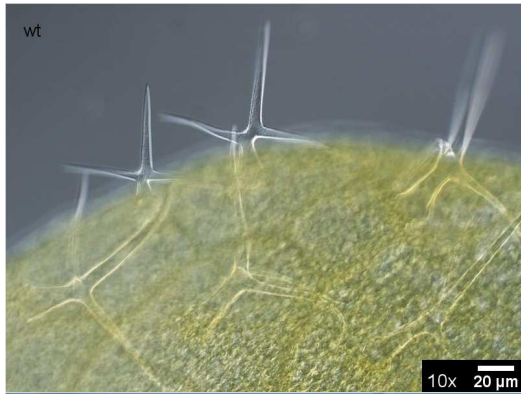
4.3.2. Fenotyp transgenních rostlin *Arabidopsis*

Dalším úkolem bylo nalézt jakékoliv změny fenotypu rostlin exprimujících β -tubulin nesoucí mutaci v NES sekvencích. Analyzovány byly 9-denní rostliny indukované po dobu 48 hodin a pro analýzu byly vybrány pouze rostliny s dobrou expresí transgenu. Před analýzou byly rostliny projasněny. Hodnoceny byly změny ve struktuře trichomů, tvar buněk hypokotylu, charakter kořenových vlásků a struktura apikálního meristému rostlin.

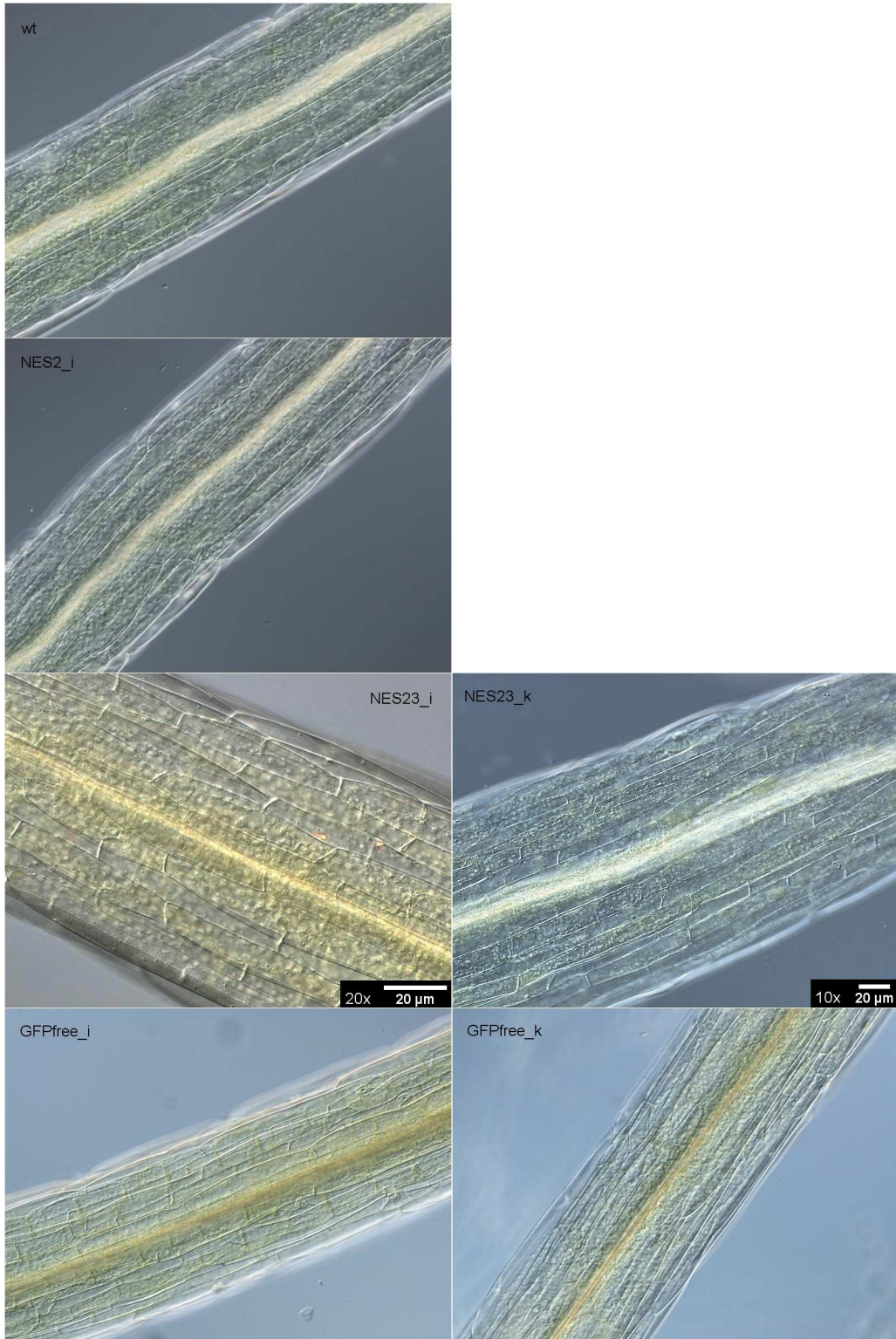
Nebyly zjištěny žádné strukturní odchylky v tvaru trichomů, hypokotylu, kořenových špiček a kořenových vlásků. V případě NES2 a kořenové špičky NES23 chybí příslušné struktury kontrolní neindukované rostliny, tudíž je objektivita výsledku snížena. Volné GFP použité v konstruktech β -tub, NES2, NES3 a NES23 zřejmě nemá na fenotyp rostlin žádný makroskopicky znatelný vliv.

Byla hodnocena šířka kořenů kořenů v místě počátku diferenciaci kořene (obr. 20). Během práce s rostlinným materiálem však došlo k výrazné ztrátě rostlinného materiálu a hodnoty uvedené v tabulce tedy nejsou statisticky hodnotitelné. Analýzu bude třeba zopakovat.

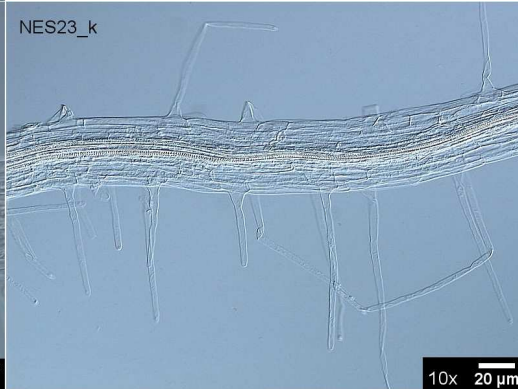
Trichomy:



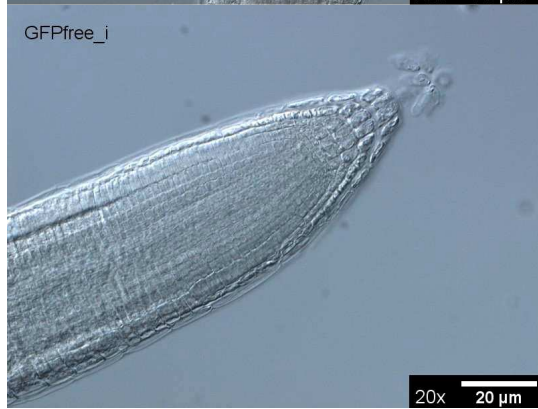
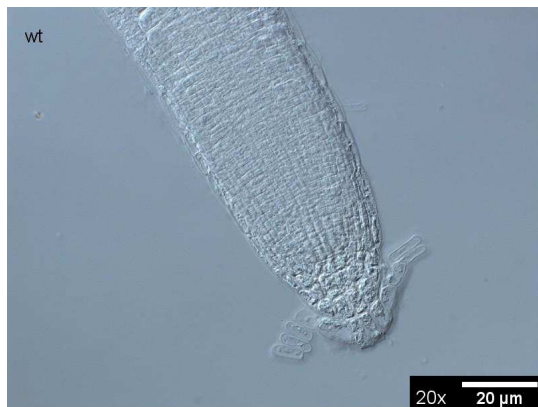
Hypokotyly:



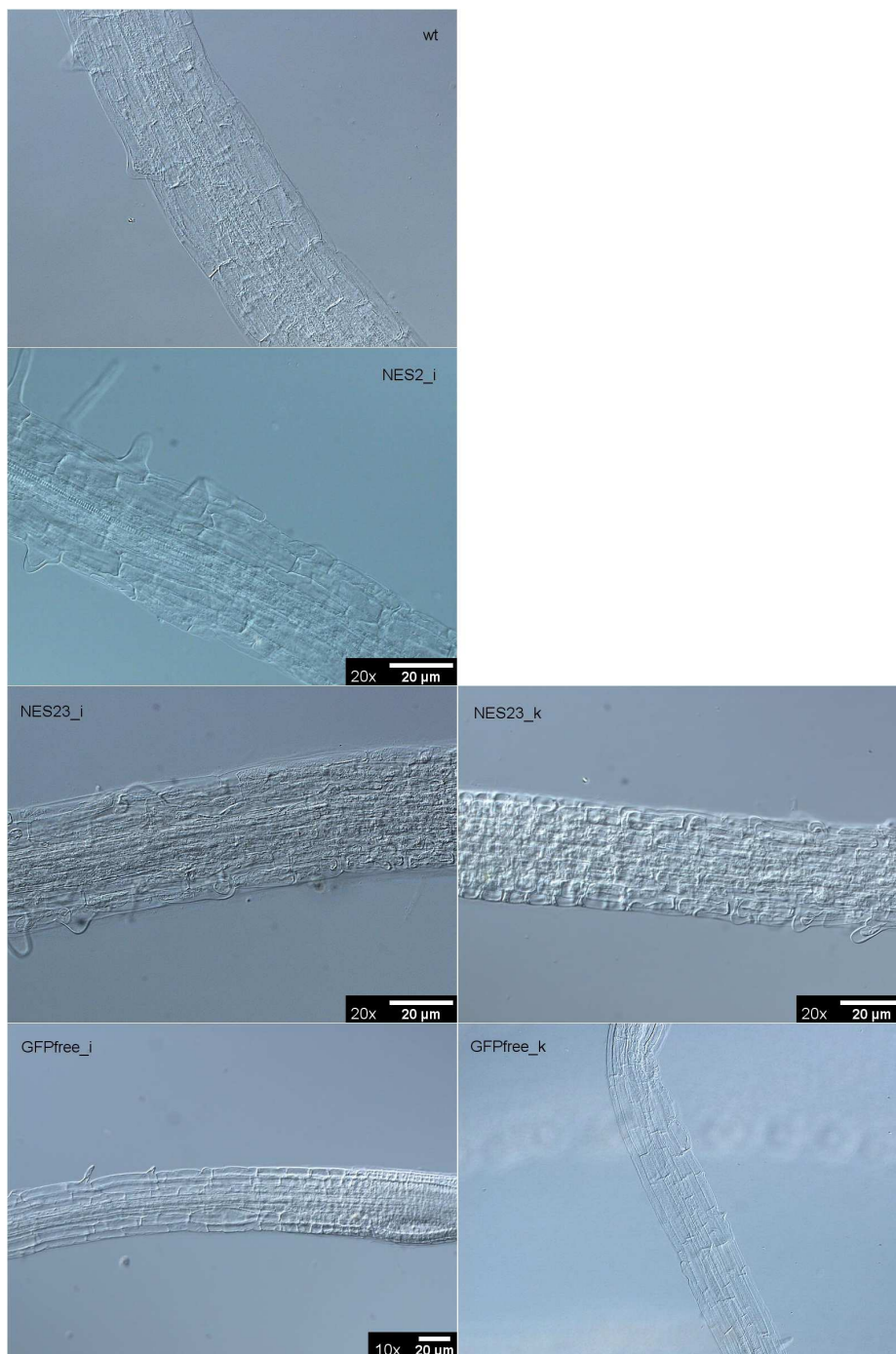
Kořenové vlásky:



Kořenové špičky:



Kořeny v místě počátku diferenciace kořenových vlásků:



Obr. 19: Trichomy, hypokotyly, kořenové vlásky, kořenové špičky a diferenciační zóny indukovaných a neindukovaných rostlin *Arabidopsis* NES2, NES23, GFPfree a wt.

Pro obrázky bez vyznačeného měřítka vždy platí měřítko 10x. Přípona _i značí indukovanou rostlinu, přípona _k značí kontrolní, neindukovanou rostlinu. U všech struktur NES2_i chybí kontrola.

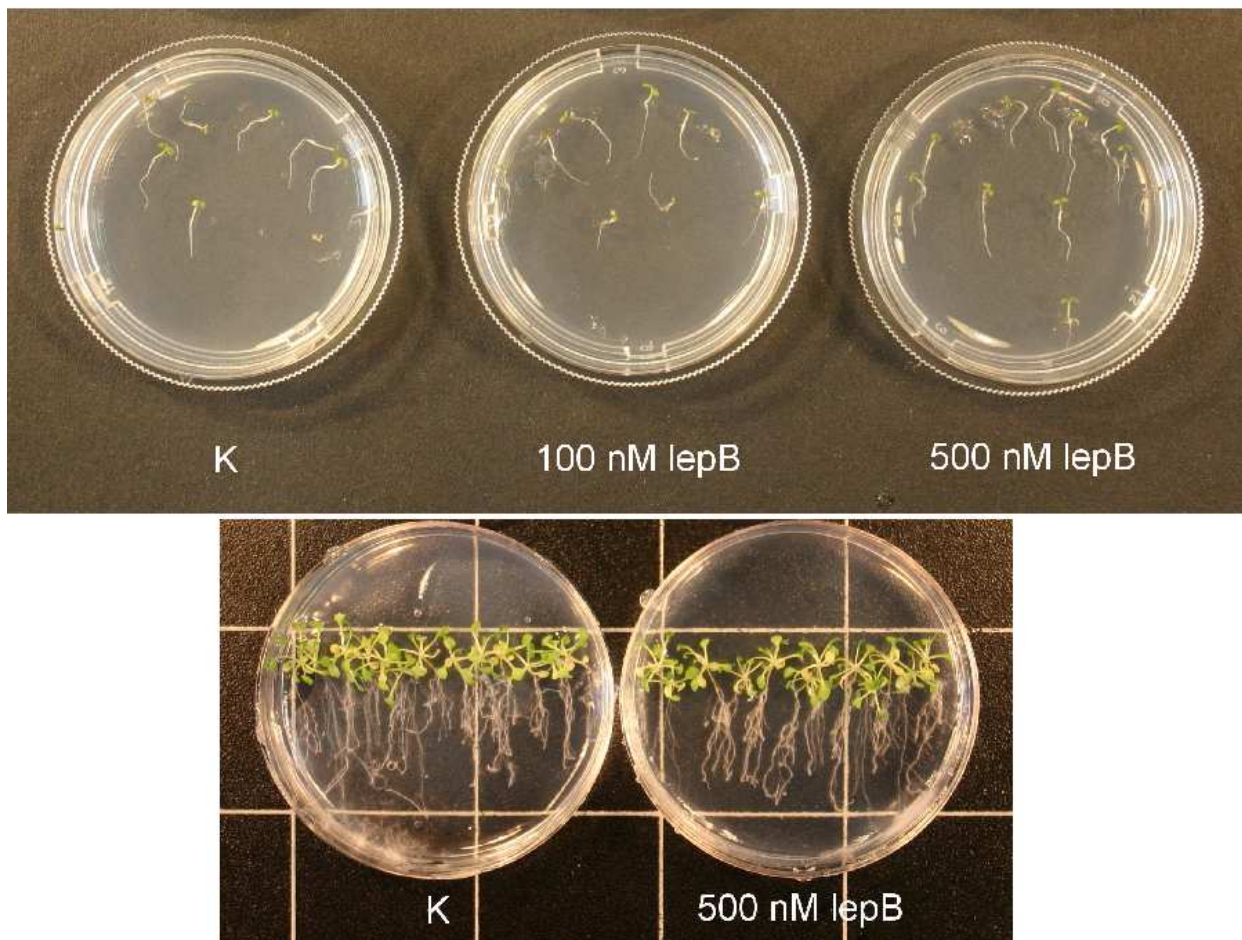
číslo rostliny	GFPfree_i	GFPfree_k	wt	NES2_i	NES23_i	NES23_k
1	123.1	121.3	123.2	111.4	150.2	102.5
2	107.9	144.0	121.1	125.3	126.1	
3	144.7		111.4	89.8	123.3	
4				71.1		
5				106.3		
6				138.3		

	Průměr	Std odch	Std chyba	Rozsah	Median
GFPfree_i	125.22	18.48	10.67	36.78	123.10
GFPfree_k	132.65	16.01	11.32	22.64	132.65
wt	118.54	6.27	3.62	11.75	121.05
NES2_i	107.04	24.17	9.87	67.26	108.87
NES23_i	133.22	14.75	8.52	26.84	126.14
NES23_k	102.46	-	-	-	-

Obr. 20: Šířka kořenů v místě počátku diferenciacce kořene transgenických a wt *Arabidopsis*.

4.3.3. Efekt leptomycinu B

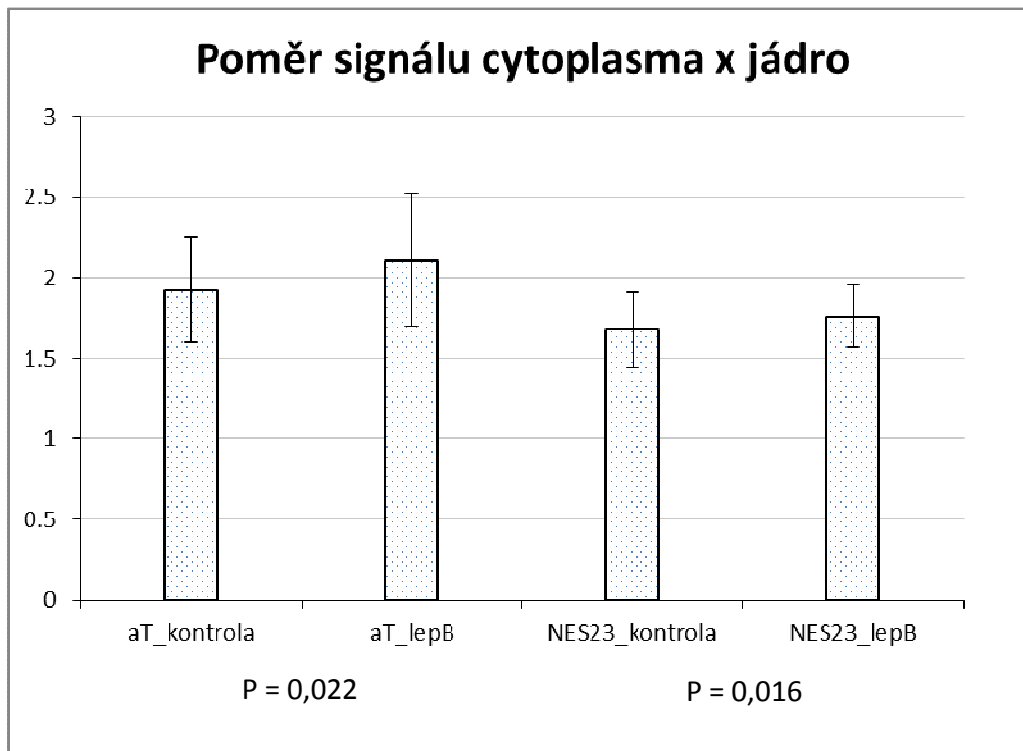
V této sérii pokusů jsem studoval makroskopicky a mikroskopicky znatelné odlišnosti rostlin *Arabidopsis* rostoucích na leptomycinu B oproti kontrole. Cílem experimentů bylo otestovat hypotézu, že tubulinové NES využívají k exportu z jádra nejčastější exportní cestu, tedy pomocí exportinu Crm1/Xpo1, jež je leptomycinem B kovalentně modifikován. V prvním pokusu jsem sledoval vývoj rostlin rostoucích 5 dní na 100 a 500 nM leptomycinu B. V druhém pokusu jsem rostliny exponoval 500 nM leptomycinu B po dobu 23 dní (oba pokusy viz obr. 21).



Obr. 21: Vliv leptomycinu B na *Arabidopsis thaliana* wt.

Rostliny v horním obrázku jsou 5 dní staré, expozice leptomycinu B po stejnou dobu; rostliny v dolním obrázku byly na 500 nM leptomycinu B kultivovány po dobu 23 dní. Je evidentní, že leptomycin B, i v 50-násobku koncentrace, která je letální pro živočišné buňky, nemá makroskopicky viditelný vliv na rostliny *Arabidopsis*.

Na mikroskopické úrovni jsem testoval vliv 5-denní expozice 100 nM leptomycinu B na kompartmentaci GFP- α -tubulinu (konstrukt pBIN19) a GFP-NES23- β -tubulinu *in vivo*. Porovnal jsem poměr fluorescenčního signálu v jádře ku signálu v cytoplasmě v buňkách kořenové špičky rostlin *Arabidopsis* ošetřených leptomycinem B a rostlin kontrolních. Postup analýzy je popsán v kapitole 3.2.16.



Obr. 22: Průměrná hodnota poměrů signálů v cytoplasmě a jádře sledovaných buněk.

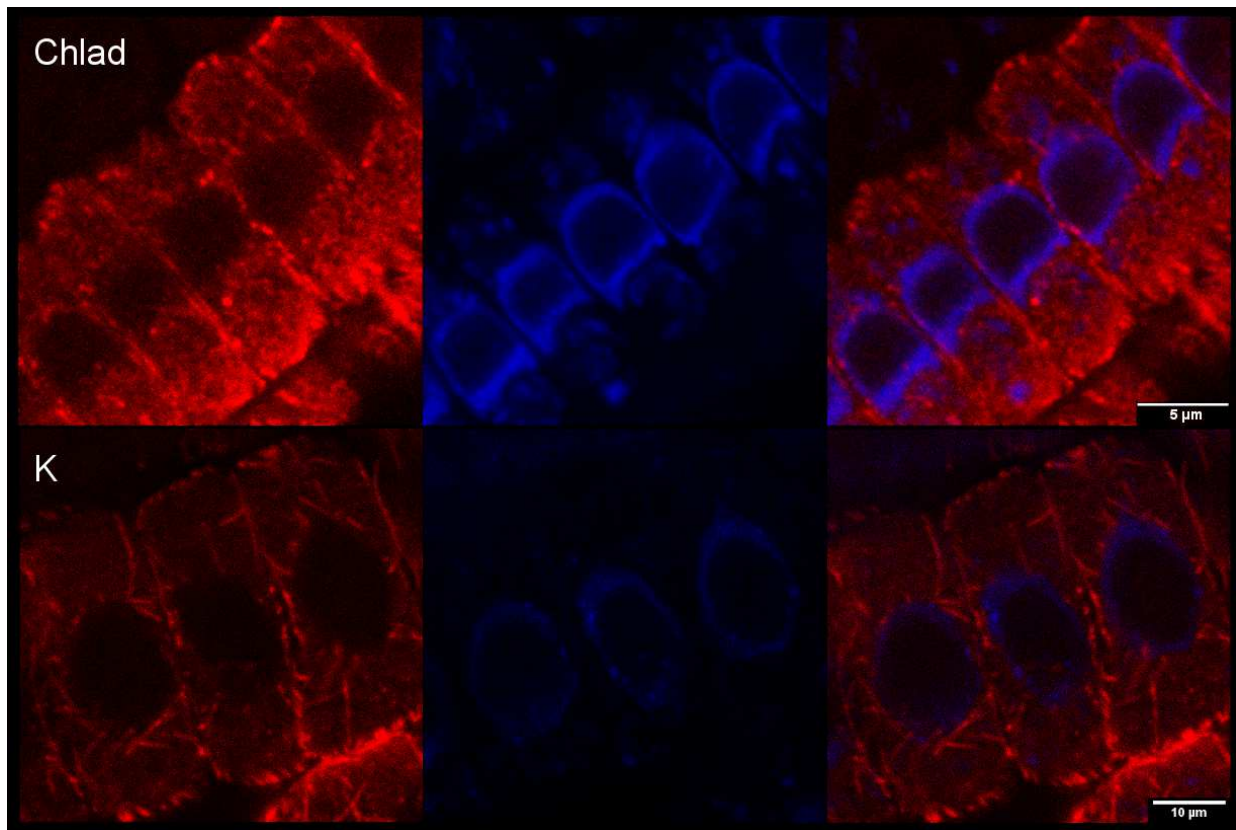
aT značí GFP- α -tubulin, NES23 je GFP-NES23- β -tubulin. Vzhledem k velikosti standardní odchylky hodnot lze obtížně s vyšší přesností hodnotit vliv drogy, avšak ke slabému zadržetí α -či β -tubulinu v jádrech kořenových buněk *Arabidopsis* ošetřených leptomycinem B dochází. Číslo P udává pravděpodobnost, že rozdíl je náhodný.

Výsledky nasvědčují tomu, že leptomycin B v koncentraci 100 a 500 nM neovlivňuje rychlost růstu, ani nezpůsobuje makroskopicky znatelné morfologické změny buněk kořenové špičky *Arabidopsis thaliana*. Leptomycin B však způsobuje retenci konstitutivně exprimovaného (ve vektoru odlišném k vektorům nesoucím mutované tubuliny) GFP- α -tubulinu či GFP-NES23-tubulinu v jádře, byť jen ve velmi slabé míře. Pravděpodobnost, že rozdíl množství tubulinu v leptomycinem ošetřených a kontrolních jádrech je dán pouze náhodou, je 2,2% (α -tubulin) a 1,6% (NES23), rozdíl je tedy statisticky významný.

4.3.4. Lokalizace tubulinu po chladovém stresu u rostlin *Arabidopsis thaliana* wt

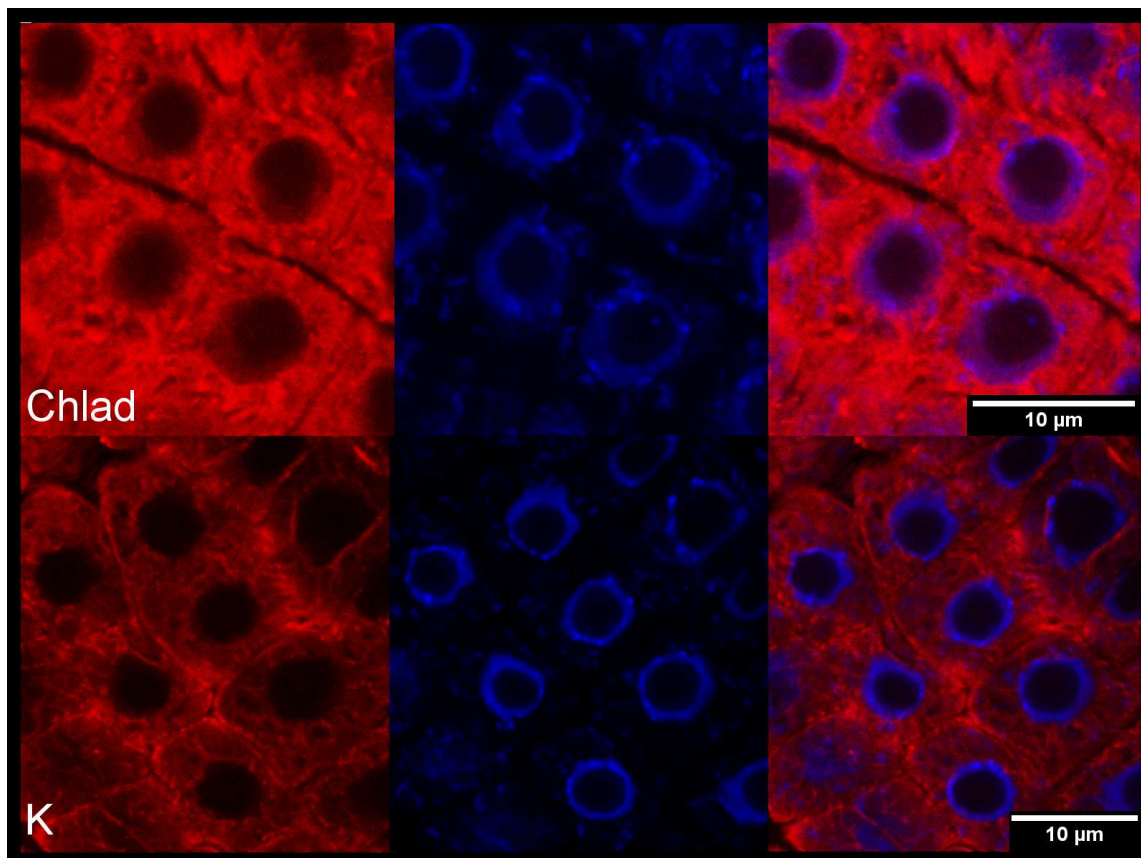
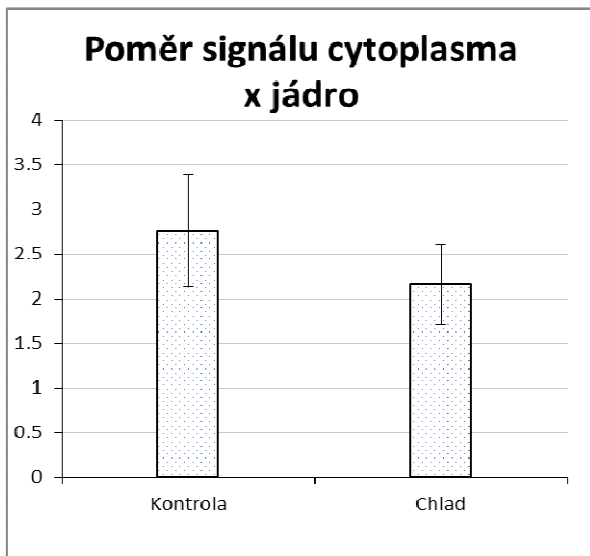
Jelikož předchozí experimenty prokázaly, že chlad způsobuje akumulaci tubulinu v jádře v buňkách tabáku (Schwarzerová et al. 2006), byl proveden pokus, kde rostliny wt rostliny *Arabidopsis thaliana* byly exponovány chladu. Tyto rostliny byly posléze fixovány a imunofluorescenčně označeny protilátkou proti α -tubulinu a byla studována akumulace tubulinu v jádrech buněk těchto rostlin. Byly provedeny pokusy s expozicí rostlin chladu po dobu 4,5, 6,5 h, 11,5 a 12 h a 16 h. Imunofluorescenční vizualizace byla uspokojivá v pokusu, kde expozice trvala 4,5 a 11,5 hodin.

Působením chladu na rostliny po dobu 4,5 h téměř nedocházelo k akumulaci tubulinu v jádrech (Obr. 23). Byla proto prodloužena doba působení na 11,5 h. Působením chladu na rostliny po dobu 11,5 h byla zaznamenána mírná akumulace tubulinu v jádrech buněk rostlin. Hodnotil jsem 66 buněk chladem ošetřených rostlin a 27 buněk kontrolních rostlin. Analýzu dokumentuje graf v obr. 24, ukázka buněk tamtéž.



Obr. 23: Buňky kořenové špičky *Arabidopsis thaliana* – chladem ošetřené buňky (Chlad, 0°C po dobu 4,5h) a buňky kontrolní (K).

Imunologicky označen α -tubulin (anti- α -tubulin primární protilátka) pomocí TRITC (červený kanál, vlevo) konjugovaným se sekundární protilátkou. Uprostřed fluorescence Hoechst 33258 (modrý kanál), vpravo oba kanály dohromady.



Obr. 24: Graf: Poměr průměrné hodnoty poměru signálu v jádře a cytoplasmě v chladem ošetřených buňkách kořene *Arabidopsis*.

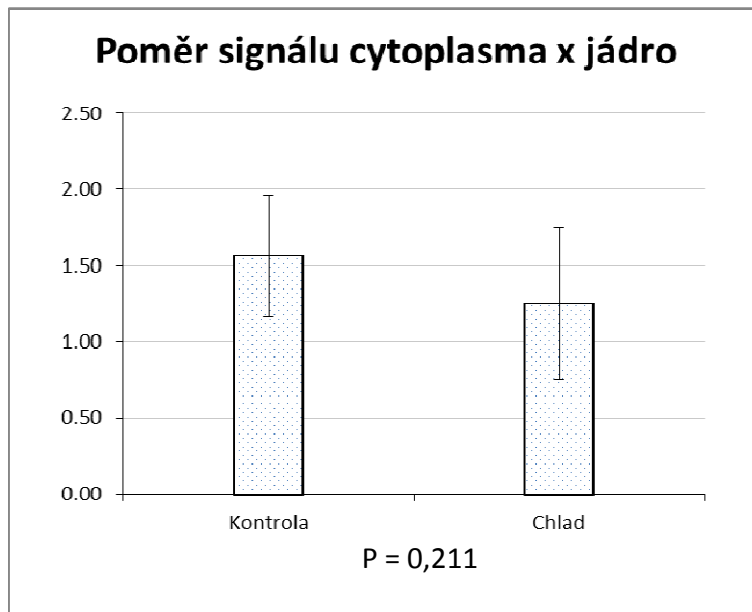
Obrázek: Buňky kořenové špičky *Arabidopsis thaliana* ošetřených 11,5h chladu 0°C a buňky kontrolní.

Imunologicky označen α -tubulin (anti- α -tubulin primární protilátka, červeně) pomocí TRITC (vlevo) konjugovaným se sekundární protilátkou. Uprostřed fluorescence Hoechst 33258 (jádra, modře), vpravo oba kanály dohromady.

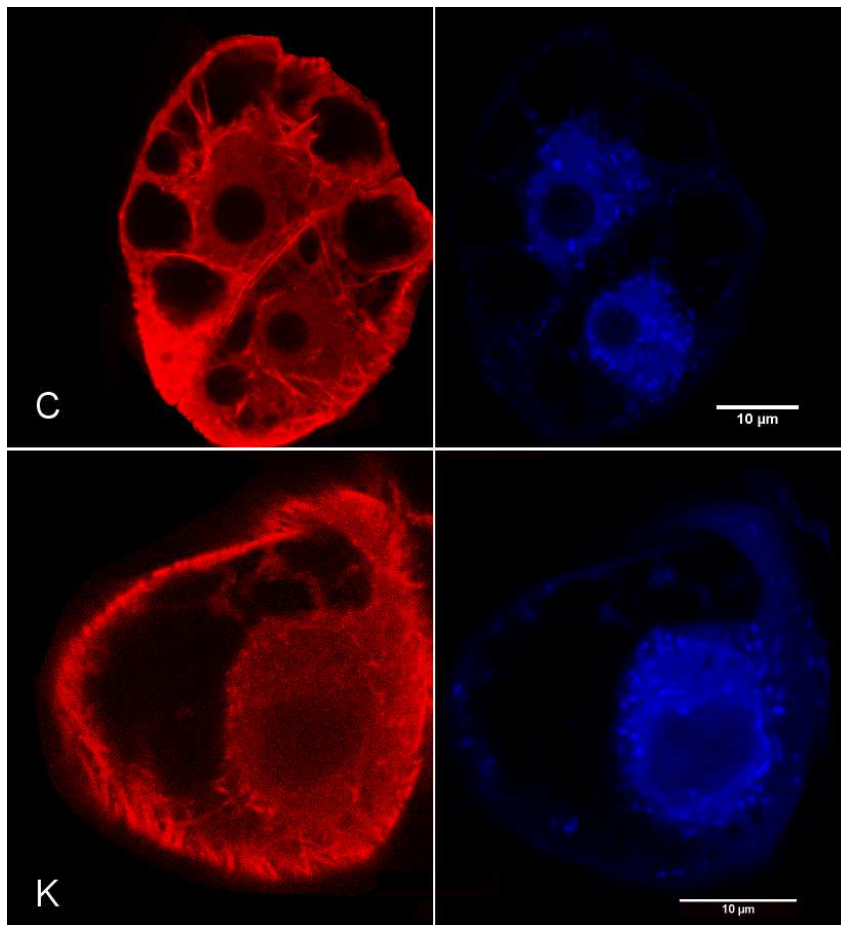
4.3.5. Lokalizace tubulinu po chladovém stresu u suspenzních buněk *Arabidopsis thaliana* wt

Protože působením chladu na rostliny *Arabidopsis* bylo dosaženo pouze mírné akumulace tubulinu v jádře, zjišťoval jsem dále, zda akumulace tubulinu v jádře vlivem chladu nebude významnější v izolovaných buňkách *Arabidopsis thaliana*, jelikož by jaderná akumulace tubulinu mohla být jevem přítomným pouze v izolovaných suspenzních buňkách. Během imunofluorescenční vizualizace tubulinu v suspenzních buňkách došlo k poškození rostlinného materiálu do té míry, že hodnoceno mohlo být jen 8 chladem ošetřených a 7 kontrolních buněk, u kterých bylo možno s vyšší přesností porovnat TRITC signál v jádrech a cytoplasmě (Obr. 26).

Hodnocen byl poměr signálu mezi cytoplazmou a nukleoplazmou. Je vidět mírná akumulace signálu v jádrech chladem ošetřených buněk, naměřené hodnoty však neumožňují vyloučit možnost, že rozdíl mezi chlazenými a kontrolními jádry je dán pouze náhodou. Výsledek není statisticky významný (pravděpodobnost, že se množství tubulinu v jádrech neliší, je 21,1%).



Obr. 25: Průměrná hodnota poměrů signálů v cytoplasmě a jádře sledovaných buněk. Číslo P udává pravděpodobnost, že rozdíl je náhodný.



Obr. 26: **Suspenzní buňky *Arabidopsis thaliana* ošetřené 8h chladu 0°C (C) a buňky kontrolní (K).**

Imunologicky označen α -tubulin (anti- α -tubulin primární protilátka) pomocí TRITC (červený kanál, vlevo) konjugovaným se sekundární protilátkou. Vpravo fluorescence Hoechst 33258 (modrý kanál).

5. DISKUSE

Cílem mé práce bylo objasnit roli transportu tubulinu mezi jádrem a cytoplasmou. Dříve zmíněné práce a dobře známá funkce tubulinu v mitose jasně ukazují, že tubulin je v úzkém vztahu s jádrem, právě kvůli segregaci genetického materiálu do dceřiných jader. Naše skupina však ukázala, že v buňkách *Nicotiana tabacum* BY-2 vztah tubulinu k jádře není vázán pouze na mitosu, ale i na stresové děje během interfáze, konkrétně chlad 0°C. Pozorování rychlé exkluze tubulinu ze zo tavených chlazených jader buněk BY-2 bylo inspirací pro prozkoumání molekul α - a β - tubulinu, přičemž bylo odhaleno několik jaderných exporních sekvencí (NES) v těchto proteinech (Schwarzerová et al., 2006). Existence těchto sekvencí a potvrzení jejich exportní aktivity blíže podporuje představu, že transport tubulinu mezi jádrem a cytoplasmou musí být striktně regulován.

Pro objasnění vztahu tubulinu k jádru jsem otestoval tubulinové NES ve fúzi s GFP i v savčích buňkách, abych ověřil, zda pozorované jevy nejsou pouze výsadou říše *Plantae*. V celých rostlinách *Arabidopsis* jsem pak sledoval vliv poškození schopnosti β -tubulinu být exportován z jádra, což je pro dosažení hlavního cíle velmi cenná informace. Pro případ, že by zrušení funkce NES bylo letální, byl použit 17- β -estradiolem inducibilní promotor XVE ve vektoru pER8, který by umožnil v případě velkého poškození rostlin expresí mutovaného tubulinu pozorovat první expresi mutovaných tubulinů až ve vzrostlých rostlinách. V práci jsou použity β -tubuliny se zrušenými NES2 a NES3, jelikož u těchto NES byla v rostlinných buňkách potvrzena exportní aktivita; NES1 exportní aktivitu v rostlinných buňkách neprokázala.

5.1. Studium funkce NES v živočišných buňkách

Testy exprese GFPNES v buňkách HeLa provázely zásadní problém – v konstruktech β NES2, β NES3, α NES1, Δ α NES1, Δ β NES2, Δ β NES3 a Δ α NES1 byla použita varianta GFP smrsGFP, která, jak se ukázalo, je pro buňky HeLa toxická. Kontrolní buňky byly ve většině experimentů v pořádku, tudíž je vyloučeno, že šlo o špatně provedenou transfekci či nevhodné kultivační podmínky. Konstrukt Δ α NES1, v kterém byla použita GFP varianta mGFP5 (viz výše), byl pro buňky méně

škodlivý, četnost transfekce byla vyšší a buňky byly často v dobré kondici, jako buňky kontrolní. Zároveň u těchto buněk nebyl viditelný export z jádra, což naznačuje, že živočišně specifická zoo α NES1 nesoucí mutaci v savčích buňkách není aktivní. Protože však chybí srovnání s nemutovanou verzí zoo α NES1, nelze v tuto chvíli usuzovat na aktivitu nemutované verze. Je samozřejmě nutné provést test znovu s verzí GFP vhodnou pro expresi v živočišných buňkách a taktéž provést mutační analýzu všech NES a testovat lokalizaci takového proteinu v buňkách, tedy způsobem, kterým jsem postupoval u mutovaných NES v buňkách BY-2 a celých rostlinách (4.2., 4.3.).

Akoumianaki et al., 2009 ukázali, že β -tubulinová NES1 je aktivní v savčích buňkách HeLa, respektive že její zrušení způsobuje retenci tubulinu v jádře. Tento funkční rozdíl (v naší zmiňované publikaci byla tato NES1 v rostlinných buňkách neaktivní) může být způsoben jak částečně odlišnými proteiny účastnícími se nukleocytoplasmatického transportu, tak částečně odlišnými sekvencemi β -tubulinu, a především odlišnou stavbou jaderných pórů v rostlinných a savčích buňkách (Meier a Brkjalac, 2009). Ve zmiňované publikaci (Akoumianaki et al., 2009) však autoři neprováděli klasický jaderný exportní test, pouze konstatovali akumulaci tubulinu nesoucího mutaci v daném místě. Nelze tedy vyloučit, že mutace proteinu silně konzervované struktury, jako je tubulin, mohla vést k jeho akumulaci v jádře nepřímo skrze jiné poškození buňky, nezávisle na přímé interakci tohoto NES s jaderným transportním systémem.

5.2. Studium exprese WT a mutovaných tubulinů v buňkách BY-2

5.2.1. Mitotický index po indukci

V případě kultury NES2 je pravděpodobné, že mutace tubulinu v NES2 nemá na průběh buněčného cyklu vliv. Je však nutno vzít v potaz, že obě kultury NES2, indukovaná i kontrolní, se v porovnání s ostatními variantami pomalu dělily (viz výše, MI v obr. 14).

Po indukci exprese NES3 došlo k počátečnímu zvýšení a následnému snížení mitotického indexu. U kultury NES23 je znatelné mírné zvýšení mitotického indexu. Protože tento výsledek byl zjištěn opakovaně i dalšími členy týmu, lze tento efekt

považovat za významný. Bude třeba dále testovat, co je příčinou zvýšení MI u buněk exprimujících GFP-AtTUB6 Δ NES23. V úvahu přicházejí dva scénáře: Buď buňky procházejí mitózou pomaleji, což způsobuje akumulaci buněk v mitóze v kultuře, nebo exprese transgenů urychluje průběh buněčným cyklem, proto v daném čase lze pozorovat více buněk v mitóze. Tyto dvě hypotézy bude možné testovat pomocí synchronizace buněčné kultury a tedy porovnáním délky buněčného cyklu u buněk s indukovanou expresí a bez ní.

5.3. Studium exprese WT a mutovaných tubulinů v *Arabidopsis thaliana*

5.3.1. Lokalizace GFP-tubulinů v buňkách po indukci

Při sledování kompartmentace mutovaných tubulinů jsem se soustředil především na dvě místa výskytu GFP signálu – lokalizace vzhledem k jádře a inkorporace do mikrotubulů. Schopnost mutovaných tubulinů inkorporovat se do mikrotubulů lze do jisté míry považovat za měřítko toho, do jaké míry se daný tubulin odlišuje od svého wt protějšku. Čím více je molekula odlišnější od wt, tím více lze očekávat nefyziologické jevy, které jsou dány pouze skutečností, že je molekula proteinu pozměněna. Tyto jevy mohou být způsobeny zcela novými epitopy pozměněného proteinu, které mohou interagovat se strukturami, s kterými wt protein nikdy neinteraguje. Spíše lze však očekávat u vysoce konzervovaného proteinu, jakým je tubulin, ztrátu jeho schopnosti polymerovat v mikrotubulus, a interagovat s dalšími proteiny.

In vivo je inkorporace mutovaných tubulinů do mikrotubulů viditelná pouze u varianty β -tub a z menší části u NES2; u NES3 a NES23 není inkorporace zřetelná vůbec. Jelikož není pozorováním *in vivo* vyloučeno, že lokalizace tubulinů v mikrotubulech je maskována velkým množstvím monomerního tubulinu v cytoplasmě, u rostlin všech variant jsem označil mikrotubulární cytoskelet protilátkou konjugovanou s fluoroforem TRITC a sledoval kolokalizaci. Barvení zároveň redukuje množství monomerního tubulinu v cytoplasmě, tudíž případná kolokalizace mutovaných tubulinů s mikrotubuly by měla být patrnější. Výsledky však ukázaly, že k stabilní inkorporaci do mikrotubulů dochází skutečně pouze u varianty wt β -tub a zčásti u NES2. Mutace NES3 a dvojitá mutace NES23 tedy zřejmě mění topologii molekuly β -tubulinu natolik, že se

nemůže inkorporovat do mikrotubulů. Druhým vysvětlením tohoto jevu může být, že tubuliny NES3 a NES23 se sice do mikrotubulů mohou inkorporovat, ale se sníženou afinitou, tudíž je do mikrotubulů včleňován především wt tubulin. Přítomnost GFP C-terminálně fúzovaného s tubulinem inkorporaci proteinu do mikrotubulů nebrání, jak lze vidět u mikrofotografií indukovaných variant β -tub a NES2.

Pozoruhodným výsledkem je lokalizace mutovaných tubulinů vzhledem k jádře. Tubuliny NES2, NES3 a NES23 nejsou v jádrech buněk kořenové špičky výrazně zadržovány. Konstrukt NES23 je v jádrech však přítomen ve větší míře, než nemutovaný α -tubulin (viz obr. 22, str. 61). Jako kontrola nemohl být použit nemutovaný β -tubulin, jelikož nebyl k dispozici dostatek dobře exprimujících rostlin. Skutečnost, že nedochází k výraznějšímu zadržení tubulinů s mutovanými NES v jádře, lze vysvětlit několika způsoby. První možností je, že mutace NES způsobuje takovou změnu tvaru molekuly, že je NES maskován a není přístupný exportním faktorům. Tato možnost je pravděpodobnější u NES3 a NES23, které se obtížně inkorporují do mikrotubulů, avšak není ani u NES2 vyloučena. Druhou možností je, že abnormální topologie mutovaných tubulinů znemožňuje vazbu exportních faktorů na NES. Třetí, a zřejmě nejpravděpodobnější možností je skutečnost, že β -tubulin tvoří heterodimery s α -tubulinem, přičemž NES přítomný v α -tubulinu, jehož aktivita byla v našich předchozích experimentech dokázána (viz obr. 6), může být dostačující pro export heterodimeru wt α -tubulin/mutovaný β -tubulin z jádra. Avšak zároveň je nutno vzít v potaz pravděpodobnost, že mutace NES3 a NES23 způsobují tak dramatickou změnu molekuly, že proteiny nejsou vůbec schopny vytvořit heterodimer s α -tubulinem. Taková skutečnost by mohla mít i zcela zásadní vliv nejen na schopnost včlenit se do mikrotubulu, ale i import proteinu do jádra, jelikož samotný β -tubulinový monomer by mohl být schopen importu do jádra difuzí přes jaderný pór, bez nutnosti interakce s dodatečnými importními faktory.

5.3.2. Fenotyp transgenních rostlin exprimujících β -tubulinu mutované v NES sekvencích

Abnormální morfologie apikálního meristému kořene by mohla indikovat vliv mutovaných tubulinů na buněčný cyklus, buď přes možnou signální funkci tubulinu v jádře, přes kinetochor, mitotické vřetenko či změněnou dynamiku mikrotubulů v interfázi. V případě destabilizace mikrotubulárního cytoskeletu jsem očekával například stáčení buněk hypokotylu jako v případě mutace LEFTY, kde je také cytoskelet destabilizován (Abe et al., 2004), dále odlišnou morfologii průduchových buněk, trichomů a kořenových vlásků, nebo jinou tloušťku kořene způsobenou aberantním longitudálním růstem buněk, daným především pozměněným uspořádáním kortikálního mikrotubulárního cytoskeletu.

Je nutno vzít v potaz, že veškeré vlivy mutovaných β -tubulinů se odehrávaly na pozadí velkého množství endogenních tubulinů. Z analýzy fenotypu vyplývá, že mutace NES2 a NES23 β -tubulinu pravděpodobně nemají vis-mikroskopii pozorovatelný vliv na charakter trichomů, hypokotylu a kořenové špičky. Také nedochází například ke kroucení kořenových vlásků, avšak redukci délky vlásků po indukci exprese mutovaných tubulinů NES2 a NES23 nelze vyloučit. S malou pravděpodobností lze vyvodit, že přítomnost β -tubulinu s mutovanou NES2 má za příčinu tvorbu kořenů s menší šířkou. Analýzu je však vzhledem k malému množství rostlinného materiálu nutno opakovat. Volné GFP použité v konstruktech β -tub, NES2, NES3 a NES23 zřejmě nemá na fenotyp rostlin žádný makroskopicky znatelný vliv. Tato skutečnost redukuje možnost, že by případné aberace rostlin exprimujících mutovaný tubulin byly způsobeny toxicitou či signalizační funkcí použitého GFP.

5.3.3. Lokalizace tubulinu po chladovém stresu u *Arabidopsis thaliana* wt

Cílem těchto experimentů bylo zjistit, zda se v kontextu celé rostliny po chladovém stresu lokalizace tubulinu vzhledem k jádru změní, podobně jako u suspenzních buněk BY-2 v uvedené publikaci naší skupiny, kde byla ukázána akumulace tubulinu v interfázových jádrech. V případě akumulace tubulinu v jádře

vlivem chladu by pak bylo možno testovat vliv mutace v jednotlivých NES na export tubulinu zpět do jádra během zotavení z chladového působení, jak bylo popsáno ve Schwarzerová et al., 2006. V mých chladových experimentech s rostlinami *Arabidopsis* jsem sice zaznamenal slabou akumulaci tubulinu v jádrech buněk kořenové špičky ošetřené 11,5h teploty 0°C, avšak v mnohem menší míře, než v případě zmiňované publikace.

Vysvětlení odlišnosti výsledku je několik; prvním vysvětlením může být skutečnost, že suspenzní buňky izolované od kontextu celého organismu mohou být mnohem náchylnější ke chladovému stresu, než kdyby byly součástí uceleného orgánu, respektive rostliny. Druhým vysvětlením je fakt, že *Arabidopsis thaliana*, na které jsem experiment provedl, je rostlina mírného pásu, která běžně roste na jaře v nízkých teplotách, i v arktických oblastech, a je relativně odolná vůči chladu (Zhen a Ungerer, 2008). Oproti *Arabidopsis*, *Nicotiana tabacum* je rostlina subtropická; při vystavení *in vitro* kultivovaných buněk tabáku, izolovaných od celého organismu, zcela nepřírodným teplotám bodu mrazu, tedy lze očekávat nefyziologické jevy. Nicméně, je nutno zmínit, že samostatné buňky BY-2 v experimentu teplotní stres přežily a byly schopny tubulin z jader exportovat zpět do cytoplasmy a rekonstruovat mikrotubulární cytoskelet. Je potřeba prozkoumat jadernou lokalizaci tubulinu v buňkách kořenů tabáku vystaveného nízkým teplotám.

K akumulaci tubulinu v jádrech buněk kořenové špičky rostlin *Arabidopsis* ošetřených chladem dochází (jádra buněk chladem ošetřených rostlin obsahovala průměrně o 22% více signálu, než jádra buněk rostlin kontrolních), a je otázkou, z jakého důvodu tento jev existuje a jakým způsobem se tubulin dostane do jádra, jelikož neobsahuje jadernou lokalizační sekvenci (NLS).

Způsob, jakým se tubulin importuje do jádra, není znám. Nabízí se představa, že chladem dochází k poškození jaderné obálky, jelikož biologické membrány jsou poškozovány chladem (Kacperska, 1999). Tubulin jistě také může do jádra být transportován jako interaktor při transportu jiné molekuly, která NLS obsahuje (např. v interakci s proteinem NFAT, Ishiguro et al., 2011), nebo jiným, neznámým, NLS-nezávislým způsobem.

5.3.4. Efekt leptomycinu B

Leptomycin B byl použit jako nástroj pro otestování hypotézy, že tubulin, respektive jeho NES, používá obecnou Crm1/Xpo1 exportní cestu.

Ve výsledku testu leptomycinu B v suspenzních buňkách BY-2 není vzhledem k velikosti standardní odchylky počtu buněk vyloučeno, že už 10 nM koncentrace leptomycinu B má na buňky BY-2 značný vliv. V dalších experimentech byla však použita 10-násobná koncentrace drogy, která prokázala jasný dopad na buněčný cyklus.

Výsledek aplikace leptomycinu B na juvenilní rostliny *Arabidopsis* je velmi překvapující; nejen že semena bez problému klíčí, ale není znatelný rozdíl oproti kontrolním rostlinám, a to ani v koncentraci drogy 500 nM, tj. v 5-krát větší koncentraci, než v té, která spolehlivě zastavuje množení suspenzních buněk BY-2.

Leptomycin B ochromuje nejčastější exportní cestu, tedy exportin Crm1/Xpo1, kovalentní modifikací cysteinu 529 v centrální konzervované doméně tohoto proteinu v *Schizosaccharomyces pombe* (Kudo et al., 1999). Vzhledem ke skutečnosti, že jaderný transport je zcela základním procesem společným pro všechny eukaryotní buňky, lze se domnívat, že *Arabidopsis* nemá natolik odlišnou architekturu nukleocytoplasmatického transportu (například odlišný exportin Crm1/Xpo1), že by byla z tohoto důvodu resistantní k leptomycinu B. Pro ilustraci, aminokyselinové sekvence exportinu Crm1/Xpo1 *Arabidopsis thaliana* a *Glycine max* jsou z 85% identické, z 92% obsahují alespoň podobný typ aminokyseliny. Sekvence Crm1/Xpo1 *Nicotiana tabacum* není známa. Sekvence Crm1/Xpo1 *Arabidopsis thaliana* a *Homo sapiens* (buňky HeLa) jsou z 49% identické, z 68% obsahují alespoň podobný typ aminokyseliny. Sekvence Crm1/Xpo1 *Schizosaccharomyces pombe*, *Homo sapiens* a *Arabidopsis thaliana* jsou identické jak v Cys529, tak ve dvou přilehlých aminokyselinách (motiv Leu-Cys-Glu). Je tedy možno vyvodit, že vzhledem k vysoké evoluční konzervovanosti exportinu Crm1/Xpo1 a k účinku jak na buňky *Homo sapiens*, tak na buňky *Nicotiana tabacum*, leptomycin B účinkuje i na buňky *Arabidopsis*, avšak tento účinek je neutralizován. Inhibiční účinek leptomycinu B na jaderný export v rostlinách *Arabidopsis*, byť při kratších dobách expozice, byl již několikrát prokázán (Tillemans et al., 2006; Vos et al., 2008; Tam et al., 2010).

Proto se přikláním k hypotéze, že leptomycin B je v buňkách *Arabidopsis* neznámým způsobem vychytáván a například izolován ve vakuole jako xenobiotikum, či je z buněk vylučován. Je známo, že rostliny jsou schopné metabolizovat mnoho druhů xenobiotik (Sandermann et al., 1992). Příkladem takové resistance k leptomycinu B může být protein houby *Magnaporthe grisea*, *pmd1*, který patří do rodiny ABC transporterů typu B (Dean et al., 2005), kterých je genomem *Arabidopsis* kódováno 28 (Kang et al., 2011). Droga také může mít afinitu k nějakému proteinu, který je přítomen v *Arabidopsis*, nikoliv však v *Nicotiana tabacum*, přičemž je schopnost leptomycinu B interagovat se strukturami nukleocytoplasmatického transportu neutralizována.

Na základě předchozí myšlenky lze obtížně interpretovat výsledek aplikace leptomycinu B v koncentraci 100 nM na rostliny exprimující NES23 tubulin a α -tubulin. Vzhledem k možnosti, že je efekt leptomycinu B nějakým způsobem v buňkách *Arabidopsis* neutralizován, nelze z nevýrazného efektu leptomycinu B na tyto rostliny usoudit, že NES2 a NES3 exportují tubulin z jader přes obecnou Crm1/Xpo1 exportní cestu.

5.5. Monomer či heterodimer?

Do úvah o vlivu mutovaných tubulinů na buňky a celé rostliny *Arabidopsis* je nutno započít i samotný fakt, že v buňkách docházelo k cizí expresi β -tubulinu, bez ohledu na mutace v NES. V přirozených podmínkách je v cytoplasmě přesně vyvážené množství α - a β -tubulinu, a množství proteinu je přísně regulováno. Je známo, že v případě zvýšení koncentrace tubulinových heterodimerů v cytoplasmě např. vlivem působení MT-destabilizující drogy oryzalinu dochází k okamžité odezvě v podobě snížení syntézy α - i β -tubulinu na proteinové úrovni (Giani et al., 2002). Protože dochází ke snížení koncentrace obou podjednotek, existuje pravděpodobně velmi přísná vzájemná kontrola množství obou proteinů v buňce. Vskutku je známo z pokusů s expresí transgenního α - nebo β -tubulinu, že rostliny netolerují nepoměr mezi množstvím α - a β -tubulinu v cytoplasmě (Anthony a Hussey, 1998). Je tedy velmi pravděpodobné, že exprese transgenního tubulinu v rostlinách je doprovázena adekvátním zvýšením exprese endogenního α -tubulinu, či snížením exprese endogenního β -tubulinu tak, aby

poměr mezi oběma podjednotkami zůstal stejný. Pozorovaný GFP- β -tubulin v mých pokusech tedy pravděpodobně byl ve formě heterodimeru. Tuto hypotézu je však samozřejmě nutno ověřit pomocí stanovení obsahu endogenního α - a β -tubulinu v cytoplazmě transgenních rostlin.

6. ZÁVĚR

1. Testoval jsem expresi fúzních proteinů smrsGFP s β -tubulinovými jadernými exportními sekvencemi β NES2, β NES3, rst α NES1, zoo α NES1, Δ β NES2, Δ β NES3 a Δ rst α NES1 a mGFP5- Δ zoo α NES1 v lidských buňkách HeLa. Ukázal jsem, že exprese chromoforu smrsGFP je těmito buňkami špatně snášena. Protein mGFP5 v konstruktu Δ zoo α NES1 byl buňkami snášen lépe, než smrsGFP. Pokusy je nutno opakovat s vhodnou verzí GFP.

2. Otestoval jsem vliv exprese β -tubulinu AtTUB6 mutovaného v NES2, NES3 a obou NES zároveň na mitotický index suspenzních buněk kalusu *Nicotiana tabacum* BY-2. Exprese β -tubulinu a β -tubulinu s mutovanou NES2 pravděpodobně nemá na mitotický index těchto buněk vliv. Exprese β -tubulinu s mutovanou NES3 způsobila počáteční zvýšení a následné snížení mitotického indexu. Exprese β -tubulinu s mutovanou NES23 způsobila zvýšení mitotického indexu a exprese tohoto vektoru tedy zřejmě ovlivnila průběh buněčného cyklu.

3. V případě β -tubulinů s uvedenými mutacemi v NES3 a NES23 vůbec nedochází v buňkách kořenové špičky *Arabidopsis thaliana* k inkorporaci tohoto proteinu do mikrotubulů. β -tubulin s mutací v NES2 se do mikrotubulů z malé části inkorporuje. Mutace v NES3 a NES23 tedy topologii molekuly β -tubulinu mění natolik, že tato může být značně nefyziologická.

Výrazná akumulace tubulinu v jádře u jmenovaných variant nebyla pozorována, avšak varianta NES23 obsahuje v jádrech vyšší množství tubulinu, než varianta exprimující α -tubulin. Je tedy možné, že mutace obou NES2 a NES3 zároveň způsobuje slabou retenci tubulinu v jádrech. Vzhledem k malému množství rostlin uspokojivě exprimujících nemutovanou variantu β -tubulinu nemohly jmenované varianty být porovnány s β -tubulinem.

4. Provedl jsem analýzu fenotypu výše transgenních rostlin exprimujících mutovaný β -tubulin. Mutace NES2 a NES23 β -tubulinu pravděpodobně nemají vis-mikroskopií pozorovatelný vliv na charakter trichomů, hypokotylu a kořenové špičky. Taktéž nedochází ke kroucení kořenových vlásků, avšak redukce délky vlásků po indukci exprese mutovaných tubulinů NES2 a NES23 není vyloučena. Vzhledem k velké ztrátě materiálu během přípravy rostlin bude třeba výsledek potvrdit opakováním experimentu.

5. Působení chladu 0°C způsobovalo slabou akumulaci endogenního tubulinu v jádrech kořenů rostlin i kultivovaných buněk *Arabidopsis thaliana*. Tento výsledek tedy nepotvrdil hypotézu, že masivní akumulace tubulinu v jádrech je obecnou reakcí rostlin na chlad.

6. Aplikace leptomycinu B, inhibitoru exportinu Crm1/Xpo1, způsobuje zástavu dělení suspenzních buněk tabáku BY-2, avšak nemá zřejmý vliv na růst rostlin *Arabidopsis thaliana* po dobu 23 dní. Leptomycin B způsobuje pouze slabou retenci β -tubulinu nesoucího mutace v pozici NES2 a NES3 v jádře.

7. ODKAZY

(1.) Abe T, Thitamadee S, Hashimoto T (2004) Microtubule defects and cell morphogenesis in the lefty1lefty2 tubulin mutant of Arabidopsis thaliana. Plant Cell Physiol. 2004 Feb;45(2):211-20.

Allen NPC, Huang L, Burlingame A, Rexach M (2001) Proteomic analysis of nucleoporin interacting proteins. J Biol Chem 276(31): 29268-29274.

Akoumianaki T, Kardassis D, Polioudaki H, Georgatos SD, Theodoropoulos PA (2009) Nucleocytoplasmic shuttling of soluble tubulin in mammalian cells. J Cell Sci. 2009 Apr 15;122(Pt 8):1111-8.

Ambrose JC, Cyr R (2008) Mitotic spindle organization by the preprophase band. Mol Plant. 2008 Nov;1(6):950-60.

An G (1985) High efficiency transformation of cultured tobacco cells. Plant Physiol 79:568–570.

Anthony RG, Hussey PJ (1998) Suppression of endogenous alpha and beta tubulin synthesis in transgenic maize calli overexpressing alpha and beta tubulins. Plant J. 1998 Nov;16(3):297-304.

Asada T, Shibaoka H (1994) Isolation of polypeptides with microtubule-translocating activity from phragmoplasts of tobacco BY-2 cells. J Cell Sci. 1994 Aug;107 (Pt 8):2249-57.

Barnett JR (1991) Microtubules in interphase nuclei of Aesculus hippocastanum L. Ann. Bot. 68, 159-165.

Ben-Efraim I, Frosst PD, Gerace L (2009) Karyopherin binding interactions and nuclear import mechanism of nuclear pore complex protein Tpr. *BMC Cell Biol* 10: 74.

Binarová P, Cenklová V, Hause B, Kubátová E, Lysák M, Dolezel J, Bögre L, Dráber P (2000) Nuclear gamma-tubulin during acentriolar plant mitosis. *Plant Cell*. 2000 Mar;12(3):433-42.

Binarová P, Cenklová V, Procházková J, Dorská A, Volc J, Vrlík M, Bögre L (2006) Gamma-tubulin is essential for acentrosomal microtubule nucleation and coordination of late mitotic events in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 2006 May;18(5):1199-212.

Bischoff FR, Krebber H, Kempf T, Hermes I, Ponstingl H (1995) Human RanGTPase-activating protein RanGAP1 is a homologue of yeast Rna1p involved in mRNA processing and transport. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Feb 28;92(5):1749-53.

Bischoff FR, Ponstingl H (1991) Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1. *Nature*. 1991 Nov 7;354(6348):80-2.

Briolay A, Rousset B, Roux B (1994) Nuclear proteins interacting with DNA and tubulin. Study of the interaction of the High Mobility Group protein 1 with tubulin. *Biochim Biophys Acta*. 1994 Sep 13;1219(1):39-46.

Dean RA, Talbot NJ, Ebbole DJ, Farman ML, Mitchell TK, Orbach MJ, Thon M, Kulkarni R, Xu JR, Pan H, Read ND, Lee YH, Carbone I, Brown D, Oh YY, Donofrio N, Jeong JS, Soanes DM, Djonovic S, Kolomiets E, Rehmeier C, Li W, Harding M, Kim S, Lebrun MH, Bohnert H, Coughlan S, Butler J, Calvo S, Ma LJ, Nicol R, Purcell S, Nusbaum C, Galagan JE, Birren BW (2005) The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Nature*. 2005 Apr 21;434(7036):980-6.

Deblaere R, Bytebier B, De Greve H, Deboeck F, Schell J, Van Montagu M, Leemans J (1985) Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for Agrobacterium-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Res.* 1985 Jul 11;13(13):4777-88.

De Souza CP, Osmani SA (2007) Mitosis, not just open or closed. *Eukaryot Cell.* 2007 Sep;6(9):1521-7.

Erhardt M, Stoppin-Mellet V, Campagne S, Canaday J, Mutterer J, Fabian T, Sauter M, Muller T, Peter C, Lambert AM, Schmit AC (2002) The plant Spc98p homologue colocalizes with γ -tubulin at microtubule nucleation sites and is required for microtubule nucleation. *J Cell Sci.* June 1, 2002;115,2423-2431.

Fahrenkrog B, Aebi U (2003) The nuclear pore complex: Nucleocytoplasmic transport and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:757–766.

Fried H, Kutay U (2003) Nucleocytoplasmic transport: Taking an inventory. *Cell Mol Life Sci.* 60:1659–1688.

Giani S, Campanoni P, Breviario D (2002) A dual effect on protein synthesis and degradation modulates the tubulin level in rice cells treated with oryzalin. *Planta.* 2002 Apr;214(6):837-47.

Giannoutsou E, Galatis B, Zachariadis M, Apostolakos P (2012) Formation of an endoplasmic reticulum ring associated with acetylated microtubules in the angiosperm preprophase band. *Cytoskeleton (Hoboken).* 2012 Apr;69(4):252-65.

Gruss OJ, Carazo-Salas RE, Schatz CA, Guarguaglini G, Kast J, Wilm M, Le Bot N, Vernos I, Karsenti E, Mattaj IW (2001) Ran Induces Spindle Assembly by Reversing the Inhibitory Effect of Importin α on TPX2 Activity. *Cell.* 2001 Jan 12;Volume 104, Issue 1, Pages 83–93.

Hayashi H, Kimura K, Kimura A (2012) Localized accumulation of tubulin during semi-open mitosis in the *Caenorhabditis elegans* embryo. *Mol Biol Cell*. 2012 May;23(9):1688-99.

Heikal AA, Hess ST, Baird GS, Tsien RY, Webb WW (2000) Molecular spectroscopy and dynamics of intrinsically fluorescent proteins: coral red (dsRed) and yellow (Citrine). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Oct 24;97(22):11996-2001.

Hořejší B, Vinopal S, Sládková V, Dráberová E, Sulimenko V, Sulimenko T, Vosecká V, Philimonenko A, Hozák P, Katsetos CD, Dráber P (2012) Nuclear γ -tubulin associates with nucleoli and interacts with tumor suppressor protein C53. *J Cell Physiol*. 2012 Jan;227(1):367-82. doi: 10.1002/jcp.22772.

Hotta T, Haraguchi T, Mizuno K (2007) A novel function of plant histone H1: microtubule nucleation and continuous plus end association. *Cell Struct Funct*. 2007;32(2):79-87.

Ishiguro K, Ando T, Maeda O, Watanabe O, Goto H (2011) Cutting edge: tubulin α functions as an adaptor in NFAT-importin β interaction. *J Immunol*. 2011 Mar 1;186(5):2710-3.

Kacperska A (1999) Plant response to low temperature: signaling pathways involved in plant acclimation. Margesin R, Schinner F. (Eds), *Cold-adapted organisms – ecology, physiology, enzymology and molecular biology*. Springer-Verlag, Berlin, Germany: pp. 79–103

Kang J, Park J, Choi H, Burla B, Kretschmar T, Lee Y, Martinoia E (2011) Plant ABC Transporters. *Arabidopsis Book*. 2011;9:e0153.

Karsenti E, Kobayashi S, Mitchison T, Kirschner M (1984) Role of the centrosome in organizing the interphase microtubule array: properties of cytoplasts containing or lacking centrosomes. *J Cell Biol.* 1984 May;98(5):1763-76.

Kollman JM, Polka JK, Zelter A, Davis TN, Agard DA (2010) Microtubule nucleating gamma-TuSC assembles structures with 13-fold microtubule-like symmetry. *Nature.* 2010 Aug 12;466(7308):879-82.

Kourmouli N, Dialynas G, Petraki C, Pyrpasopoulou A, Singh PB, Georgatos SD, Theodoropoulos PA (2001) Binding of heterochromatin protein 1 to the nuclear envelope is regulated by a soluble form of tubulin. *J Biol Chem.* 2001 Apr 20;276(16):13007-14.

Krtková J, Zimmermann A., Schwarzerová K, Nick P (2012) Hsp90 binds microtubules and is involved in the reorganization of the microtubular network in angiosperms. *J Plant Physiol.* 2012 Jul 25 (epub), in press.

Kudo N, Matsumori N, Taoka H, Fujiwara D, Schreiner EP, Wolff B, Yoshida M, Horinouchi S (1999) Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Aug 3;96(16):9112-7.

Li S, Lei L, Somerville CR, Gu Y (2012) Cellulose synthase interactive protein 1 (CSI1) links microtubules and cellulose synthase complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Jan 3;109(1):185-90.

May MJ, Leaver CJ (1993) Oxidative stimulation of glutathione synthesis in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Plant Physiol.* (1993) 103: 621-627

Mazia, D. (1961). Mitosis and the physiology of cell division. In *The Cell: Biochemistry, Physiology, Morphology* (ed. J. Brachet & A. Mirsky), pp. 77-394. New York: Academic Press.

Mineyuki Y (1999) The preprophase band of microtubules: its function as a cytokinetic apparatus in higher plants. *Int Rev Cytol.* 1999;187:1–49

Murata T, Sonobe S, Baskin TI, Hyodo S, Hasezawa S, Nagata T, Horio T & Hasebe M (2005) Microtubule-dependent microtubule nucleation based on recruitment of gamma-tubulin in higher plants. *Nat Cell Biol.* 2005 Oct;7(10):961-8.

Neuber A, Franke J, Wittstruck A, Schlenstedt G, Sommer T, Stade K (2008) Nuclear export receptor Xpo1/Crm1 is physically and functionally linked to the spindle pole body in budding yeast. *Mol Cell Biol.* 2008 Sep;28(17):5348-58.

Nocarova E, Fischer L (2009) Cloning of transgenic tobacco BY-2 cells; an efficient method to analyse and reduce high natural heterogeneity of transgene expression. *BMC Plant Biol.* 2009 Apr 22;9:44.

Ovechkina Y, Maddox P, Oakley CE, Xiang X, Osmani SA, Salmon ED, Oakley BR (2003) Spindle formation in *Aspergillus* is coupled to tubulin movement into the nucleus. *Mol Biol Cell.* 2003 May;14(5):2192-200.

Paredes AR, Somerville CR, Ehrhardt DW (2006) Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules. *Science.* 2006 Jun 9;312(5779):1491-5.

Pereira G, Knop M, Schiebel E (1998) Spc98p directs the yeast gamma-tubulin complex into the nucleus and is subject to cell cycle-dependent phosphorylation on the nuclear side of the spindle pole body. *Mol Biol Cell.* 1998 Apr;9(4):775-93.

Perrin RM, Wang Y, Yuen CY, Will J, Masson PH (2007) WVD2 is a novel microtubule-associated protein in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 2007 Mar;49(6):961-71.

Sambrook J, Russel DW (2001) *Molecular cloning: A laboratory manual*. III./A3.9: Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press

Sandermann H Jr. (1992) Plant metabolism of xenobiotics. *Trends Biochem Sci.* 1992 Feb;17(2):82-4.

Schwarzerová K, Petrášek J, Panigrahi KC, Zelenková S, Opatrný Z, Nick P (2006) Intranuclear accumulation of plant tubulin in response to low temperature. *Protoplasma.* 2006 May;227(2-4):185-96.

Shimamura M, Brown RC, Lemmon BE, Akashi T, Mizuno K, Nishihara N, Tomizawa K, Yoshimoto K, Deguchi H, Hosoya H, Horio T, Mineyuki Y (2004) Gamma-tubulin in basal land plants: characterization, localization, and implication in the evolution of acentriolar microtubule organizing centers. *Plant Cell.* 2004 Jan;16(1):45-59.

Sorokin AV, Kim ER, Ovchinnikov LP (2007) Nucleocytoplasmic transport of proteins. *Biochemistry (Mosc)* 72(13): 1439-1457

Tam PP, Barrette-Ng IH, Simon DM, Tam MW, Ang AL, Muench DG (2010) The Puf family of RNA-binding proteins in plants: phylogeny, structural modeling, activity and subcellular localization. *BMC Plant Biol.* 2010 Mar 9;10:44.

Tillemans V, Leponce I, Rausin G, Dispa L, Motte P (2006) Insights into nuclear organization in plants as revealed by the dynamic distribution of *Arabidopsis* SR splicing factors. *Plant Cell.* 2006 Nov;18(11):3218-34

Ueda K, Matsuyama T, Hashimoto T (1999) Visualization of microtubules in living cells of transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma* (1999) 206:201-206

Vos JW, Pieuchot L, Evrard JL, Janski N, Bergdoll M, de Ronde D, Perez LH, Sardon T, Vernos I, Schmit AC (2008) The plant TPX2 protein regulates prospindle assembly before nuclear envelope breakdown. *Plant Cell*. 2008 Oct;20(10):2783-97.

Wittmann T, Wilm M, Karsenti E, Vernos (2000) TPX2, a novel *Xenopus* MAP involved in spindle pole organization. *J Cell Biol*. 2000 June 26;Volume 149, Issue 7, Pages 1405-1418.

Walss-Bass C, Kreisberg JI, Ludueña RF (2001) Mechanism of localization of betaII-tubulin in the nuclei of cultured rat kidney mesangial cells. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2001 Aug;49(4):208-17.

Walss C, Kreisberg JI, Ludueña RF (1999) Presence of the betaII isotype of tubulin in the nuclei of cultured mesangial cells from rat kidney. *Cell Motil Cytoskeleton*. 1999;42(4):274-84.

Wiese C, Zheng Y (2006) Microtubule nucleation: gamma-tubulin and beyond. *J Cell Sci*. 2006 Oct 15;119(Pt 20):4143-53.

Xu K, Ludueña RF (2002) Characterization of nuclear betaII-tubulin in tumor cells: a possible novel target for taxol. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2002 Sep;53(1):39-52.

Yeh TS, Hsieh RH, Shen SC, Wang SH, Tseng MJ, Shih CM, Lin JJ (2004) Nuclear betaII-tubulin associates with the activated notch receptor to modulate notch signaling. *Cancer Res*. 2004 Nov 15;64(22):8334-40.

Yoshida M, Nishikawa M, Nishi K, Abe K, Horinouchi S, Beppu T (1990) Effects of leptomycin B on the cell cycle of fibroblasts and fission yeast cells. *Exp Cell Res*. 1990 Mar;187(1):150-6.

Zhang X, Henriques R, Lin SS, Niu QW, Chua NH (2006) Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nat Protoc.* 2006;1(2):641-6.

Zhen Y, Ungerer MC (2008) Clinal variation in freezing tolerance among natural accessions of *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* 177, 419–427.

Zheng Y, Wong ML, Alberts B, Mitchison T (1995) Nucleation of microtubule assembly by a gamma-tubulin-containing ring complex. *Nature.* Dec 7;378(6557):578-83.

(65.) Zuo J, Niu QW, Chua NH (2000) Technical advance: An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *Plant J.* 2000 Oct;24(2):265-73.