

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra experimentální biologie rostlin



HLEDÁNÍ MECHANISMŮ A FUNKCE INTERAKCE MIKROTUBULÁRNÍHO CYTOSKELETU S DALŠÍMI SLOŽKAMI V ROSTLINNÉ BUŇCE

Jana Krtková

školitelka: RNDr. Kateřina Schwarzerová, Ph.D.

Shrnutí dizertační práce

Praha 2012

Poděkování

Chtěla bych především poděkovat své školitelce RNDr. Kateřině Schwarzerové, Ph.D. za odborné vedení, soustavnou pomoc, motivaci a hlavně nesmírnou trpělivost se mnou.

RNDr. Lukáši Fischerovi, Ph.D., svému konzultantovi, za cenné rady a doporučení.

Prof. Peteru Nickovi za možnost pobývat a svobodně pracovat v jeho pracovní skupině na Univerzitě v Karlsruhe.

Členům laboratoře buněčné biologie a biotechnologie rostlin za uvedení do některých metod, cenné rady, pomoc, milý přístup a příjemné prostředí – jmenovitě chci poděkovat Dr. Lence Havelkové, Dr. Lence Dvořákové, Dr. Ondřeji Smetanovi, Mgr. Stanislavovi Vosolsobě.

Aleksandře Zimmermann, dříve Jovanović, za spolupráci na tématu „Hsp90“.

Dr. Nicole Frey, Dr. Inze Oberpichler i ostatním členům spojených laboratoří Prof. Petra Nicka a Prof. Tilmana Lampartera za odborné i praktické rady během mých pobytů v Karlsruhe.

Dr. Zbyňku Zdráhalovi, Dr. Petru Haladovi, Dr. Dimitriji Heintzovi za MALDI-TOF analýzy.

Mgr. Ondřeji Šebestovi za pomoc při práci s konfokálním mikroskopem a úpravě videí.

Rodičům, prarodičům a sestře, že zůstali přes všechno mými rodiči a sestrou.

Bc. Ivě Dvořákové a Adelíně Růžičkové, Dipl. um., za poskytnutí studijního a tvůrčího prostředí pro psaní publikace a dizertace.

Milanu Urbanovi za důležitou podmínku toho, že tato práce mohla vzniknout - klidný domov.

Obsah

Poděkování.....	2
Abstrakt.....	4
Seznam zkratk	6
1 Úvod.....	7
2 Cíle práce	9
3 Výsledky a diskuze	11
3.1 Identifikace nových proteinů asociovaných s mikrotubuly.....	11
3.2 Role vazby Hsp90 na mikrotubuly v rostlinné buňce	12
3.3 Lokalizace CLASP v BY-2 a jeho interakce s dalšími buněčnými strukturami .	15
3.4 Mezi rané efekty působení Al v rostlinné buňce patří rigidifikace plazmatické membrány	18
3.4.1 Al rychle inhibuje růst kořenů <i>Arabidopsis</i> a indukuje depolarizaci buněk kořenové špičky	18
3.4.2 Rigidizace membrány způsobená Al přispívá k inhibici růstu kořene	19
3.4.3 Endocytóza je inhibována během 10 min působení Al stresu	20
3.4.4 Al stabilizuje mikrotubuly před poškozením způsobeným nízkým pH.....	20
3.4.5 Mnohočetná místa působení Al v rostlinných buňkách.....	22
3.4.6 Shrnutí.....	22
4 Závěry	23
4.1 Identifikace nových MAP	23
4.1.1 Pro další charakterizaci a studium jeho role na mikrotubulech byl vybrán protein Hsp90.....	23
4.1.2 Role CLASP v rostlinných buňkách	23
4.2 Rané efekty toxického působení hlinitých iontů v kořenech <i>Arabidopsis</i>	24
5 Seznam použité literatury	25
6 Publikace a prezentace uvedených výsledků	29
7 Životopis	31

Abstrakt

Mikrotubulární cytoskelet se v rostlinných buňkách účastní mnoha důležitých dějů během dělení, růstu a vývoje. Výkon jeho četných funkcí je však umožněn interagujícími proteiny, které jednak moduluji jeho dynamiku a organizaci, jednak umožňují funkční či strukturní propojení s dalšími složkami rostlinné buňky. Identifikace zprostředkovatelů těchto interakcí a jejich fyziologická funkce za specifických podmínek byla hlavní náplní předkládané dizertační práce.

Pomocí biochemických metod byly identifikovány membránové proteiny, které zároveň kosedimentují s mikrotubuly. Překvapivě mezi nimi nebyli žádní zástupci klasických konzervovaných proteinů asociovaných s mikrotubuly (MAP), ale jednalo se o enzymy, chaperony a rostlinně specifické proteiny. Pro další studium jeho role související s rostlinnými mikrotubuly byl vybrán identifikovaný heat-shock protein 90 (Hsp90_{MT}). Rekombinantní Hsp90_{MT} se váže přímo na mikrotubuly a dimery tubulinu *in vitro*. Za vazbu není zodpovědná jeho ATP-vazebná doména. Hsp90_{MT} v BY-2 kolokalizuje s mikrotubuly fragmoplastu i s kortikálními mikrotubuly a podílí se na obnově mikrotubulů po jejich depolymeraci způsobené chladem. Dále se Hsp90 účastní postupu buněčného cyklu, jeho inhibice u rostlinných buněk blokuje buněčný cyklus v G1 fázi.

Na základě literárního studia funkcí poměrně nedávno popsaných +TIP proteinů u živočichů byl pro další studium v rostlinných buňkách vybrán protein CLASP, který by mohl zprostředkovávat interakci mikrotubulů a aktinových filament. CLASP se v BY-2 nachází na mikrotubulech v průběhu celého buněčného cyklu. Kromě toho má prominentní lokalizaci na hranách přepážek mezi dvěma sousedícími buňkami, kde zřejmě interaguje s plazmatickou membránou. V kortikální oblasti byla místy pozorována i jeho kolokalizace s aktinovými filamenty. CLASP se zřejmě podílí na růstu a dělení rostlinných buněk.

Toxicita hlinitých iontů vede k zastavení růstu kořenů. Není doposud zcela jasné, co je jeho primární příčinou. K zastavení růstu kořenů dochází podle našich pozorování hydroponicky kultivovaných rostlin *Arabidopsis* již během 2 min působení Al. Al během 10 min inhibuje endocytózu, během prvních 30 min stabilizuje kortikální mikrotubuly a snižuje fluiditu plazmatické membrány. Po dodání benzyl alkoholu, který zkapalňuje membrány, se částečně obnovuje fluidita membrán a částečně i růst kořenů během prvních 30 min. Lze tedy učinit závěr, že ztráta fluidity membrán a inhibice endocytózy způsobené Al jsou jedny z prvních projevů jeho toxicity a že procesy spojené

s plazmatickou membránou a membránami, jako např. transport váčků, jsou cíli raného působení Al toxicity.

Seznam zkratk

+TIP	z angl. +tip interacting protein
BY-2	buněčná linie <i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. Bright Yellow 2
CLASP	z angl. CLIP associated protein; CLIP = cytoplasmic linker protein
DREPP	developmentally regulated plasma membrane polypeptide
DTT	dithiotreitol
EB1	z angl. end-binding protein 1
EF	elongační faktor
EPC	etylfenylkarbamát
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
GDA	geldanamycin
GFP	z angl. green fluorescent protein
Hsp70	z angl. heat shock protein 70
Hsp90	z angl. heat shock protein 90
MAP	z angl. microtubule associated protein
MS	kultivační médium podle Murashige a Skooga
PLD	fosfolipáza D

1 Úvod

Mikrotubulární cytoskelet se podílí na mnoha procesech a dějích v rostlinné buňce spojených se signalizací, vývojem a růstem. K výkonu těchto funkcí jsou však nezbytné další interagující proteiny a struktury. S jinými buněčnými strukturami, jako např. plazmatickou membránou a aktinovými filamenti mikrotubuly totiž interagují pravděpodobně prostřednictvím dalších proteinů.

V literatuře je popsáno mnoho proteinů interagujících s mikrotubuly (MAP), např. MAP65 nebo motorové proteiny. Tyto „klasické“ MAP (Buschmann a Lloyd, 2008), jsou konzervované v rámci eukaryot a jsou charakterizované právě svou prominentní vazbou na mikrotubuly, na jejichž organizaci a dynamice se podílejí. Je ale s podivem, že u těchto klasických MAP existuje málo poznatků o jejich dalších fyziologických rolích, které by přímo souvisely s rostlinným růstem, vývojem, signalizací atd. Na druhé straně je v rostlinné buňce celá řada proteinů, o kterých se ve specifických souvislostech dozvídáme, že také interagují s mikrotubuly. Jedná se o proteiny, jejichž primární funkce je jiná (tedy ne vazba na mikrotubuly), např. enzymy (GAPDH, fosfoglycerát kináza, PLD), chaperony (Hsp90, Hsp70). Tyto proteiny se opakovaně objevují v extraktech proteinů asociovaných s mikrotubuly, ale většinou jim jako MAP nebyla věnována pozornost. Nebo se jedná o proteiny, které se primárně vážou na druhou složku cytoskeletu, aktinová filamenta (forminy). Dále se jedná o proteiny, které se vyskytují pouze u rostlin, či dokonce u specifických skupin (DREPP, AIR9, SB401). Vyjmenované typy proteinů by se právě díky svým četným interakcím s dalšími proteiny či buněčnými strukturami mohly přímo podílet na specifických funkcích v životě rostlinné buňky či se uplatňovat v situacích daných měnícími se podmínkami prostředí, které souvisí s mikrotubulárním cytoskeletem. Popis těchto vedlejších funkcí, které by mohly mít přímý fyziologický projev a které jsou dány interakcí s mikrotubulárním cytoskeletem, popř. dalšími jeho interaktory, je však obtížný právě vzhledem k četným interakcím popisovaného proteinu. Situaci může navíc ztěžovat i jeho výskyt v komplexu s dalšími proteiny, což velmi komplikuje studium projevů jeho inhibice.

Nicméně interakce některých proteinů s mikrotubuly a zároveň s dalšími buněčnými strukturami může být vodítkem k poznání jejich specifických funkcí v rostlinné buňce. V naší laboratoři byly identifikovány membránové proteiny, které se zároveň vážaly na mikrotubuly. Překvapivě mezi nimi nebyly klasické MAP, ale jednalo se o proteiny spadající mezi enzymy, chaperony či rostlinně specifické proteiny. Bližší

pozornost byla následně věnována proteinu Hsp90, který byl již dříve popsán jako protein interagující s mikrotubuly (Freudenreich a Nick, 1998, Petrasek *et al.*, 1998).

Jinými proteiny, které sice patří mezi klasické MAP, ale je o nich z živočišné literatury známo, že tvoří mezi sebou proměnlivé komplexy a zprostředkovávají interakce s dalšími buněčnými strukturami, jsou proteiny spadající do skupiny +TIP proteinů (Akhmanova a Hoogenraad, 2005, Akhmanova *et al.*, 2001). Tyto proteiny by se mohly díky své vazbě na plus konec mikrotubulů a svým dalším interakcím podílet na důležitých procesech dělení, růstu a vývoje rostlinné buňky. U rostlin se nachází EB1 a CLASP, druhému z nich byla věnována bližší pozornost vzhledem k jeho již popsané vazbě na F-aktin u živočichů (Tsvetkov *et al.*, 2007).

Toxicita hlinitých iontů způsobující rychlé zastavení růstu kořenů je zdánlivě tématem, které s MAP a dalšími interagujícími strukturami nesouvisí. Je tomu ale přesně naopak, protože je již dlouho známo, že Al stresem jsou různě postiženy jak mikrotubuly (Blancaflor *et al.*, 1998, Sasaki *et al.*, 1997, Schwarzerová *et al.*, 2002, Sivaguru *et al.*, 1999a, Sivaguru *et al.*, 2003), tak další buněčné struktury, např. plazmatická membrána (Sivaguru *et al.*, 1999a, Sivaguru *et al.*, 1999b). K pochopení procesů uplatňujících se za specifických okolností v signalizaci a růstu rostlinných buněk by velmi prospělo poznání mechanismů, jak a kdy spolu tyto dvě struktury interagují, případně prostřednictvím kterých proteinů, a také poznání procesů vedoucích k zastavení růstu kořenů za působení Al.

2 Cíle práce

1. Cílem bylo identifikovat nové MAP, které zprostředkovávají interakce mikrotubulárního cytoskeletu a dalších buněčných struktur a popsat jejich role v rostlinné buňce.

1.1. Na základě biochemických metod identifikace proteinů asociujících s mikrotubuly a s plazmatickou membránou byl pro další studium vybrán protein Hsp90.

Dílčí cíle:

- Vytvořit linii stabilně exprimující specifický Hsp90, který se váže na mikrotubuly, fúzovaný s fluorescenčním markerem
- Charakterizovat expresní linii
- Určit lokalizaci GFP-Hsp90_MT v BY-2
- Popsat specifickou roli Hsp90_MT související s jeho vazbou na mikrotubuly
- Exprimovat a purifikovat rekombinantní specifický Hsp90_MT a ověřit jeho vazbu na mikrotubuly, popř. tubulin.

1.2. Na základě publikovaných dat u živočichů byl pro další studium vybrán protein CLASP.

Dílčí cíle:

- Klonovat *CLASP* z tabáku
- Vytvořit fluorescenční markery pro studium lokalizace CLASP v rostlinné buňce; vytvořit linii stabilně exprimující fluorescenční fúzní CLASP
- Charakterizovat stabilně exprimující linii
- Určit lokalizaci CLASP v BY-2
- Najít struktury či partnery v rostlinných buňkách, se kterými CLASP interaguje

2. Určit rané cíle toxicity hlinitých iontů a jejich vztak h mikrotubulům.

Dílčí cíle:

- Hydroponicky kultivovat rostliny *Arabidopsis* a pozorovat vliv hlinitých iontů na růst jejich kořenů v prvních 30 minutách

- Testovat raný vliv hlinitých iontů na uspořádání kortikálních mikrotubulů v kořenech *Arabidopsis*
- Testovat vliv stabilizace mikrotubulů na růst kořenů *Arabidopsis*
- Zaměřit se na vliv Al na membránové struktury

3 Výsledky a diskuze

3.1 Identifikace nových proteinů asociovaných s mikrotubuly

Pomocí různých přístupů jsme se snažili identifikovat nové proteiny asociované s mikrotubuly. Zajímaly nás především ty proteiny, které navíc kromě vazby mikrotubulů vážou i další struktury a mohly by tak v rostlinné buňce vykonávat specifické funkce. Jako první nás zajímali interakční partneři mikrotubulů a plazmatické membrány. Proteiny izolované z membránových svleček či mikrozomální frakce z BY-2 byly kosedimentovány s mikrotubuly. Takto byly jako interakční partneři mikrotubulů odhaleny překvapivě pouze proteiny, které nelze zařadit mezi „klasické“ konzervované MAP. Byly to enzymy metabolických drah [např. GAPDH (glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza), fosfoglycerát kináza a další] a translace [např. EF2 (elongační faktor 2)], chaperony (Hsp90, Hsp70) a rostlinně specifické proteiny [DREPP (developmentally regulated plasma membrane polypeptide)]. Těmto proteinům nebyla dlouhou dobu jako MAP věnována pozornost, přestože se mezi identifikovanými interaktory mikrotubulů objevují stále znovu. Vzhledem k jejich dalším interakcím v buňce není jednoduché určit jejich funkci na mikrotubulech, protože může být ostatními prominentními funkcemi maskována, nebo samotný protein bez svých dalších partnerů či specifických fyziologických podmínek není schopen svou funkci na mikrotubulech vykonávat.

Námi byla posléze věnována bližší pozornost proteinu Hsp90. Některé z proteinů, určených jako interaktory mikrotubulů, např. Hsp70 a GAPDH, byli později v našich experimentech identifikováni i jako interakční partneři Hsp90_MT. Několik nezávislých identifikací těchto proteinů jako interaktorů s mikrotubuly, popř. jako součástí komplexů interagujících s mikrotubuly (např. (Ho *et al.*, 2009) vybízí k návrhu molekulárního schématu jejich vzájemných interakcí a k detailnějšímu průzkumu jejich fyziologických funkcí spojených s mikrotubuly.

Dále nás zajímaly proteiny, o kterých je již na základě poznatků z živočišných buněk známo, že se kromě mikrotubulů vážou i na další buněčné struktury. Velkou skupinou těchto proteinů jsou +TIP proteiny (+tip interacting protein), které spadají mezi klasické MAP a zprostředkovávají interakce mezi mikrotubuly a aktinem, kortikální oblastí a dalšími buněčnými strukturami (Akhmanova *et al.*, 2001; Akhmanova a Hoogenraad, 2005). Je zajímavé, že u rostlin homology některých +TIP chybí. Dá se tedy předpokládat, že dva známé rostlinné +TIP, tedy EB1 a CLASP, budou u rostlin zastávat i role ostatních chybějících, nebo mít jiné specifické funkce spojené se specifickými

mikrotubulárními strukturami u rostlin. U proteinu CLASP u živočichů byla zjištěna jeho vazba na F-aktin (Tsvetkov *et al.*, 2007) a proto jsme se mu jako potenciálnímu zprostředkovateli interakcí mikrotubulů s dalšími buněčnými strukturami u rostlin rozhodli blíže věnovat.

3.2 Role vazby Hsp90 na mikrotubuly v rostlinné buňce

Mezi proteiny izolovanými z membránových svleček z BY-2 a následně asociovanými s mikrotubuly byl identifikován protein z rodiny Hsp90. Naším kolegům z Karlsruhe se podařilo jeho homolog z rýže identifikovat jako protein asociovaný jak s mikrotubuly (pomocí taxolové kosedimentace), tak s tubulinovými heterodimery (pomocí EPC-afinitní chromatografie). Tyto specifické izoformy se schopností vázat se na mikrotubuly byly nazvány NtHsp90_MT a OsHsp90_MT.

Cytosolické Hsp90 jsou vysoce konzervované a sdílí některé společné domény a motivy. Jsou to vysoce konzervovaná N-terminální ATP-vazebná doména, domnělý vazebný motiv pro kasein-kinázu II KEISDDE, C-terminální MEEVD motiv zprostředkovávající vazbu ko-chaperonů (Krishna a Gloor, 2001, Meyer *et al.*, 2003) a imunofilinů (Young *et al.*, 2001) a deset konzervovaných sekvenčních bloků charakteristických pro cytosolické Hsp90 (Krishna a Gloor, 2001).

Liší se naopak v oblasti, která je bohatá na zbytky kyseliny glutamové a lysinu. Motiv střídajících se opačně nabitých aminokyselin byl K a E u některých proteinů, např. MAP18 (Wang *et al.*, 2007) u *Arabidopsis* či MAP1B u člověka (Noble *et al.*, 1989) identifikován jako mikrotubuly-vazebný motiv. Vzhledem k tomu, že jednotlivé izoformy Hsp90 se nejvíce liší právě v této oblasti a že námi izolované specifické Hsp90_MT jsou v tomto úseku více podobné MAP18 než jiným Hsp90 izoformám, je možné, že právě tento motiv bude zodpovědný za vazbu na mikrotubuly. Vyvozovat stejnou funkci na základě podobnosti aminokyselinové sekvence s jinými proteiny je však pouze v rovině předpokladu, který musí být experimentálně ověřen, např. pomocí rekombinantních úseků Hsp90.

Pro specifický Hsp90 schopný vazby na mikrotubuly (NtHsp90_MT) byl vytvořen konstrukt na jeho overexpresi a rekombinantní protein s His-kotvou byl purifikován na Ni-koloně. Rekombinantní Hsp90_MT kosedimentoval s mikrotubuly *in vitro*. Vzhledem k tomu, že Hsp90 byl identifikován pomocí EPC-afinitní chromatografie jako protein, který má schopnost vazby na tubulinové heterodimery, byla při *in vitro* kosedimentaci

s polymerovaným tubulinem testována možnost, že nepolymerovaný tubulin váže Hsp90_MT a snižuje tak množství molekul, které kosedimentují s polymerovaným tubulinem do peletu. A vskutku, poměr množství Hsp90_MT v supernatantu ku jeho množství v peletu byl nižší, pokud byl ze vzorku odstraněn nepolymerovaný tubulin. Schopnost vazby Hsp90_MT na heterodimery tubulinu byla ověřena i pomocí proteinu G, na který se při 4°C rekombinantní NtHsp90_MT vázal prostřednictvím anti- α -tubulinu a nepolymerovaného tubulinu.

Hsp90 má na N-konci ATP vazebnou doménu, která je důležitá pro aktivaci klientních proteinů (Grenert *et al.*, 1999, Pearl a Prodromou, 2000). Do ATP-vazebné kapsy se také váže specifický inhibitor Hsp90, geldanamycin (GDA), který vazbu klientních proteinů naopak blokuje (Neckers *et al.*, 1999). Byla tedy testována schopnost ATP zvyšovat a schopnost GDA snižovat množství Hsp90_MT kosedimentujícího s mikrotubuly. Ani aktivátor ATP ani inhibitor GDA neměnily množství Hsp90_MT navázaného na mikrotubuly a kosedimentujícího do peletu. GDA neblokoval ani vazbu Hsp90_MT na dimerní tubulin. Za vazbu Hsp90 na tubulin i mikrotubuly je tedy zřejmě zodpovědná jiná oblast, než ATP-vazebná doména. Toto zjištění také svědčí ve prospěch našeho výše zmíněného předpokladu, že za vazbu by mohla být zodpovědná KE-bohatá oblast.

Pro specifické izoformy se schopností vázat se na mikrotubuly (NtHsp90_MT a OsHsp90_MT) byly vytvořeny fluorescenční fúzní konstrukty a fúzní proteiny byly stabilně exprimovány pod 35S promotorem v BY-2. Lokalizace GFP-Hsp90_MT byla sledována *in vivo* i *in situ* pomocí imunofluorescenčního značení mikrotubulů. *In vivo* GFP-Hsp90_MT jasně svítil v oblasti rostoucího fragmoplastu v charakteristické prstovité struktuře. Během zrání fragmoplastu se GFP-Hsp90_MT z jeho okrajů odpojil, jeho signál se zeslabil a stal se difúzním. Pomocí imunofluorescenčního značení mikrotubulů v BY-2 bylo možno GFP-Hsp90_MT pozorovat kromě fragmoplastu i v oblasti předprofázového prstence a vřeténka, i když poněkud hůře. Kolokalizace s kortikálními mikrotubuly byla *in vivo* i *in situ* zastřena, zřejmě vinou silného signálu GFP-Hsp90_MT pocházejícího z cytoplazmy. Je také možné, že kolokalizaci lze jen těžko v buňkách pozorovat, protože stejně jako u živočichů (Pratt *et al.*, 1999) i u rostlin je Hsp90_MT na mikrotubulech vysoce dynamický, vazba má krátké trvání a je spíše slabá. Když byly ale připraveny membránové svlečky a byl tak odstraněn vnitřní obsah buňky spolu s GFP-Hsp90_MT nacházejícím se v cytoplazmě, kolokalizaci s kortikálními mikrotubuly bylo možné sledovat dobře. Bylo zajímavé, že pokud byly buňky vystaveny chladu a poté

přesunuty zpátky do 26°C, aby mohly svůj mikrotubulární cytoskelet obnovit, byla kolokalizace GFP-Hsp90_MT s kortikálními mikrotubuly zřetelnější.

V popředí našeho zájmu ale stála ještě nevyřešená otázka funkce vazby Hsp90_MT na mikrotubuly. Linie overexprimující GFP-Hsp90_MT (pod 35S promotorem) jeho roli neodhalily, neboť u nich nebyl pozorován závažný fenotypový projev jeho overexprese. Proto bylo k problému přistoupeno z druhé strany a funkce Hsp90 byla inhibována GDA. Za kontrolních podmínek neměl samotný GDA vliv na viabilitu buněk ani během 5 h ani 2 dnů. Jeho efekt se na viabilitě buněk u všech testovaných linií projevil až v momentě, kdy na ně zároveň působil další stresový faktor, buď chlad (0°C), nebo vysoká teplota (50°C). Za působení těchto stresorů zřejmě Hsp90 plní svou funkci molekulárního chaperonu a inhibujeme-li jeho funkci GDA, buňky ztrácejí možnost opravy poškozených proteinů a již během 3-5 h umírají. Je ovšem zajímavé, jak GDA sám o sobě působí na buňky během 2 dnů. Nesnižuje jejich viabilitu, ale způsobuje stejné cytologické změny v buňkách u všech testovaných linií – dochází k rozpouštění cytoplazmatických provazců. Pozorováním různých buněčných struktur po 2 dnech ošetření GDA bylo zjištěno, že je změněná pouze lokalizace GFP-Hsp90 – stává se difúzní a jsou poškozena aktinová filamenta. Organizace mikrotubulů, proteinu CLASP ani endoplazmatického retikula narušena není. Rozpouštění cytoplazmatických provazců u BY-2 sledovali i Van Gestel *et al.* (2002) po působení latrunkulinu, drogy depolymerující aktinová filamenta. Bylo by tedy zajímavé efekt inhibice Hsp90 v souvislosti a aktinovým cytoskeletem dále prozkoumat.

Vzhledem k tomu, že zaprvé vliv inhibice Hsp90 se projeví v buňkách až při působení dalšího stresoru, zadruhé konzistentně s tímto nebyly v organizaci mikrotubulů během samotné inhibice Hsp90 pomocí GDA pozorovány žádné změny a zatřetí že lokalizace GFP-Hsp90_MT na kortikálních mikrotubulech byla překvapivě zřetelnější za působení chladu a hlavně po obnově mikrotubulů, zaměřili jsme se na funkci Hsp90_MT na mikrotubulech při jejich obnově po působení chladu. Při chladovém stresu mikrotubuly depolymerují (Schwarzerová *et al.*, 2006). Po zahřátí se v rámci minut ustanoví nová mikrotubulární síť. Pokud je Hsp90 potřebný v procesech reorganizace mikrotubulů, dá se očekávat, že jeho inhibice GDA se projeví právě při obnově mikrotubulů po chladovém stresu. A skutečně, vliv inhibice Hsp90 se projevil právě v okamžiku, kdy mikrotubuly měly být po chladovém stresu obnoveny. 1,78 μM GDA inhiboval obnovu mikrotubulů u buněk obou testovaných linií, tedy u GFP-Hsp90_MT exprimující i u linie exprimující volné GFP. Navíc se ukázalo, že při nižší koncentraci

GDA (178 nM) buňky overexprimující GFP-Hsp90_MT obnovovaly své mikrotubuly lépe než buňky exprimující volné GFP, které zřejmě měly k dispozici méně molekul Hsp90. Hsp90 se tedy podílí na obnově mikrotubulů po chladovém stresu. U živočichů se Hsp90 také podílí na obnově mikrotubulů, je součástí centrozómu a spolu s dalšími svými interagujícími proteiny se podílí na nukleaci mikrotubulů (de Carcer 2004, de Carcer *et al.*, 2001; Glover, 2005; Lange *et al.*, 2000). Je možné, že i u acentrozomálních rostlinných buněk by Hsp90_MT mohl hrát důležitou roli v roztroušených nukleačních místech mikrotubulů (Murata *et al.*, 2005). Je také pravděpodobné, že v acentrozomálních buňkách funguje Hsp90 ve spolupráci s dalšími proteiny nukleujícími mikrotubuly. Další studie role Hsp90 v nukleaci mikrotubulů v acentrozomálních rostlinných buňkách a charakterizace jeho interagujících proteinů by mohla vést k lepšímu porozumění molekulárního mechanismu nukleace mikrotubulů u rostlin.

Naše experimenty s inhibítorem Hsp90 GDA ukazují, že Hsp90 také hraje roli v postupu buněčného cyklu. V nerostlinných buňkách se inhibice Hsp90 projeví následným zastavením buněčného cyklu v různých stádiích. Molekulární mechanismy těchto efektů se liší v závislosti na buněčném typu (Zajac *et al.*, 2008). Přestože je pravděpodobné, že v rámci eukaryot je role Hsp90 v regulaci buněčného cyklu rozšířená, přesný molekulární mechanismus působení inhibice Hsp90 na průběh buněčného cyklu u tabáku vyžaduje další výzkum. Naše výsledky ukazují, že BY-2 jsou blokovány v G1 fázi, takže u tabáku GDA blokuje postup buněčného cyklu ještě před sestavením mitotických vřetének. Mitotická vřeténka působením GDA na rozdíl od živočichů narušena nejsou (naše výsledky). Ještě ale zbývá zjistit, zda mikrotubuly-vazebná funkce Hsp90 a blok v postupu buněčného cyklu spolu souvisí, nebo zda jsou to u rostlin nezávislé procesy kontrolované Hsp90.

3.3 Lokalizace CLASP v BY-2 a jeho interakce s dalšími buněčnými strukturami

Protein CLASP se řadí mezi +TIP proteiny a u živočichů se kromě vazby na plus konec mikrotubulů nachází v kortikální oblasti, kam +konce mikrotubulů směřuje (Akhmanova *et al.*, 2001). Je také schopen vázat F-aktin (Tsvetkov *et al.*, 2007), a proto byl jeho rostlinný homolog vybrán k dalšímu studiu jako potenciální zprostředkovatel interakce mezi mikrotubuly a dalšími buněčnými strukturami.

Ze třídních BY-2 byla amplifikována celá, doposud neznámá *NtCLASP* sekvence z cDNA a ověřena postupně sekvenací. Byly vytvořeny fluorescenční fúzní

proteiny pro sledování lokalizace CLASP – mCherryCLASP a GFP-CLASP a linie stabilně exprimující GFP-CLASP pod 35S promotorem. Buňky exprimující GFP-CLASP jsou oproti kontrolním netransformovaným BY-2 širší, začínají se dělit již první den a nejvíce se dělí již 2. den po subkultivaci, pak jejich mitotická aktivita náhle klesá. Kontrolní buňky se nejvíce dělí ve 2. a 3. dni. Rozšíření buněk u GFP-CLASP exprimující linie podle našich výsledků zřejmě nesouvisí s jejich dělením (netransformované BY-2 se ve 2. dni dělí stejně intenzivně, jejich šířka je ovšem menší), ale bylo by vhodné od sebe oddělit tyto dva aspekty např. pomocí buněk s inducibilní expresí GFP-CLASP. Tuto linii právě připravujeme. Zvýšení mitotické aktivity a rozšíření buněk vlivem overexprese GFP-CLASP je v souladu se sníženým dělením a menšími buňkami u *clasp-1* mutant *Arabidopsis* (Ambrose *et al.*, 2007). CLASP se tedy zřejmě u rostlin podílí na buněčné expanzi.

CLASP se u rostlin nachází podle míry exprese v nepohyblivých tečkách, které zřejmě odpovídají plus koncům mikrotubulů, nebo častěji podél celých mikrotubulů. Při vysoké expresi tvoří v kortikální vrstvě kroužky (Ambrose *et al.*, 2007; Kirik *et al.*, 2007; naše výsledky). U rostlinných CLASP a jejich živočišných protějšků je rozdíl v jejich pohyblivosti na plus konci mikrotubulů. Zatímco u živočichů je pohyb zřetelný (Akhmanova *et al.*, 2001), u tabáku i u *Arabidopsis* je CLASP spíše statický [pohyb byl pozorován pouze při nízké expresi (Ambrose *et al.*, 2007)] a také jeho lokalizace na plus konci je oproti živočichům relativně nízká (Ambrose *et al.*, 2007; naše výsledky). Je ale možné, že přednostní lokalizace CLASP podél celých mikrotubulů a jeho nepohyblivost vypovídá o jeho specifických funkcích v rostlinách, které mohou být spojené s odlišným uspořádáním mikrotubulárního cytoskeletu.

Vzhledem k tomu, že CLASP je primárně protein asociovaný s mikrotubuly, byla při hledání specifických fenotypových projevů overexprese GFP-CLASP u BY-2 nejprve pozorována organizace mikrotubulů v interfázi. Zdá se, že organizace imunofluorescenčně značených mikrotubulů u GFP-CLASP overexprimující linie se neliší od jejich organizace u netransformovaných buněk. Při pozorování jeho lokalizace v průběhu buněčného cyklu však byla velice nápadná jeho lokalizace na přepážkách dvou sousedících buněk. Nahromadění GFP-CLASP selektivně na přepážkách připomíná selektivní chování CLASP u živočichů, kde je výhradně lokalizován v kortikální oblasti vedoucího konce migrujících buněk (Akhmanova *et al.*, 2001). Na základě experimentů s plazmolyzovanými buňkami se ukázalo, že lokalizace na přepážkách dvou sousedících buněk zřejmě nesouvisí s plazmodezmy. Dále umístění na okrajích vyvolalo otázku, zda

CLASP funguje jako molekulární značka na plazmatické membráně mateřské buňky pro připojení nově vznikající buněčné desky ke stávající plazmatické membráně. Jednak ale lokalizace na přepážkách dvou sousedních buněk nezávisí na stáří buněk a jednak při pozorování rostoucího fragmoplastu nebyl nezaznamenán výskyt GFP-CLASP na plazmatické membráně mateřské buňky, ale pouze na okrajích fragmoplastu. Jako molekulární značka pro připojení buněčné desky k mateřské plazmatické membráně CLASP tedy zřejmě nefunguje. Na základě pozorování kolokalizace GFP-CLASP s FM4-64 označenou plazmatickou membránou se ale zdá, že tyto dvě struktury spolu na buněčných přepážkách v rozích interagují. Toto zjištění je konzistentní s dřívějším zjištěním, že CLASP se podílí na připojení mikrotubulů do kortikální oblasti jak u živočichů, tak u rostlinných interfázních mikrotubulů (Akhmanova *et al.*, 2001; Ambrose a Wasteneys, 2008). I samotná lokalizace na přepážkách sousedních buněk u BY-2 je v souladu s lokalizací AtCLASP v buňkách kořene (Ambrose *et al.*, 2011). Autoři této lokalizaci připisují roli stabilizace mikrotubulů na ostrých hranách buňky, kde CLASP zabráňuje katastrofám mikrotubulů. U *clasp-1* mutant mají buňky více zakulacené hrany a hyperparalelní mikrotubuly, protože na ostré hraně buňky dojde vždy ke katastrofě mikrotubulu. CLASP tedy přispívá k nastolení orientace svazků mikrotubulů v rostlinných buňkách, které nemají centrum organizující jejich uspořádání (Ambrose a Wasteneys, 2008; Ambrose *et al.*, 2011). Podle nedávného zjištění hraje CLASP na přepážkách také roli v umístování předprofázového prstence a v reorientaci buněčného dělení v závislosti na míře exprese MAP65, auxinovém transportu a funkci transkripčních faktorů PLETHORA (Dhonukshe *et al.*, 2012).

CLASP náleží mezi +TIP proteiny, jejichž vlastností je schopnost zprostředkovávat interakce mikrotubulů s dalšími buněčnými strukturami (Akhmanova a Hoogenraad, 2005; Galjart 2010). Např. u lidského homologu CLASP bylo ukázáno, že asociuje přímo s F-aktinem (Tsvetkov *et al.*, 2007). Interakce obou cytoskeletálních složek je významná v mnoha buněčných dějích zahrnujících dělení a růst buňky a vývoj rostlinných orgánů a uplatňují se při ní pravděpodobně další proteiny. Jedním z nich by mohl být i CLASP. U rostlin zatím lokalizace CLASP na aktinových mikrofilamentech ukázána nebyla, nutno však podotknout, že byla testována pouze nepřímo pomocí drogy latrunkulinu (Ambrose *et al.*, 2007). Naše výsledky založené jednak na imunofluorescenčním značení aktinových filament v GFP-CLASP exprimující linii BY-2, jednak na infiltraci fluorescenčních markerů (GFP-CLASP nebo mCherry-CLASP spolu s mCherry-fimbrinem nebo GFP-fimbrinem) do buněk pokožky listu tabáku (*Nicotiana*

benthamiana) ukazují místy kolokalizaci těchto dvou struktur v kortikální oblasti. Mohlo by jít o místa, kde se stýkají mikrotubuly s aktinovými filamenti. Je pravda, že se nejedná o výraznou kolokalizaci a u tranzientní exprese CLASP po infiltraci je třeba mít na paměti artefakty vzniklé jeho nadměrnou expresí, protože značí souvisle a silně celé mikrotubuly, ale jedná se o doklad možné interakce CLASP a aktinových filament *in vivo* a *in situ*. Přímou interakci všech tří struktur, tedy mikrotubulů, CLASP a aktinových filament, bude ale třeba dále testovat.

3.4 Mezi rané efekty působení Al v rostlinné buňce patří rigidifikace plazmatické membrány

Plazmatická membrána a mikrotubuly jsou struktury, které spolu v rostlinné buňce interagují, ať už přímo či nepřímo v průběhu mnoha buněčných dějů, např. signalizace, růstu rostlin, atd. Následující výsledky přispívají k pochopení buněčných procesů zahrnujících děje na plazmatické membráně a mikrotubulech za specifických podmínek působení stresu hlinitých iontů (Al). Al způsobuje zastavení růstu kořenů, ale primární příčina této zástavy růstu známa není. Dlouho se předpokládalo, že kromě jiných jsou mikrotubuly a plazmatická membrána strukturami uplatňujícími se společně při zástavě růstu kořene za působení Al stresu. Naše výsledky však ukazují, že v raných fázích působení Al stresu tomu tak není a na zastavení růstu kořenů se podílejí změny spojené pouze s plazmatickou membránou.

3.4.1 Al rychle inhibuje růst kořenů *Arabidopsis* a indukuje depolarizaci buněk kořenové špičky

Inhibice růstu kořene a depolarizace plazmatické membrány představují dva z nejčasnějších fenoménů Al toxicity u různých rostlinných druhů (Barcelo a Poschenrieder, 2002; Verstraeten a Oteiza, 2000). V našich hydroponických kultivačních systémech, které umožňovaly jednak výměnu testovaných médií, jednak bezprostřední pozorování růstu kořenů pod mikroskopem, byla zřetelná dramatická inhibice růstu kořene už během prvních dvou minut po vystavení 100 μM AlCl_3 . To je zatím zřejmě nejrychlejší známá růstová odpověď na působení Al. Dále naše měření ukázala téměř okamžitou depolarizaci plazmatické membrány v pokožkových buňkách kořene *A. thaliana*. Depolarizace byla detegována vzrůstem fluorescence barvy DiSBAC₂(3) citlivé na změny transmembránového potenciálu a je v souladu s rychlými změnami způsobenými Al na plazmatické membráně pozorovanými u buněk kořene (Sivaguru *et al.*, 1999a; Sivaguru *et al.*, 2003). Znamená to, že efekty způsobené Al u našeho

experimentálního modelu jsou v dobrém souladu s efekty popsány u jiných rostlinných druhů a za jiných experimentálních podmínek.

Zatímco Al dramaticky inhiboval růst, médium obsahující pouze 1% sacharózu bez Al růst stimulovalo. Nárůst byl téměř 200% ve srovnání s kontrolním MS médiem. Zrychlení růstu může být následkem náhlé výměny MS média osmoticky méně aktivním minimálním médiem (1% sacharózu), která vede ke zrychlení buněčné expanze poháněné turgorovým tlakem. Po 24 h kultivace měly rostliny kultivované v 1% sacharóze v porovnání s rostlinami v MS médiu kratší kořeny, což je konzistentní s pozorováním, že zrychlení růstu bylo pouze přechodné. Vezmeme-li v potaz počáteční zrychlení růstu v 1% sacharóze, je inhibice růstu způsobená Al nápadně efektivní.

3.4.2 Rigidizace membrány způsobená Al přispívá k inhibici růstu kořene

Al zvyšuje rigiditu membrán rekonstituovaných *in vitro* ze syntetických lipidů, které byly izolovány z mozkových tkání (Verstraeten *et al.*, 1997). I naše spektrofluorometrická měření ukázala, že Al zvyšuje rigiditu plazmatických membrán z *A. thaliana in vitro*. Pokles fluidity membrán se objevil okamžitě po přidání Al. Pokud se ke kořenům ošetřeným Al přidá benzyl alkohol, který zmírňuje ztužující efekt Al, kořeny okamžitě obnoví svůj růst. Tyto výsledky demonstrují, že Al ztužuje membrány i *in vivo* a že rigidizace membrán způsobená Al významně přispívá k rychlému zastavení růstu kořenů během Al stresu. Ale protože obnova růstu kořenů za dodání benzyl alkoholu byla pouze částečná, rigidizace membrány není pravděpodobně jedinou příčinou inhibice růstu kořenů. Tomu nasvědčuje i dlouhodobá kultivace kořenů v médiu obsahujícím Al a zároveň benzyl alkohol, protože zde se již vytrácí jeho zmírňující efekt. To můžeme vysvětlit tím, že ztužující efekt Al na plazmatickou membránu může vyvolat některé další efekty během raných fází Al stresu. Například byl publikován vznik oxidativního stresu brzy po vystavení kořenů Al (Kaneko *et al.*, 2007; Verstraeten a Oteiza, 2000) a ovlivnění fosfoinozitolového metabolismu v plazmatické membráně (Verstraeten a Oteiza, 2002). Rigidizace plazmatické membrány tedy pravděpodobně stojí na začátku kaskády událostí, které se objevují v rostlinných buňkách během Al stresu. Vzhledem k biologickému významu plazmatické membrány je možné, že vliv Al na její vlastnosti může být hypoteticky obecným společným jmenovatelem Al toxicity u všech eukaryot.

3.4.3 Endocytóza je inhibována během 10 min působení Al stresu

Hledali jsme další rané efekty Al, které by mohly být spolu se ztrátou fluidity membrány zodpovědné za rychlou inhibici růstu kořene, a proto jsme studovali proces endocytózy v pokožkových buňkách kořenové čepičky za využití fluorescenční barvy FM4-64 (Aniento a Robinson, 2005). Desetiminutové ošetření 100 μM Al bylo dostatečné, aby se zastavila tvorba endozómů. Již dříve publikovali Illes *et al.* (2006), že Al zabráňuje internalizaci FM4-64 barvy pomocí endozómů. Po 90 min ošetření Al nevznikal brefeldinem A indukovaný endozomální kompartment. V meristemických buňkách Al-senzitivní odrůdy kukuřice byl vznik brefeldinových kompartmentů blokován již během 30 min působení Al (Amenos *et al.*, 2009). Pro zodpovězení otázky, zda může být endocytóza zodpovědná za rychlé zastavení růstu kořene v rámci minut, byla použita droga brefeldin A, která interferuje s transportem váčků, a byl pozorován její raný efekt na růst kořenů. Inhibice vezikulárního transportu v kořenových buňkách 50 μM brefeldinem A zpomaluje během prvních 30 min ošetření růst kořenů. Zabránění růstu kořenů bylo postupné s jistým zpomalením na konci 30 min časového úseku. Aktivní procesy transportu váčků jsou tedy nezbytné pro růst kořene. Je důležité zmínit, že brefeldin A je obecným inhibítozem transportu váčků. Naše pokusy ukázaly, že působením Al je postižena endocytická dráha, zatímco ostatní dráhy jsme nezkoumali. Nicméně naše výsledky jasně ukazují, že transport váčků může být jedním z primárních cílů působení Al stresu, který přispívá k zastavení růstu kořenů indukovanému Al během prvních 30 min.

3.4.4 Al stabilizuje mikrotubuly před poškozením způsobeným nízkým pH

Kortikální mikrotubuly jsou cytoskeletální struktury nacházející se pod plazmatickou membránou. Interakce mezi kortikálními mikrotubuly a plazmatickou membránou je nezbytná pro kontrolu tvarových změn v buněčné stěně u rostoucích buněk (Paredes *et al.*, 2006). Jako dynamické struktury dokážou mikrotubuly rychle odpovídat na extracelulární faktory a tím zprostředkovávat rychlou růstovou odpověď. V několika studiích u různých rostlinných druhů a pletiv byly publikovány reorganizace, dezorganizace nebo stabilizace mikrotubulů během ošetření Al (Blancaflor *et al.*, 1998; Schwarzerová *et al.*, 2002; Sivaguru *et al.*, 1999a; Sivaguru *et al.*, 2003; Sasaki *et al.*, 1997). Tato různorodost může být přičítána několika faktorům včetně specifity pletiv, fyziologické zralosti daného pletiva, druhové specifity a závažnosti a trvání Al stresu. V našich experimentech ošetření 100 μM Al jasně stabilizovalo kortikální mikrotubuly

v laterálních buňkách kořenové čepičky i v pokožkových buňkách kořenové špičky během prvních 30 min působení. Snížené pH naopak indukovalo náhodné uspořádání mikrotubulů. Náhodné uspořádání či depolymerizace mikrotubulů v odpovědi na nízké pH byly popsány v internodech *Nitella* (Kropf *et al.*, 1997) a kořenech salátu (Takahashi *et al.*, 2003). Ve druhé ze studií způsobilo náhodné uspořádání mikrotubulů indukované nízkým pH tvorbu kořenových vlásků (Takahashi *et al.*, 2003), protože reorganizace mikrotubulů je zřejmě k iniciaci tvorby kořenových vlásků nezbytná (Van Bruaene *et al.*, 2004). Reorganizaci mikrotubulů indukovanou nízkým pH můžeme proto považovat za fyziologickou reakci, která byla v našich experimentech blokována Al. Po počáteční stabilizaci mikrotubulů způsobené Al následovala v průběhu 6 h postupná dezorganizace a depolymerace, až v buňce zůstalo jen málo mikrotubulů.

Rychlé změny ve svazcích kortikálních mikrotubulů však podle našich experimentů nejsou spojeny s rychlou inhibicí růstu kořenů způsobenou Al. Jednak zrychlení růstu nastalo pouze v minimálním médiu 1% sacharózy, zatímco náhodné uspořádání a depolymerace mikrotubulů se objevily v nízkém pH vždy nezávisle na typu média. K buněčné expanzi tedy v tomto případě došlo nezávisle na organizaci mikrotubulů a k rychlému růstu kořenů nebyly potřeba transversálně uspořádané mikrotubuly. Jednak při vystavení kořenů 40 μ M taxolu během prvních 30 min nedošlo k žádnému zpomalení růstu a přírůstek kořenů se pohyboval okolo 200%, takže ani stabilizace mikrotubulů neměla vliv na růstové procesy během raného působení Al. Destabilizaci mikrotubulů Al způsobil až později (hodiny až dny vystavení). Ztráta mikrotubulů během prodlouženého působení Al může být spojena se změnami morfologie kořene pozorovanými při dlouhodobých experimentech s Al toxicitou. Podobně je tomu při oryzalinem způsobené destabilizaci mikrotubulů, která způsobila změny v morfologii kořene (Baskin *et al.*, 1994). Naše experimenty ale naznačují, že ani ztráta mikrotubulů pozorovaná v kořenech rostoucích v médiu s nízkým pH ani stabilizace mikrotubulů 40 μ M taxolem v pH 5,8 nemá okamžitý vliv na růst kořenů během prvních 30 min. Kořeny v těchto podmínkách rostly srovnatelně s kořeny v kontrolním médiu 1% sacharózy o pH 5,8. Al tedy způsobuje rané změny u kortikálních mikrotubulů v buňkách kořenů *Arabidopsis*, ale tyto změny nejsou pravděpodobně zodpovědné za inhibici růstu kořene během prvních 30 min působení Al.

3.4.5 Mnohočetná místa působení Al v rostlinných buňkách

S využitím metody přesného časování ošetření kořenové špičky a měření přirůstání kořene jsme ukázali, že při inhibici růstu kořene za působení Al stresu jsou významnými činiteli ztráta fluidity plazmatické membrány a inhibice endocytózy. Vztah mezi změnami v membránové fluiditě způsobenými Al a endocytózou musí být ještě testován, nicméně naše výsledky podporují hypotézu, že Al interferuje s mnohými procesy a místy v rostlinných buňkách, které mohou být zodpovědné za rychlou inhibici růstu kořene. Například je jasné, že Al působí také v apoplastických strukturách (shrnuto v (Poschenrieder *et al.*, 2008), kde pektiny vážou jeho podstatnou část (Chang *et al.*, 1999) a jejichž redistribuce způsobená Al se kryla s inhibicí růstu kořenů u kukuřice (Li *et al.*, 2009). K identifikaci všech faktorů přispívajících k inhibici růstu kořene za působení Al stresu je potřeba ještě další výzkum.

3.4.6 Shrnutí

Al způsobuje ztrátu fluidity plazmatické membrány, inhibuje endocytózu v pokožkových buňkách a způsobuje změny v organizaci mikrotubulů v laterálních buňkách kořenové čepičky a v pokožkových buňkách kořenů *Arabidopsis* v rámci minut. Ztráta fluidity membrány se podílí během 30 min na rychlé inhibici růstu kořenů a navrhuje, že procesy spojené s plazmatickou membránou a membránami, jako např. transport váčků, jsou cíli raného působení Al toxicity v buňkách kořene.

4 Závěry

4.1 Identifikace nových MAP

- Biochemicky byly identifikovány proteiny, které interagovaly s mikrotubuly a zároveň s plazmatickou membránou. Jednalo se o enzymy či chaperony (GAPDH, fosfoglycerát kináza, EF2, Hsp90, atd.) a o rostlinně specifické proteiny (DREPP).
- Na základě publikovaných dat u živočichů byl pro další studium vybrán protein CLASP, který byl slibným kandidátem na zprostředkovatele interakce mezi mikrotubuly a aktinovými filamenty.

4.1.1 Pro další charakterizaci a studium jeho role na mikrotubulech byl vybrán protein Hsp90

- Byly vytvořeny linie stabilně exprimující GFP-fúzní specifické mikrotubuly-vazebné Hsp90 (GFP-NtHsp90_MT a GFP-OsHsp90_MT).
- Buňky těchto linií neměly výrazný fenotypový projev overexprese GFP-Hsp90_MT.
- GFP-Hsp90_MT se v BY-2 nacházel na fragmoplastu, předprofázovém prstenci, vřeténku a na kortikálních mikrotubulech.
- Hsp90 se v rostlinných buňkách podílí na obnově mikrotubulárního cytoskeletu po jeho depolymeraci způsobené chladem.
- Hsp90 hraje roli v průběhu buněčného cyklu u rostlin, inhibice Hsp90 blokuje buněčný cyklus v G1 fázi.
- Byl exprimován rekombinantní specifický Hsp90_MT, pomocí něhož byla ověřena vazba na polymerovaný tubulin i tubulinové heterodimery *in vitro*.

4.1.2 Role CLASP v rostlinných buňkách

- Z cDNA byl amplifikován a osekvenován *CLASP* z tabáku.
- Byly vytvořeny fluorescenční markery mCherry-CLASP a GFP-CLASP a linie stabilně exprimující GFP-CLASP.
- Buňky této linie byly širší oproti kontrolním netransformovaným buňkám a v rámci kultivačního cyklu se dříve dělily.

- CLASP se v BY-2 nachází na kortikálních mikrotubulech, předprofázovém prstenci, vřeténku i fragmoplastu. Výrazná je jeho lokalizace na přepážkách sousedních buněk.
- CLASP by v rostlinných buňkách mohl interagovat s plazmatickou membránou a aktinovými filamenty.

4.2 Rané efekty toxického působení hlinitých iontů v kořenech *Arabidopsis*

- Rostliny *Arabidopsis* byly hydroponicky kultivovány a bylo pozorováno zastavení růstu jejich kořenů již po 2 min působení Al.
- Během prvních 30 min působení Al stabilizuje kortikální mikrotubuly v kořenech *Arabidopsis*.
- Stabilizace mikrotubulů taxolem nemá vliv na růst kořenů *Arabidopsis* v prvních 30 minutách, stabilizace mikrotubulů indukovaná Al tedy není primární příčinou zastavení růstu kořenů.
- Al způsobuje ztrátu fluidity plazmatické membrány, inhibuje endocytózu v pokožkových buňkách a způsobuje změny v organizaci mikrotubulů v laterálních buňkách kořenové čepičky a v pokožkových buňkách kořenů *Arabidopsis* v rámci minut. Ztráta fluidity membrány se podílí během 30 min na rychlé inhibici růstu kořenů. Procesy spojené s plazmatickou membránou a membránami jsou zřejmě cíli raného působení Al toxicity v buňkách kořene.

5 Seznam použité literatury

- Akhmanova, A. a Hoogenraad, C.C.** (2005) Microtubule plus-end-tracking proteins: mechanisms and functions. *Current Opinion in Cell Biology*, **17**.
- Akhmanova, A., Hoogenraad, C.C., Drabek, K., Stepanova, T., Dortland, B., Verkerk, T., Vermeulen, W., Burgering, B.M., De Zeeuw, C.I., Grosveld, F. a Galjart, N.** (2001) CLASPs are CLIP-115 and-170 associating proteins involved in the regional regulation of microtubule dynamics in motile fibroblasts. *Cell*, **104**.
- Ambrose, C., Allard, J.F., Cytrynbaum, E.N. a Wasteneys, G.O.** (2011) A CLASP-modulated cell edge barrier mechanism drives cell-wide cortical microtubule organization in Arabidopsis. *Nature Communications*, **2**.
- Ambrose, J.C., Shoji, T., Kotzer, A.M., Pighin, J.A. a Wasteneys, G.O.** (2007) The Arabidopsis CLASP gene encodes a microtubule-associated protein involved in cell expansion and division. *Plant Cell*, **19**.
- Ambrose, J.C. a Wasteneys, G.O.** (2008) CLASP Modulates Microtubule-Cortex Interaction during Self-Organization of Acentrosomal Microtubules. *Molecular Biology of the Cell*, **19**.
- Amenos, M., Corrales, I., Poschenrieder, C., Illes, P., Baluka, F. a Barcelo, J.** (2009) Different Effects of Aluminum on the Actin Cytoskeleton and Brefeldin A-Sensitive Vesicle Recycling in Root Apex Cells of Two Maize Varieties Differing in Root Elongation Rate and Aluminum Tolerance. *Plant and Cell Physiology*, **50**, 528-540.
- Aniento, F. a Robinson, D.G.** (2005) Testing for endocytosis in plants. *Protoplasma*, **226**, 3-11.
- Barcelo, J. a Poschenrieder, C.** (2002) Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a review. *Environmental and Experimental Botany*, **48**, 75-92.
- Baskin, T. I., Wilson, J. E., Cork, A. a Williamson, R. E.** (1994) Morphology and microtubule organization in *Arabidopsis* roots exposed to oryzalin or taxol. *Plant and Cell Physiology*, **35**, 935-942
- Blancaflor, E.B., Jones, D.L. a Gilroy, S.** (1998) Alterations in the cytoskeleton accompany aluminum-induced growth inhibition and morphological changes in primary roots of maize. *Plant Physiology*, **118**, 159-172.
- Buschmann, H. a Lloyd, C.W.** (2008) Arabidopsis Mutants and the Network of Microtubule-Associated Functions. *Molecular Plant*, **1**, 888-898.
- Chang, Y.C., Yamamoto, Y. a Matsumoto, H.** (1999) Accumulation of aluminium in the cell wall pectin in cultured tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) cells treated with a combination of aluminium and iron. *Plant Cell and Environment*, **22**, 1009-1017.
- de Carcer, G.** (2004) Heat shock protein 90 regulates the metaphase-anaphase transition in a polo-like kinase-dependent manner. *Cancer Research*, **64**, 5106-5112.
- de Carcer, G., Avides, M.D., Lallena, M.J., Glover, D.M. a Gonzalez, C.** (2001) Requirement of Hsp90 for centrosomal function reflects its regulation of Polo kinase stability. *Embo Journal*, **20**, 2878-2884.
- Dhonukshe, P., Weits, D.A., Cruz-Ramirez, A., Deinum, E.E., Tindemans, S.H., Kakar, K., Prasad, K., Mahonen, A.P., Ambrose, C., Sasabe, M., Wachsmann, G., Luijten, M., Bennett, T., Machida, Y., Heidstra, R., Wasteneys, G., Mulder, B.M. a Scheres, S.** (2012) A PLETHORA-Auxin

- Transcription Module Controls Cell Division Plane Rotation through MAP65 and CLASP. *Cell*, **149**, 383-396.
- Freudenreich, A. a Nick, P.** (1998) Microtubular organization in tobacco cells: Heat-shock protein 90 can bind to tubulin in vitro. *Botanica Acta*, **111**, 273-279.
- Galjart, N.** (2010) Plus-End-Tracking Proteins and Their Review Interactions at Microtubule Ends. *Current Biology*, **20**.
- Glover, D.M.** (2005) Polo kinase and progression through M phase in *Drosophila*: a perspective from the spindle poles. *Oncogene*, **24**, 230-237.
- Grenert, J.P., Johnson, B.D. a Toft, D.O.** (1999) The importance of ATP binding and hydrolysis by hsp90 in formation and function of protein heterocomplexes. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 17525-17533.
- Ho, A.Y.Y., Day, D.A., Brown, M.H. a Marc, J.** (2009) Arabidopsis phospholipase D delta as an initiator of cytoskeleton-mediated signalling to fundamental cellular processes. *Functional Plant Biology*, **36**, 190-198.
- Illés, P., Schlicht, M., Pavlovkin, J., Lichtscheidl, I., Baluška, F. a Ovečka, M.** (2006) Aluminium toxicity in plants: internalization of aluminium into cells of the transition zone in Arabidopsis root apices related to changes in plasma membrane potential, endosomal behaviour, and nitric oxide production. *Journal of Experimental Botany*, **57**, 4201-4213.
- Kaneko, N., Sugioka, T. a Sakurai, H.** (2007) Aluminum compounds enhance lipid peroxidation in liposomes: Insight into cellular damage caused by oxidative stress. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **101**, 967-975.
- Kirik, V., Herrmann, U., Parupalli, C., Sedbrook, J.C., Ehrhardt, D.W. a Huelskamp, M.** (2007) CLASP localizes in two discrete patterns on cortical microtubules and is required for cell morphogenesis and cell division in Arabidopsis. *Journal of Cell Science*, **120**.
- Krishna, P. a Gloor, G.** (2001) The Hsp90 family of proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Stress & Chaperones*, **6**, 238-246.
- Kropf, D.L., Williamson, R.E. a Wasteney, G.O.** (1997) Microtubule orientation and dynamics in elongating characean internodal cells following cytosolic acidification, induction of pH bands, or premature growth arrest. *Protoplasma*, **197**, 188-198.
- Lange, B.M.H., Bachi, A., Wilm, M. a Gonzalez, C.** (2000) Hsp90 is a core centrosomal component and is required at different stages of the centrosome cycle in *Drosophila* and vertebrates. *Embo Journal*, **19**, 1252-1262.
- Li, Y.Y., Yang, J.L., Zhang, Y.J. a Zheng, S.J.** (2009) Disorganized distribution of homogalacturonan epitopes in cell walls as one possible mechanism for aluminium-induced root growth inhibition in maize. *Annals of Botany*, **104**, 235-241.
- Meyer, P., Prodromou, C., Hu, B., Vaughan, C., Roe, S.M., Panaretou, B., Piper, P.W. a Pearl, L.H.** (2003) Structural and functional analysis of the middle segment of Hsp90: Implications for ATP hydrolysis and client protein and cochaperone interactions. *Molecular Cell*, **11**, 647-658.
- Murata, T., Sonobe, S., Baskin, T.I., Hyodo, S., Hasezawa, S., Nagata, T., Horio, T. a Hasebe, M.** (2005) Microtubule-dependent microtubule nucleation based on recruitment of gamma-tubulin in higher plants. *Nature Cell Biology*, **7**, 961-U952.
- Neckers, L., Schulte, T.W. a Mimnaugh, E.** (1999) Geldanamycin as a potential anti-cancer agent: Its molecular target and biochemical activity. *Investigational New Drugs*, **17**, 361-373.

- Noble, M., Lewis, S.A. a Cowan, N.J.** (1989) The microtubule binding domain of microtubule-associated protein MAP1B contains a repeated sequence motif unrelated to that of MAP2 and tau. *Journal of Cell Biology*, **109**, 3367-3376.
- Paredes, A.R., Somerville, C.R. a Ehrhardt, D.W.** (2006) Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules. *Science*, **312**, 1491-1495.
- Pearl, L.H. a Prodromou, C.** (2000) Structure and in vivo function of Hsp90. *Current Opinion in Structural Biology*, **10**, 46-51.
- Petrášek, J., Freudenreich, A., Heuing, A., Opatrný, Z. a Nick, P.** (1998) Heat-shock protein 90 is associated with microtubules in tobacco cells. *Protoplasma*, **202**, 161-174.
- Poschenrieder, C., Gunse, B., Corrales, I. a Barcelo, J.** (2008) A glance into aluminum toxicity and resistance in plants. *Science of the Total Environment*, **400**, 356-368.
- Pratt, W.B., Silverstein, A.M. a Galigniana, M.D.** (1999) A model for the cytoplasmic trafficking of signalling proteins involving the hsp90-binding immunophilins and p50(cdc37). *Cellular Signalling*, **11**, 839-851.
- Sasaki, M., Yamamoto, Y., Ma, J.F. a Matsumoto, H.** (1997) Early events induced by aluminum stress in elongating cells of wheat root (Reprinted from Plant nutrition for sustainable food production and environment, 1997). *Soil Science and Plant Nutrition*, **43**, 1009-1014.
- Schwarzerová, K., Petrášek, J., Panigrahi, K.C.S., Zelenková, S., Opatrný, Z. a Nick, P.** (2006) Intranuclear accumulation of plant tubulin in response to low temperature. *Protoplasma*, **227**, 185-196.
- Schwarzerová, K., Zelenková, S., Nick, P. a Opatrný, Z.** (2002) Aluminum-induced rapid changes in the microtubular cytoskeleton of tobacco cell lines. *Plant and Cell Physiology*, **43**, 207-216.
- Sivaguru, M., Baluška, F., Volkmann, D., Felle, H.H. a Horst, W.J.** (1999a) Impacts of aluminum on the cytoskeleton of the maize root apex. Short-term effects on the distal part of the transition zone. *Plant Physiology*, **119**, 1073-1082.
- Sivaguru, M., Pike, S., Gassmann, W. a Baskin, T.I.** (2003) Aluminum rapidly depolymerizes cortical microtubules and depolarizes the plasma membrane: Evidence that these responses are mediated by a glutamate receptor. *Plant and Cell Physiology*, **44**, 667-675.
- Sivaguru, M., Yamamoto, Y. a Matsumoto, H.** (1999b) Differential impacts of aluminium on microtubule organisation depends on growth phase in suspension-cultured tobacco cells. *Physiologia Plantarum*, **107**, 110-119.
- Takahashi, H., Hirota, K., Kawahara, A., Hayakawa, E. a Inoue, Y.** (2003) Randomization of cortical microtubules in root epidermal cells induces root hair initiation in lettuce (*Lactuca sativa* L.) seedlings. *Plant and Cell Physiology*, **44**, 350-359.
- Tsvetkov, A.S., Samsonov, A., Akhmanova, A., Galjart, N. a Popov, S.V.** (2007) Microtubule-binding proteins CLASP1 and CLASP2 interact with actin filaments. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, **64**.
- Van Bruaene, N., Joss, G. a Van Oostveldt, P.** (2004) Reorganization and in vivo dynamics of microtubules during arabidopsis root hair development. *Plant Physiology*, **136**, 3905-3919.
- Van Gestel, K., Kohler, R.H. a Verbelen, J.P.** (2002) Plant mitochondria move on F-actin, but their positioning in the cortical cytoplasm depends on both F-actin and microtubules. *Journal of Experimental Botany*, **53**, 659-667.

- Verstraeten, S.V., Nogueira, L.V., Schreier, S. a Oteiza, P.I.** (1997) Effect of trivalent metal ions on phase separation and membrane lipid packing: Role in lipid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **338**, 121-127.
- Verstraeten, S.V. a Oteiza, P.I.** (2000) Effects of Al³⁺ and related metals on membrane phase state and hydration: Correlation with lipid oxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **375**, 340-346.
- Verstraeten, S.V. a Oteiza, P.I.** (2002) Al³⁺-mediated changes in membrane physical properties participate in the inhibition of polyphosphoinositide hydrolysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **408**, 263-271.
- Wang, X., Zhu, L., Liu, B.Q., Wang, C., Jin, L.F., Zhao, Q. a Yuan, M.** (2007) Arabidopsis MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN18 functions in directional cell growth by destabilizing cortical microtubules. *Plant Cell*, **19**, 877-889.
- Young, J.C., Moarefi, I. a Hartl, F.U.** (2001) Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *Journal of Cell Biology*, **154**, 267-273.
- Zajac, M., Moneo, M.V., Carnero, A., Benitez, J. a Martinez-Delgado, B.** (2008) Mitotic catastrophe cell death induced by heat shock protein 90 inhibitor in BRCA1-deficient breast cancer cell lines. *Molecular Cancer Therapeutics*, **7**, 2358-2366.

6 Publikace a prezentace uvedených výsledků

Krtková, J., Zimmermann, A., Schwarzerová, K., Nick, P. (2012) Hsp90 binds microtubules and is involved in the reorganization of microtubular network in angiosperms, *Journal of Plant Physiology*, **169**, 1329-1339.

Krtková, J. and Havelková, L., Křepelová, A., Fišer, R., Vosolsobě, S., Novotná, Z., Martinec, J., Schwarzerová, K. (2012) Loss of membrane fluidity and endocytosis inhibition are involved in rapid aluminum-induced root growth cessation in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Physiology and Biochemistry*, **60**, 88-97.

Plakátová sdělení:

Krtková, J., Zimmermann, A., Schwarzerová, K., Nick, P.: Hsp90 Modulates the Plasticity of Plant Microtubules, Conference on Plant Cell and Developmental Biology May 31 – June 4, 2011, Šanghaj, Čína,

Vosolsobě, S., **Kobrllová, J.**, Schwarzerová, K.: Proteiny zprostředkovávající interakci mezi plazmatickou membránou a mikrotubulárním cytoskeletem, in: Kovařík, A. et al.: Bulletin České společnosti experimentální biologie rostlin (ČSEBR). 5. Metodické dny, sborník abstrakt. Praha 2009. ISSN 1213-6670.

Kobrllová, J., Schwarzerová, K.: A novel method for isolation of proteins potentially interacting with plasma membrane and cortical cytoskeleton, in *Book of Abstracts*, XVI Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology. *Tampere*, Finsko 2008

Kobrllová, J., Křepelová, A., Vosolsobě, S., Havelková, L., Fišer, R., Novotná, Z., Martinec, J., Schwarzerová, K.: Plasma membrane fluidity is the first target of aluminum in *Arabidopsis thaliana*. In *Book of Abstracts*, XVI Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology. *Tampere*, Finsko 2008

Přednášky:

Krtková, J. *, Schwarzerová, K.: Characterization of tobacco CLASP, 19. Cytoskeletální klub, Vranovská Ves 2011.

Kobřlová, J., Jovanović, A., Schwarzerová, K., Nick, P.: Hsp90 interaguje s mikrotubuly, 12. Konference experimentální biologie rostlin, Praha 2010

Kobřlová, J., Jovanović, A., Schwarzerová, K., Nick, P.: Hsp90 is a microtubule-interacting protein, 18. Cytoskeletální klub, Vranovská Ves 2010

*Prezentující autor

7 Životopis

Jméno: RNDr. Jana Krtková

Narozena: 25. září 1981 v Ústí nad Labem

Trvalé bydliště: Jana Zajíce 7, Ústí nad Labem, 400 11

Státní příslušnost: ČR

Národnost: česká

Telefon: +420 605 109 147

Email: akcni.krtecek@post.cz

Vzdělání:

2011	složení ZOP (Zentrale Oberstufenprüfung = C2 zkouška z němčiny)
2009	složení CAE (Certificate of Advanced English)
2007	Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, státní rigorózní zkouška
2006 - doposud	doktorské studium (7. roč.), obor Anatomie a fyziologie rostlin, katedra experimentální biologie rostlin, UK v Praze
2001-2006	Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, obor Odborná biologie, zakončeno státní magisterskou zkouškou
1997-2001	Gymnázium, Jateční 22, Ústí nad Labem
1990-1997	4. ZŠ s rozšířenou výukou jazyků, Elišky Krásnohorské, Ústí nad Labem

Ovládané metody, zahraniční stáže a zkušenosti:

Jana Krtková vystudovala obor Odborná biologie na PřF UK s vyznamenáním, diplomovou práci na téma Role mikrotubulárního cytoskeletu za toxického působení hlinitých iontů obhájila na Katedře fyziologie rostlin (nyní Katedra experimentální biologie rostlin). V současnosti na téže katedře podala dizertační práci na téma „Hledání mechanismů a funkce interakce mikrotubulárního cytoskeletu s dalšími složkami v rostlinné buňce“. Během magisterského a probíhajícího doktorského studia získala zkušenosti se světelnou, fluorescenční a konfokální mikroskopií, analýzou obrazu, imunofluorescenčními a *in vivo* (GFP) technikami, prací s buněčnými kulturami tabáku (BY-2) i celými modelovými organismy (*Arabidopsis thaliana*, *Chenopodium rubrum*, *Nicotiana benthamiana*), bioinformatickými postupy, cytologickými (příprava protoplastů

a membránových svleček), biochemickými (izolace proteinů, kosedimentace s tubulinem, imunodetekce, 2D analýza proteinové frakce, purifikace His-tagovaných proteinů) i molekulárně biologickými metodami (PCR, RT PCR, klonování PCR produktů, overexprese proteinů v *E. coli*, biolistika, infiltrace, stabilní transformace BY-2 zprostředkovaná *Agrobacterium tumefaciens*). Absolvovala půlroční stáž na Albert-Ludwigsuniversität Freiburg, kde se věnovala imunofluorescenčním metodám, semestrální studijní pobyt na Universität Rostock, v roce 2008 a 2009 se vždy po dobu tří měsíců na Univerzitě v Karlsruhe (Prof. P. Nick) věnovala interakci rostlinného proteinu HSP90 s mikrotubuly v rámci společného projektu DAAD-MŠMT ČR. V následujících dvou letech byla hlavní řešitelkou projektu GAUK (Role +TIP proteinů v dynamice mikrotubulů, růstu a vývoji rostlinných buněk) a absolvovala vždy měsíční stáž opět na Univerzitě v Karlsruhe (Prof. P. Nick), kde se hlouběji věnovala studiu proteinů zprostředkujících interakce mezi aktinovým a mikrotubulárním cytoskeletem. Své výsledky prezentovala na konferencích formou přednášek (Cytoskeletální klub 2006, Vranovská Ves; Cytoskeletální klub 2008, Vranovská Ves; Cytoskeletální klub, Vranov nad Dyjí 2009; KEBR, Praha 2010, Cytoskeletální klub, Vranovská Ves 2010) a plakátových sdělení (FESPB 2008, Tampere, Finsko). Plakátová sdělení byla také prezentována školitelkou na Konferenci o rostlinné buněčné a vývojové biologii (2011, Šanghaj, Čína). Své výsledky týkající se role vazby Hsp90 na mikrotubuly u rostlin a toxicity hlinitých iontů u rostlin publikovala v časopisech *Journal of Plant Physiology* a *Plant Physiology and Biochemistry*.

Ve svém volném čase sportuje (běžecké lyžování, cyklistika, plavání, vysokohorská turistika), věnuje se německé literatuře a opernímu zpěvu.

CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE
Faculty of Science
Department of Experimental Plant Biology



**SEARCH FOR THE MECHANISMS AND
FUNCTIONS OF INTERACTIONS OF
MICROTUBULAR CYTOSKELETON WITH OTHER
COMPONENTS IN PLANT CELL**

Jana Krtková

Supervisor: RNDr. Kateřina Schwarzerová, Ph.D.

Summary of the Ph.D. thesis

Prague 2012

Acknowledgement

First of all, I would like to thank to my supervisor RNDr. Kateřina Schwarzerová, Ph.D. for her professional advice, constant help, motivation and enormous patience with my personality.

Then I would like to thank to all people who helped me or contributed to my thesis:

RNDr. Lukáš Fischer, Ph.D., my consultant, for precious advice and suggestions.

Prof. Peter Nick for the possibility to stay and work independently in his working group at the University of Karlsruhe.

To all members of the laboratory of plant cell biology and biotechnology for introduction to many methods, help, generous attitude and friendly environment, namely to: Dr. Lenka Havelková, Dr. Lenka Dvořáková, Dr. Ondřej Smetana, Mgr. Stanislav Vosolsobě.

Aleksandra Zimmermann, formerly Jovanović, for her collaboration at the „Hsp90“ topic.

Dr. Nicole Frey, Dr. Inga Oberpichler and other members of the joint laboratories of Prof. Peter Nick and Prof. Tilman Lamparter for professional and also practical advice during my stays in Karlsruhe.

Dr. Zbyněk Zdráhal, Dr. Petr Halada, Dr. Dimitrij Heintz for MALDI-TOF analyses.

Mgr. Ondřej Šebesta for his help with confocal microscope and movies.

To my parents, grandparents and sister that they remained mine.

Bc. Iva Dvořáková and Adelína Růžičková, Dipl. um., for providing me with study and creative environment for writing the paper and thesis.

Milan Urban for an important condition to be able to write the thesis – peaceful home.

Content

Acknowledgement	2
Abstract	4
List of abbreviations	5
1 Introduction	6
2 Aims.....	8
3 Results and discussion	10
3.1 Identification of the new microtubule-associated proteins	10
3.2 The role of Hsp90-microtubule interaction in plant cell	11
3.3 The localization of CLASP and its interactions with other cellular structures in BY-2 14	
3.4 The rigidification of plasma membrane is one of the early effects of aluminum toxicity in plant cell.....	17
3.4.1 Al rapidly inhibits the Arabidopsis root growth and induces the root cell depolarization	17
3.4.2 Al-induced membrane rigidization contributes to the inhibition of root growth 18	
3.4.3 Endocytosis is inhibited within 10 min of Al stress	19
3.4.4 Al stabilizes microtubules against low pH-induced disruption	19
3.4.5 Multiple target sites of Al in plant cells.....	21
3.4.6 Conclusion	21
4 Conclusion	22
4.1 Identification of new MAPs	22
4.2 Hsp90 is associated with microtubules and is involved in their reorganization	22
4.3 The role of CLASP in plant cells	22
4.4 The early effect of aluminum toxicity in <i>Arabidopsis</i> roots	23
5 References	24
6 Publications and presentation of the results	28
7 Curriculum vitae	30

Abstract

Microtubular cytoskeleton is involved in many processes in plant cells, including cell division, growth and development. Other proteins enable its functions by modulation of its dynamics and organization and by mediation of functional and structural interaction with other cell structures. Identification of the mediating proteins and the functions of these interactions under specific conditions were the main aims of the thesis.

Membrane proteins interacting with microtubules were identified using biochemical methods. Surprisingly, the identified proteins co-sedimenting with microtubules were not members of the „classical“ microtubule associated proteins (MAPs). There were enzymes, chaperones and plant specific proteins among them. For further studies, the identified microtubule-associated heat-shock protein 90 (Hsp90_{MT}) was chosen. Recombinant Hsp90_{MT} binds directly to microtubules and tubulin dimers *in vitro*. The ATP-binding pocket is not responsible for this association. In BY-2, Hsp90_{MT} co-localizes with phragmoplast and cortical microtubules and is involved in microtubule recovery after their depolymerization during cold treatment. In plants, Hsp90 is involved in cell cycle progression, its inhibition causes cell-cycle arrest in G1 phase.

Based on literature search for animal proteins mediating microtubule-actin interaction, the protein CLASP from the group of recently described +TIP proteins was chosen for further investigation in plant cells. In BY-2, CLASP localizes on microtubules during the whole cell cycle. It also clearly localizes at the border edges of two adjacent cells, where it probably interacts with plasma membrane. In the cortical region, it scarcely co-localizes with actin filaments. Further, CLASP is probably involved in plant cell expansion and division.

Aluminum toxicity leads to root growth inhibition. The primary cause of the inhibition is not known. In *Arabidopsis* plants cultivated in hydropony, the root growth inhibition occurred within 2 min of Al treatment. Al inhibits endocytosis within 10 min, stabilizes cortical microtubules within the first 30 min and reduces plasma membrane fluidity. Application of the membrane fluidizer, benzyl alcohol, restored partially membrane fluidity and also partially restored root growth during first 30 min of Al treatment. We concluded that Al-induced loss of membranefluidity and endocytosis inhibition occurred very early during Al toxicity in plant roots and could be the earliest targets of Al treatment.

List of abbreviations

+TIP	+tip interacting protein
BY-2	<i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. Bright Yellow 2 cell line
CLASP	CLIP associated protein; CLIP = cytoplasmic linker protein
DREPP	developmentally regulated plasma membrane polypeptide
DTT	dithiothreitol
EB1	end-binding protein 1
EF	elongation factor
EPC	ethylphenylcarbamate
GAPDH	glyceraldehyd-3-phosphate dehydrogenase
GDA	geldanamycin
GFP	green fluorescent protein
Hsp70	heat shock protein 70
Hsp90	heat shock protein 90
MAP	microtubule associated protein
MS	Murashige and Skoog cultivation medium
PLD	phospholipase D

1 Introduction

Microtubule cytoskeleton is involved in many processes and events during signaling, growth and development in plant cell. For microtubular functions other interacting proteins and structures are necessary. The interactions with other cellular structures, *e.g.* with actin filaments or plasma membrane, are mediated by other proteins.

There are many microtubule associated proteins (MAP) described in the literature, *e.g.* MAP65 or motor proteins. These „classical“ MAPs (Buschmann and Lloyd, 2008) are conserved in Eukaryots and are characterized by their prominent binding to microtubules. They are involved in microtubule organization and dynamics. Surprisingly, little is known about their further biological roles directly connected with plant growth, signaling and development. On the other hand, in plant cell, there is a plenty of proteins that interact with microtubules under specific conditions. The primary role of these proteins is other than binding microtubules, for example enzymatic (glyceraldehyd-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), phosphoglycerate kinase, PLD) or they act as chaperons (Hsp70, Hsp90). These proteins were found repeatedly in extracts of microtubule associated proteins, nevertheless they were not given much attention as MAPs. Other proteins bind primarily to the other cytoskeletal network, actin filaments (formins). And other proteins are found exclusively in plants, or even in distinct families (DREPP, AIR9, SB401). The proteins from the groups named above could be directly involved in events related to microtubular cytoskeleton during specific processes in plant cell life or situations given by changing environment via their multiple interactions with other proteins or structures. The analysis of the „moonlighting“ protein functions which could have some physiological effect and are based on microtubule-interaction or possible binding of other interacting partners, is very complicated due to multiple interactions of the analyzed protein. The situation also may be complicated by its occurrence in protein complexes, which makes the study of its inhibition effects even more difficult.

However, simultaneous interactions of proteins with microtubules and other cell structures can lead to uncover its specific functions in the plant cell. In our research group, membrane proteins associated with microtubules were identified. Surprisingly, there were no classical MAPs among them, the identified proteins were enzymes, chaperons or plant specific proteins. More attention was further dedicated to the role of

Hsp90 on microtubules (heat-shock protein 90) which interaction with microtubules was already described (Freudenreich and Nick, 1998, Petrasek *et al.*, 1998).

+TIP proteins (+tip interacting proteins) are other promising candidates to mediate the interaction between microtubules and other cell structures. Although they belong to classical MAPs, multiple interactions and variable complexes besides their microtubule-plus-end interaction were described in animals (Akhmanova and Hoogenraad, 2005, Akhmanova *et al.*, 2001). Therefore, they could be involved in plant cell division, growth and development. In plants, only EB1 and CLASP are present. In our laboratory, more attention was dedicated to CLASP due to its potential microtubule-actin interaction. Its F-actin binding activity was previously described in animals (Tsvetkov *et al.*, 2007).

Aluminum toxicity (Al) induces rapid growth inhibition in plants. At first glance, the topic might be considered as unrelated to MAP and their interacting structures, but the opposite is true. Al stress affect microtubules (Blancaflor *et al.*, 1998, Sasaki *et al.*, 1997, Schwarzerová *et al.*, 2002, Sivaguru *et al.*, 1999a, Sivaguru *et al.*, 2003), and also other structures, for example plasma membrane (Sivaguru *et al.*, 1999a, Sivaguru *et al.*, 1999b), in different ways. Understanding of the interaction mechanisms or mediating proteins between these two structures and identification of the processes involved in rapid growth inhibition induced by Al could lead to better understanding of the events involved in plant cell signaling and growth under specific conditions.

2 Aims

1. The aim was to identify new microtubule associated proteins mediating the interaction of microtubule cytoskeleton and other cellular structures and to describe their role in plant cell.

1.1. After biochemical identification of microtubule- and plasma membrane-associated proteins, Hsp90 (heat shock protein 90) was chosen for further studies of its role on microtubules.

Partial aims:

- To create BY-2 cell line stably expressing the specific microtubule-binding Hsp90 fused with a fluorescent marker (GFP-Hsp90_MT)
- To characterize the GFP-Hsp90_MT expressing cell line
- To determine the localization of GFP-Hsp90_MT in BY-2
- To describe the Hsp90_MT specific role on microtubules
- To express and purify the recombinant Hsp90_MT and confirm its direct binding to microtubules and tubulin.

1.2. Based on the data published for animal cells, CLASP (CLIP associated protein) was chosen for further study of its role in plant cells.

Partial aims:

- To clone the tobacco *CLASP*
- To create the fluorescent fusion constructs for localization studies, to create BY-2 cell line stably expressing CLASP-fluorescent fusion protein
- To characterize the fluorescent fusion protein expressing cell line
- To determine the localization of CLASP in BY-2
- To find the structures or proteins interacting with CLASP in plant cells

2. To determine the early targets of aluminum toxicity in plants.

Partial aims:

- To cultivate *Arabidopsis* plants in hydropony and to observe the effect of aluminum on their root growth during the first 30 minutes

- To test the early effect of aluminum on the organization of cortical microtubules in *Arabidopsis* roots
- To test the effect of microtubule stabilization on the *Arabidopsis* root growth
- To focus on the effect of aluminum on membrane structures

3 Results and discussion

3.1 Identification of the new microtubule-associated proteins

We used different methods to identify new microtubule-associated proteins. We were interested in proteins binding also other structures besides microtubules and therefore being possibly involved in specific functions in plant cell. Firstly, we were interested in microtubule and plasma membrane-interacting partners. The proteins isolated from membrane ghosts or microsomal fraction from BY-2 cells were co-sedimented with microtubules. By these approaches, only proteins that do not belong to classical conserved MAPs were identified. The identified proteins were metabolic (for instance GAPDH, phosphoglycerate kinase) or translation enzymes (for instance elongation factor 2 (EF 2)), chaperones (Hsp70, Hsp90) and plant specific proteins (DREPP (developmentally regulated plasma membrane polypeptide)). Although these proteins were repeatedly found in microtubule-interacting extracts, no attention was given them as MAPs for a long time. Regarding their other interactions in the cell, it is not easy to determine their role related to microtubules. Their role on microtubules may be masked by their other prominent function or the protein cannot fulfill its role on microtubules without the presence of its other interacting partners or specific physiological conditions.

In our group, the role of Hsp90 on microtubules was further studied. Some of the proteins identified as microtubule-interacting proteins, *i.e.* Hsp70 and GAPDH, were later identified as Hsp90_MT interacting proteins in our experiments, too. Several independent identifications of these proteins as microtubule-interacting proteins or as a members of microtubule-interacting complexes call for a proposal of their interaction network scheme and for detailed study of their physiological roles related to microtubules.

We were further interested in proteins that are known to bind microtubules and also other structures in animal cells, +TIPs. +TIPs are classical MAPs and are known to mediate interactions between microtubules and actin, cortical region and other cell structures (Akhmanova *et al.*, 2001; Akhmanova and Hoogenraad, 2005). Interestingly, some +TIPs homologues are missing in plants. Thus, the two TIPs known in plants, EB1 and CLASP, might fulfill the roles of the missing ones or might have other specific functions related to specific microtubular structures in plants. The F-actin binding activity was described for CLASP in animals (Tsvetkov *et al.*, 2007). Therefore, we further

studied its potential role as mediator of microtubule interaction with other structures in plant cells.

3.2 The role of Hsp90-microtubule interaction in plant cell

Among the proteins isolated from BY-2 membrane ghosts and further co-sedimented with microtubules, the member of Hsp90 family was identified. Our colleagues from Karlsruhe identified its homologue from rice as microtubule- (via taxol co-sedimentation) as well as tubulin- (via EPC-affinity chromatography) associated protein. These specific isoforms with the ability to bind microtubules were called NtHsp90_MT and OsHsp90_MT.

Cytosolic Hsp90 are highly conserved and harbor characteristic features. These include highly conserved N-terminal ATP-binding domain, putative casein-kinase II binding motif KEISDDE, C-terminal MEEVD motif mediating the binding of co-chaperones (Krishna and Gloor, 2001, Meyer *et al.*, 2003) and immunophilins (Young *et al.*, 2001), and ten conserved sequence blocks diagnostic for cytosolic Hsp90 species (Krishna and Gloor, 2001).

The main differences among the Hsp90 proteins were located in two variable stretches that are rich in glutamic-acid residues (the variable KE-rich regions). Similar KE-containing-repeats have been found to mediate MT-binding in the neural MAP1B (Noble *et al.*, 1989), and have been inferred to mediate the binding of tubulin in the plant MAP AtMAP18 (Wang *et al.*, 2007). Since the main differences between Hsp90 isoforms are found in these regions and our specific microtubule-binding Hsp90_MTs are more similar to MAP18 than to other Hsp90s in this region, this motif might be responsible for microtubule-binding. However, the prediction of the MT-binding region of Hsp90 MTs is currently based only on alignments and needs to be experimentally verified using truncated proteins.

For specific microtubule-binding Hsp90 from tobacco (NtHsp90_MT), the construct for overexpression was created and the recombinant His-tagged protein was purified on Ni-NTA column. The recombinant Hsp90_MT co-sedimented with microtubules *in vitro*. Since Hsp90 was identified also as tubulin-binding protein by EPC-affinity chromatography, the possibility of its binding to tubulin heterodimers during the *in vitro* co-sedimentation assay and thus reducing the amount of molecules co-sedimenting with microtubules to pellet was tested. Indeed, the ratio between Hsp90 MT co-

sedimented with microtubules and that remaining in the supernatant can be shifted in favor of microtubule-co-sedimented recombinant protein, if unpolymerized tubulin is removed from the reaction in an *in vitro* co-sedimentation assay. The ability of Hsp90_MT to bind tubulin heterodimers was further confirmed by protein G immunoprecipitation assay, where Hsp90_MT bound tubulin heterodimers under non-polymerizing conditions (4°C).

Hsp90 has an N-terminal ATP-binding pocket responsible for the activation of its client proteins (Grenert *et al.*, 1999, Pearl and Prodromou, 2000). The specific inhibitor of Hsp90, geldanamycin (GDA), binds to the same domain and thus inhibits the binding of client proteins (Neckers *et al.*, 1999). Therefore, the ability of ATP to increase and the ability of GDA to decrease the amount of Hsp90_MT co-sedimenting with microtubules was tested. Neither ATP nor GDA changed the amount of Hsp90_MT bound to microtubules and co-sedimenting with them to pellet. GDA did not block the binding of Hsp90_MT to tubulin heterodimers. Thus, for binding of microtubules and tubulin, is responsible other domain than ATP-binding pocket. This contributes to our previous suggestion that the KE-rich repeat might be responsible for microtubule binding.

The specific microtubule-binding Hsp90 isoforms (NtHsp90_MT and OsHsp90_MT) were fused with GFP and fusin proteins were stably expressed under 35S promoter in BY-2 cell line. The localization of GFP-Hsp90_MT was observed *in vivo* and *in situ* after immunofluorescent staining of microtubules. The GFP-Hsp90 MT revealed a characteristic interdigitated structure and was confined to a narrower zone in the region of growing phragmoplast *in vivo*. During the phragmoplast maturation, the GFP-Hsp90_MT detached from its edges, its signal decreased and became more diffuse. After the immunofluorescent staining of microtubules in BY-2, the GFP-Hsp90_MT was observed in phragmoplast, and also in the preprophase band and spindle region, although less clearly. The co-localization with cortical microtubules was obscure *in vivo* and *in situ*, probably due to strong GFP-Hsp90_MT signal from cytoplasm. The observation of the co-localization might be also difficult due to high dynamics, short duration and rather weak association of Hsp90_MT with microtubules. Therefore, membrane ghosts from GFP-Hsp90_MT expressing BY-2 cells were isolated and immunostained for microtubules to avoid the excessive GFP-Hsp90_MT signal from cytoplasm. In these membrane structures, the GFP-Hsp90_MT clearly co-localized with cortical

microtubules. Interestingly, when the cells were cold treated and then allowed to recover their microtubular network, the co-localization was more pronounced.

However, the function of Hsp90_MT on microtubules was still unresolved. The overexpression of GFP-Hsp90_MT under 35S promoter in BY-2 did not reveal any function, since it had no phenotypic effect. Therefore we inhibited the Hsp90 function pharmacologically by GDA. Under control conditions, GDA itself had no effect on cell viability during 5 h or 2 days. Its effect on viability appeared at the moment when other stress factor, *i. e.* cold or heat, was present. Under stress conditions, Hsp90 probably fulfills its molecular chaperon function and while it is inhibited by GDA, the cells lose their abilities to repair damaged proteins and die during 3-5 h. Nevertheless, GDA has an interesting effect after 2 days treatment. GDA does not decrease cell viability, but induces the same cytological changes in all tested cell lines – disappearance of cytoplasmic strands. Observation of different cellular structures revealed changed localization of GFP-Hsp90_MT and depolymerized actin filaments. The organization of microtubules, endoplasmic reticulum, protein CLASP is not affected. Since the disappearance of cytoplasmic strands in BY-2 was observed after treatment with latrunculin, the actin-depolymerizing drug (Van Gestel *et al.*, 2002), it may be interesting to study the effect of Hsp90 inhibition on actin cytoskeleton.

First, the effect of Hsp90 inhibition is pronounced only during additional stress in the cells, second, consistently with this, no changes in microtubule organization were observed during GDA treatment under control conditions and third, the localization of GFP-Hsp90_MT on microtubules was more pronounced after cold treatment and even more after microtubule recovery from cold. Therefore, we focused on Hsp90_MT function on microtubules after their recovery from cold treatment. During cold treatment, microtubules depolymerize (Schwarzerová *et al.*, 2006). Upon rewarming, new microtubule network is re-established within minutes. If the Hsp90_MT is necessary in microtubule re-organization processes, it may be expected that its inhibition by GDA will be manifested during microtubule recovery after cold stress. And, indeed, this was the case. 1.78 μ M GDA inhibited microtubule recovery in both tested lines (GFP-Hsp90_MT and free GFP expressing line). In lower GDA concentration (178 nM), the GFP-Hsp90_MT overexpressing cells recovered their microtubules more properly than free GFP expressing cells, probably due to higher amount of Hsp90 molecules. Therefore we suggest that Hsp90 is involved in microtubule recovery after cold stress. In animals,

Hsp90 is also involved in microtubule recovery, is a core centrosomal component and together with other interacting proteins is involved in microtubule nucleation (de Carcer, 2004, de Carcer *et al.*, 2001; Glover, 2005; Lange *et al.*, 2000). It is possible that in acentrosomal plant cells, Hsp90_{MT} might play the role in dispersed microtubule nucleation sites (Murata *et al.*, 2005) and to act in concert with other microtubule-nucleating proteins. Further studies of the role of Hsp90 in microtubule nucleation in acentrosomal plants and characterization of its interacting partners may lead to better understanding of plant microtubule-nucleation mechanism.

Our experiments with the inhibitor of Hsp90 GDA show the involvement of Hsp90 in cell cycle progression. In non-plant cells, the inhibition is followed by subsequent cell cycle arrest in different stages. Molecular mechanisms of these effects differ depending of the cell type (Zajac *et al.*, 2008) Although it is likely that the role of Hsp90 in the regulation of the cell cycle is widespread in eukaryotic cells, the exact molecular mechanism of the effect of Hsp90 inhibition on the mitosis inhibition in tobacco cells needs further investigation. Our results suggest that BY-2 cells are blocked in the G1 phase. Therefore, GDA blocks the cell cycle progression before mitotic array assembly in tobacco cells. In contrast to animal cells, mitotic arrays are not affected by GDA treatment in plants (our results). It remains to be established whether the MT-binding function of Hsp90 and the cell cycle progression block are related or independent processes controlled by Hsp90.

3.3 The localization of CLASP and its interactions with other cellular structures in BY-2

CLASP is +TIP and in animals, it is found on microtubule plus-ends targeting them to the cortical region (Akhmanova *et al.*, 2001). Due to its ability to bind F-actin in animals (Tsvetkov *et al.*, 2007), its plant homologue was chosen for further studies as potential mediator of microtubule-interaction with other cell structures.

From 3 d-old BY-2 cell c DNA, the full-length unknown *NtCLASP* sequence was amplified and confirmed by sequencing. Fluorescent fusion proteins for localization studies - mCherryCLASP and GFP-CLASP and BY-2 cell line stably expressing GFP-CLASP under 35S promoter were created. The GFP-CLASP expressing cells are wider and start to divide on the first day with mitotic peak on the second day after subcultivation, then their mitotic activity decreases rapidly. The control untransformed

cells divide predominantly on second and third day after subcultivation. Our results show that the increased width of GFP-CLASP expressing cells is independent on the earlier cell cycle progression. The untransformed BY-2 wt cells are of smaller width during their mitotic peak. Nevertheless, the effect of cell division and GFP-CLASP overexpression on cell width could be separated using cell line with inducible GFP-CLASP expression. This cell line is under preparation. The increase of mitotic activity and wider cells in GFP-CLASP overexpressing cells is consistent with the decreased cell division and smaller cells in *Arabidopsis clasp-1* mutant (Ambrose *et al.*, 2007). Therefore, CLASP is probably involved in plant cell expansion.

In plants, CLASP is found according to its expression level in immobile dots probably corresponding to microtubule plus-ends or more often along the whole microtubules. Under high expression level, it forms circles in the cortical region (Ambrose *et al.*, 2007; Kirik *et al.*, 2007; our results). Between plant CLASPs and their animal counterparts, there is a difference in the mobility on microtubule-plus ends. In contrast to the visible movement in animals (Akhmanova *et al.*, 2001), CLASP in plants is rather static (the movement was observed only during low expression (Ambrose *et al.*, 2007)) and also its localization on microtubule-plus ends is relatively low (Ambrose *et al.*, 2007; our results). On the contrary, the preferred localization of CLASP along the whole microtubules and its immobility may refer to its specific functions in plant cell corresponding to the different organization of microtubule cytoskeleton.

Since CLASP is primarily microtubule-associated protein, the organization of cortical microtubule array was observed in wt and GFP-CLASP expressing cells. The organization of immunofluorescently stained microtubules is the same in both lines. Strikingly, CLASP localized on cell borders between adjacent cells. The selectivity of this localization resembles the CLASP specificity in motile animal cells, where it was localized in the cortical region at the leading edge (Akhmanova *et al.*, 2001). Our experiments with plasmolyzed cells showed that the localization is independent on localization of plasmodesms. We further tested the possible function of CLASP as molecular marker for growing cell plate at the cortical division site. However, the localization at the cell borders is independent on the cell age, and the observation of growing phragmoplast did not reveal any localization at the plasma membrane of the mother cell before it fuses with the cell plate. CLASP was found only on the phragmoplast edges. We concluded that CLASP does not function as molecular marker

for growing cell plate at the site of former preprophase band. Since the co-localization of GFP-CLASP with FM4-64 stained plasma membranes was observed, these two structures may interact at the cell borders of adjacent cells.

This is consistent with previous findings that CLASP is involved in attachment of microtubules to the cortical region in plant and in animal cells (Akhmanova *et al.*, 2001; Ambrose and Wasteneys, 2008). The localization at the cell borders is also consistent with the localization of AtCLASP in root cells (Ambrose *et al.*, 2011). The authors address the role of the localization to the stabilization of microtubules at sharp cell edges, where CLASP prevents microtubule catastrophes. In *clasp-1 Arabidopsis* mutants, the cells have more rounded edges and hyperparallel microtubules, because everytime the microtubule touches the cell edge, the catastrophe occurs. CLASP is therefore involved in microtubule-bundles organization in plant cells lacking microtubule-organizing centre (Ambrose and Wasteneys, 2008; Ambrose *et al.*, 2011). Recently, it was shown that CLASP is involved in positioning of preprophase band and the orientation of cell division depending on the MAP65 expression level, auxin transport and the function of transcription factors PLETHORA (Dhonukshe *et al.*, 2012).

CLASP belongs to the group of +TIP, the group of proteins mediating interactions between microtubules and other cell structures. For human CLASP homologue, the association with F-actin was shown (Tsvetkov *et al.*, 2007). The interaction of both cytoskeletal structures is important in many cellular processes including cell division, growth and plant organ development and probably involves other interacting proteins, too. CLASP might be one of these interacting proteins. In plants, the localization on actin filaments has not been shown yet, but it was tested only by using latrunculin, an actin depolymerizing drug (Ambrose *et al.*, 2007). Our results based on immunofluorescent staining of actin filaments in GFP-CLASP expressing BY-2 cell line and on infiltration of fluorescent markers (GFP-CLASP or mCherry-CLASP together with mCherry-fimbrin or GFP-fimbrin, respectively) to tobacco epidermis cells reveal scarce co-localization of these structures in the cortical region. The sites of co-localization might reveal the close encounters of microtubules and actin filaments. The co-localization is not very prominent and the artefacts induced by fluorescent markers overexpression are possible (CLASP is localized along the whole microtubules), however, this is the first evidence of possible interaction between CLASP and actin filaments *in vivo* and *in situ*. The direct interaction

of all three structures, microtubules, CLASP and actin filaments remains to be further tested.

3.4 The rigidification of plasma membrane is one of the early effects of aluminum toxicity in plant cell

In plant cell, plasma membrane and microtubules interact directly or indirectly during many processes, such as signaling, growth and development. Following results may contribute to better understanding of the cellular events including changes on plasma membrane and microtubules under specific conditions of aluminum toxicity (Al). Al induces root growth inhibition, but mechanism of root growth cessation remains unclear. Plasma membrane and microtubules were considered to be the structures that are involved in root growth inhibition during Al toxicity. According to our results, we propose that only the plasma membrane and membrane related processes are early targets of Al toxicity in root cells.

3.4.1 Al rapidly inhibits the Arabidopsis root growth and induces the root cell depolarization

Root growth inhibition and plasma membrane depolarization represent one of the earliest phenomena of Al toxicity in different plant species (Barcelo and Poschenrieder, 2002; Verstraeten and Oteiza, 2000). The hydroponic cultivation systems enabled us to change quickly the growth medium, it ensured rapid and uniform access of test solutions to the roots, and it facilitated immediate observation of the roots under a microscope. A dramatic inhibition of root growth became apparent during the first two minutes of exposure to 100 μM AlCl_3 , which is, to our knowledge, the fastest growth response to Al reported so far. Our measurements further show almost immediate plasma membrane depolarization in root tip epidermal cells. Membrane depolarization, detected by increased fluorescence of the transmembrane potential fluorescence probe DiSBAC2(3), was consistent with Al-induced rapid changes in roots (Sivaguru *et al.*, 1999a; Sivaguru *et al.*, 1999b). Therefore, the effects of Al observed in our experimental model are in good accordance with the effects described in other plant species and experimental conditions.

The dramatic inhibition of root growth by Al was in sharp contrast with the acceleration of growth in the minimal medium of 1% sucrose without Al, which produced

almost 200% increase in growth rate relative to that in MS medium. The acceleration of growth could be the result of the sudden change of replacing the MS medium with the osmotically less active minimal medium of 1% sucrose, leading to turgor pressure-driven acceleration in cell expansion. After 24 h of cultivation, plants cultivated in 1% sucrose showed reduced root length relative to that in MS medium (see Fig. S2), consistent with the observation that the acceleration of growth was transient. Nevertheless, considering the initial acceleration of growth, the Al-induced inhibition was remarkably effective.

3.4.2 Al-induced membrane rigidization contributes to the inhibition of root growth

Al was reported to increase membrane rigidity of membranes reconstituted *in vitro* from synthetic lipids or lipids isolated from brain tissues (Verstraeten *et al.*, 1997). Similarly, our spectrofluorometric measurements showed that Al increased the rigidity of *A. thaliana* plasma membranes *in vitro*. During *in vitro* spectrofluorometric measurements, the membrane fluidity decrease occurred immediately after Al addition. The addition of benzyl alcohol that alleviates the rigidization effect of Al results in immediate root growth reconstitution. These results demonstrate that Al-induced membrane rigidization contributes substantially to the rapid cessation of root growth during Al stress. Since the application of benzyl alcohol only partially restored root growth, membrane rigidization was probably not the only cause of root growth inhibition. Indeed, the ameliorating effect of benzyl alcohol was absent during prolonged cultivation of roots in Al-containing medium. This can be explained by the fact that the effect of Al on plasma membrane fluidity could trigger some other effects during early phases of Al stress. For instance, oxidative stress and changes in phosphoinositide metabolism in plasma membrane were reported to occur early during Al exposure in root cells (Kaneko *et al.*, 2007; Verstraeten and Oteiza, 2000; Verstraeten and Oteiza, 2002). Therefore, we suggest that the plasma membrane rigidization probably lies at the beginning of the cascade of events that occur during Al stress in root cells. Considering the biological importance of the plasma membrane, we hypothesize that the effect of Al on its properties could underlie Al toxicity in eukaryotes in general.

3.4.3 Endocytosis is inhibited within 10 min of Al stress

In order to search for another early effect of Al-treatment that could be responsible, together with the loss of membrane fluidity, for rapid root growth inhibition, we studied the process of endocytosis in epidermal cells of the root tip using the fluorescent marker FM4-64 (Aniento and Robinson, 2005). Pre-treatment with 100 μ M Al for 10 min was sufficient to induce changes at the plasma membrane that resulted in the inhibition of endosomes formation even after the Al washout. Al-induced inhibition of FM4-64 internalization by endosomes in *Arabidopsis* root cells was previously reported by Illes *et al.* (2006) as an absence of brefeldin A-induced, fused endosomal compartments following a 90-min treatment with Al. In root meristematic cells of Al-sensitive variety of maize, however, the formation of brefeldin A compartments was blocked within 30 min of Al treatment (Amenos *et al.*, 2009). In order to answer a question if endocytosis could be responsible for quick root growth inhibition within minutes, we used the drug brefeldin A that interferes with the vesicle trafficking to study its early effect on root growth. Our experiments using 50 μ M brefeldin A showed that the inhibition of vesicle transport in root cells resulted in root growth retardation during first 30 min of the treatment. Root growth cessation was gradual with distinct retardation at the end of 30 min. This suggests that active processes of vesicle trafficking were necessary for root growth. It is important to mention that brefeldin A is a general inhibitor of vesicle trafficking, whereas our experiments showed that endocytotic pathway is affected by Al and other pathways were not investigated. Nevertheless, our results clearly indicated that vesicle trafficking might be one of the primary targets of Al stress that could contribute to Al-induced root growth inhibition during first 30 min.

3.4.4 Al stabilizes microtubules against low pH-induced disruption

Cortical microtubules are cytoskeletal structures found under the plasma membrane. The tight interaction of cortical microtubules with the plasma membrane is necessary for the control of the cell wall remodeling in growing cells (Paredes *et al.*, 2006). As dynamic structures, microtubules can quickly respond to extracellular factors and thus mediate a fast growth response. Several studies have reported reorganization, disorganization, or stabilization of microtubules during Al treatment in various plant cells and tissues (Blancaflor *et al.*, 1998; Schwarzerová *et al.*, 2002; Sivaguru *et al.*, 1999a; Sivaguru *et al.*, 2003; Sasaki *et al.*, 1997). This variation can be attributed to several factors including tissue-specificity, species-specificity, physiological maturity of the

tissue, and the severity and duration of the Al treatment. In our experiments, the treatment with 100 μM Al clearly stabilized cortical microtubules in lateral root cap cells or epidermal cells in the root tip during the first 30 min of exposure against low pH-induced randomization. The randomization or depolymerization of microtubules in response to low pH was described in *Nitella* internodes (Kropf *et al.*, 1997) and lettuce roots (Takahashi *et al.*, 2003). In the latter study, low pH-induced randomization of microtubules induced the formation of root hairs (Takahashi *et al.*, 2003) presumably because the microtubule reorganization is needed for root hair initiation (Van Bruaene *et al.*, 2004). The reorganization of microtubules induced by low pH can be therefore considered as a physiological reaction, which was blocked by Al in our experiments. The Al-induced initial stabilization of microtubules in our experiments was followed by gradual disorganization and depolymerization over the period of 6 h, after which only few microtubules remained.

Our results show that fast changes in microtubule bundles are not connected with rapid root growth inhibition induced by Al. First, the randomization and depolymerization of microtubules occurred at low pH irrespective of the type of the medium, whereas acceleration of root growth occurred only in the minimal medium of 1% sucrose in our experiments. Therefore, the cell expansion was uncoupled from the organization of the cortical microtubule array in this case and transversally oriented cortical microtubules were not required for rapid root growth. Second, in order to study a possible involvement of microtubule stabilization in the root growth inhibition, we exposed roots to 40 μM taxol. We observed that during first 30 min of the treatment, no retardation of the growth occurred and the root growth rate increased to nearly 200%, suggesting that root growth processes were uncoupled from the organization of microtubule arrays also in this case.

Al-induced destabilization of microtubules later during Al stress could play an important role during prolonged Al stress (hours to days of exposure). Similarly the oryzalin-induced destabilization of microtubules resulted in changes of root morphology (Chang *et al.*, 1999). However, our experiments suggested that neither the loss of microtubules observed in roots grown in the medium with low pH, nor microtubule stabilization with 40 μM taxol at pH 5.8 had an immediate effect on the root growth rate during first 30 min of exposure. Under both conditions, roots exhibited increased root growth comparable to control medium of 1% sucrose, pH 5.8. Therefore we concluded that Al induced early changes in cortical microtubules in *Arabidopsis* root cells, but that

this effect was probably not responsible for root growth inhibition during first 30 min of Al treatment.

3.4.5 Multiple target sites of Al in plant cells

Using the method of precise timing of the root tip treatment and the root growth rate measurements we showed that the loss of plasma membrane fluidity and endocytosis inhibition were involved in quick root growth inhibition under Al stress. The relationship between Al-induced membrane fluidity changes and endocytosis remains to be tested, however, our results support the hypothesis that Al may interfere with target multiple processes and sites in plant cells that may be responsible for quick inhibition of the root growth. For example, it is clear that Al targets apoplastic structures as well (for review see (Poschenrieder *et al.*, 2008)), where pectins were shown to bind substantial portion of Al (Chang *et al.*, 1999) and their Al-induced redistribution coincided with root growth inhibition in maize (Li *et al.*, 2009). More research is needed to identify all factors contributing to root growth inhibition under Al stress.

3.4.6 Conclusion

In conclusion, we have shown that Al induced loss of fluidity of the plasma membrane, the inhibition of endocytosis in the epidermal cells, and induced changes in microtubular organization in the lateral root cap cells and epidermal cells of the *Arabidopsis* root tip within the scale of minutes. We further showed that the loss of plasma membrane fluidity was involved in quick root growth inhibition within 30 min and we propose that the plasma membrane and membrane-related processes such as vesicle trafficking are early targets of Al toxicity in root cells.

4 Conclusion

4.1 Identification of new MAPs

- The proteins interacting with microtubules and plasma membrane were identified using biochemical methods. The identified proteins included enzymes or chaperones (GAPDH, phosphoglycerate kinase, EF2, Hsp90, *etc.*) and plant specific proteins (DREPP).
- Literature studies indicated CLASP (+TIP protein) as potential candidate for mediating interaction between microtubules and actin filaments in plants.

4.1.1 Hsp90 is associated with microtubules and is involved in their reorganization

- Cell lines stably expressing GFP in fusion with specific microtubule-binding Hsp90s (GFP-NtHsp90_MT a GFP-OsHsp90_MT) were established.
- The cells of newly established line did not reveal any striking phenotype.
- GFP-Hsp90_MT in BY-2 was found on phragmoplast, on preprophase band, spindle and on cortical microtubules.
- Hsp90 is involved in microtubule cytoskeleton recovery after cold treatment.
- Hsp90 plays role in cell cycle progression in plants, the inhibition of Hsp90 induces the cell cycle arrest in G1 phase.
- Recombinant Hsp90_MT was expressed and purified. It binds to microtubules and tubulin dimers *in vitro*.

4.1.2 The role of CLASP in plant cells

- Full-length *CLASP* was amplified and sequenced from tobacco BY-2 cell line cDNA.
- Fluorescent markers mCherry-CLASP and GFP-CLASP were created.
- The cell line stably expressing GFP-CLASP was established.
- The cells of GFP-CLASP cell line were wider and divided earlier within the subcultivation period comparing to untransformed BY-2 cells.

- CLASP was found to localize on cortical microtubules, preprophase band and phragmoplast in BY-2 cells. It has a prominent localization on the cell borders of adjacent cells.
- Our results indicate that CLASP might interact with plasma membrane and actin filaments in plant cells.

4.2 The early effect of aluminum toxicity in *Arabidopsis* roots

- *Arabidopsis* plants were cultivated in hydropony. The root growth inhibition was observed after 2 min of Al treatment.
- Al stabilizes cortical microtubules during first 30 min of Al treatment in *Arabidopsis* roots.
- Microtubule stabilization by taxol induces no effect in root growth during the first 30 min, therefore, the Al-induced microtubule stabilization is not the primary cause of root growth inhibition.
- Al induces loss of plasma membrane fluidity, endocytosis inhibition in the root epidermal cells and induces changes in microtubular organization in *Arabidopsis* lateral root cap and epidermal root cells within the scale of minutes. The loss of plasma membrane fluidity is involved in rapid root growth inhibition within 30 min. We propose that the plasma membrane and membrane-related processes are early targets of Al toxicity in root cells.

5 References

- Akhmanova, A. and Hoogenraad, C.C.** (2005) Microtubule plus-end-tracking proteins: mechanisms and functions. *Current Opinion in Cell Biology*, **17**.
- Akhmanova, A., Hoogenraad, C.C., Drabek, K., Stepanova, T., Dortland, B., Verkerk, T., Vermeulen, W., Burgering, B.M., De Zeeuw, C.I., Grosveld, F. and Galjart, N.** (2001) CLASPs are CLIP-115 and-170 associating proteins involved in the regional regulation of microtubule dynamics in motile fibroblasts. *Cell*, **104**.
- Ambrose, C., Allard, J.F., Cytrynbaum, E.N. and Wasteneys, G.O.** (2011) A CLASP-modulated cell edge barrier mechanism drives cell-wide cortical microtubule organization in Arabidopsis. *Nature Communications*, **2**.
- Ambrose, J.C., Shoji, T., Kotzer, A.M., Pighin, J.A. and Wasteneys, G.O.** (2007) The Arabidopsis CLASP gene encodes a microtubule-associated protein involved in cell expansion and division. *Plant Cell*, **19**.
- Ambrose, J.C. and Wasteneys, G.O.** (2008) CLASP Modulates Microtubule-Cortex Interaction during Self-Organization of Acentrosomal Microtubules. *Molecular Biology of the Cell*, **19**.
- Amenos, M., Corrales, I., Poschenrieder, C., Illes, P., Baluka, F. and Barcelo, J.** (2009) Different Effects of Aluminum on the Actin Cytoskeleton and Brefeldin A-Sensitive Vesicle Recycling in Root Apex Cells of Two Maize Varieties Differing in Root Elongation Rate and Aluminum Tolerance. *Plant and Cell Physiology*, **50**, 528-540.
- Aniento, F. and Robinson, D.G.** (2005) Testing for endocytosis in plants. *Protoplasma*, **226**, 3-11.
- Barcelo, J. and Poschenrieder, C.** (2002) Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a review. *Environmental and Experimental Botany*, **48**, 75-92.
- Blancaflor, E.B., Jones, D.L. and Gilroy, S.** (1998) Alterations in the cytoskeleton accompany aluminum-induced growth inhibition and morphological changes in primary roots of maize. *Plant Physiology*, **118**, 159-172.
- Buschmann, H. and Lloyd, C.W.** (2008) Arabidopsis Mutants and the Network of Microtubule-Associated Functions. *Molecular Plant*, **1**, 888-898.
- Chang, Y.C., Yamamoto, Y. and Matsumoto, H.** (1999) Accumulation of aluminium in the cell wall pectin in cultured tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) cells treated with a combination of aluminium and iron. *Plant Cell and Environment*, **22**, 1009-1017.
- de Carcer, G.** (2004) Heat shock protein 90 regulates the metaphase-anaphase transition in a polo-like kinase-dependent manner. *Cancer Research*, **64**, 5106-5112.
- de Carcer, G., Avides, M.D., Lallena, M.J., Glover, D.M. and Gonzalez, C.** (2001) Requirement of Hsp90 for centrosomal function reflects its regulation of Polo kinase stability. *Embo Journal*, **20**, 2878-2884.
- Dhonukshe, P., Weits, D.A., Cruz-Ramirez, A., Deinum, E.E., Tindemans, S.H., Kakar, K., Prasad, K., Mahonen, A.P., Ambrose, C., Sasabe, M., Wachsmann, G., Luijten, M., Bennett, T., Machida, Y., Heidstra, R., Wasteneys, G., Mulder, B.M. and Scheres, S.** (2012) A PLETHORA-Auxin Transcription Module Controls Cell Division Plane Rotation through MAP65 and CLASP. *Cell*, **149**, 383-396.

- Freudenreich, A. and Nick, P.** (1998) Microtubular organization in tobacco cells: Heat-shock protein 90 can bind to tubulin in vitro. *Botanica Acta*, **111**, 273-279.
- Galjart, N.** (2010) Plus-End-Tracking Proteins and Their Review Interactions at Microtubule Ends. *Current Biology*, **20**.
- Glover, D.M.** (2005) Polo kinase and progression through M phase in *Drosophila*: a perspective from the spindle poles. *Oncogene*, **24**, 230-237.
- Grenert, J.P., Johnson, B.D. and Toft, D.O.** (1999) The importance of ATP binding and hydrolysis by hsp90 in formation and function of protein heterocomplexes. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 17525-17533.
- Ho, A.Y.Y., Day, D.A., Brown, M.H. and Marc, J.** (2009) Arabidopsis phospholipase D delta as an initiator of cytoskeleton-mediated signalling to fundamental cellular processes. *Functional Plant Biology*, **36**, 190-198.
- Illes, P., Schlicht, M., Pavlovkin, J., Lichtscheidl, I., Baluska, F. and Ovecka, M.** (2006) Aluminium toxicity in plants: internalization of aluminium into cells of the transition zone in Arabidopsis root apices related to changes in plasma membrane potential, endosomal behaviour, and nitric oxide production. *Journal of Experimental Botany*, **57**, 4201-4213.
- Kaneko, N., Sugioka, T. and Sakurai, H.** (2007) Aluminum compounds enhance lipid peroxidation in liposomes: Insight into cellular damage caused by oxidative stress. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **101**, 967-975.
- Kirik, V., Herrmann, U., Parupalli, C., Sedbrook, J.C., Ehrhardt, D.W. and Huelskamp, M.** (2007) CLASP localizes in two discrete patterns on cortical microtubules and is required for cell morphogenesis and cell division in Arabidopsis. *Journal of Cell Science*, **120**.
- Krishna, P. and Gloor, G.** (2001) The Hsp90 family of proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Stress & Chaperones*, **6**, 238-246.
- Kropf, D.L., Williamson, R.E. and Wasteneys, G.O.** (1997) Microtubule orientation and dynamics in elongating characean internodal cells following cytosolic acidification, induction of pH bands, or premature growth arrest. *Protoplasma*, **197**, 188-198.
- Lange, B.M.H., Bachi, A., Wilm, M. and Gonzalez, C.** (2000) Hsp90 is a core centrosomal component and is required at different stages of the centrosome cycle in *Drosophila* and vertebrates. *Embo Journal*, **19**, 1252-1262.
- Li, Y.Y., Yang, J.L., Zhang, Y.J. and Zheng, S.J.** (2009) Disorganized distribution of homogalacturonan epitopes in cell walls as one possible mechanism for aluminium-induced root growth inhibition in maize. *Annals of Botany*, **104**, 235-241.
- Meyer, P., Prodromou, C., Hu, B., Vaughan, C., Roe, S.M., Panaretou, B., Piper, P.W. and Pearl, L.H.** (2003) Structural and functional analysis of the middle segment of Hsp90: Implications for ATP hydrolysis and client protein and cochaperone interactions. *Molecular Cell*, **11**, 647-658.
- Murata, T., Sonobe, S., Baskin, T.I., Hyodo, S., Hasezawa, S., Nagata, T., Horio, T. and Hasebe, M.** (2005) Microtubule-dependent microtubule nucleation based on recruitment of gamma-tubulin in higher plants. *Nature Cell Biology*, **7**, 961-U952.
- Neckers, L., Schulte, T.W. and Mimnaugh, E.** (1999) Geldanamycin as a potential anti-cancer agent: Its molecular target and biochemical activity. *Investigational New Drugs*, **17**, 361-373.

- Noble, M., Lewis, S.A. and Cowan, N.J.** (1989) The microtubule binding domain of microtubule-associated protein MAP1B contains a repeated sequence motif unrelated to that of MAP2 and tau. *Journal of Cell Biology*, **109**, 3367-3376.
- Paredez, A.R., Somerville, C.R. and Ehrhardt, D.W.** (2006) Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules. *Science*, **312**, 1491-1495.
- Pearl, L.H. and Prodromou, C.** (2000) Structure and in vivo function of Hsp90. *Current Opinion in Structural Biology*, **10**, 46-51.
- Petrasek, J., Freudenreich, A., Heuing, A., Opatrny, Z. and Nick, P.** (1998) Heat-shock protein 90 is associated with microtubules in tobacco cells. *Protoplasma*, **202**, 161-174.
- Poschenrieder, C., Gunse, B., Corrales, I. and Barcelo, J.** (2008) A glance into aluminum toxicity and resistance in plants. *Science of the Total Environment*, **400**, 356-368.
- Pratt, W.B., Silverstein, A.M. and Galigniana, M.D.** (1999) A model for the cytoplasmic trafficking of signalling proteins involving the hsp90-binding immunophilins and p50(cdc37). *Cellular Signalling*, **11**, 839-851.
- Sasaki, M., Yamamoto, Y., Ma, J.F. and Matsumoto, H.** (1997) Early events induced by aluminum stress in elongating cells of wheat root (Reprinted from Plant nutrition for sustainable food production and environment, 1997). *Soil Science and Plant Nutrition*, **43**, 1009-1014.
- Schwarzerova, K., Petrasek, J., Panigrahi, K.C.S., Zelenkova, S., Opatrny, Z. and Nick, P.** (2006) Intranuclear accumulation of plant tubulin in response to low temperature. *Protoplasma*, **227**, 185-196.
- Schwarzerova, K., Zelenkova, S., Nick, P. and Opatrny, Z.** (2002) Aluminum-induced rapid changes in the microtubular cytoskeleton of tobacco cell lines. *Plant and Cell Physiology*, **43**, 207-216.
- Sivaguru, M., Baluska, F., Volkmann, D., Felle, H.H. and Horst, W.J.** (1999a) Impacts of aluminum on the cytoskeleton of the maize root apex. Short-term effects on the distal part of the transition zone. *Plant Physiology*, **119**, 1073-1082.
- Sivaguru, M., Pike, S., Gassmann, W. and Baskin, T.I.** (2003) Aluminum rapidly depolymerizes cortical microtubules and depolarizes the plasma membrane: Evidence that these responses are mediated by a glutamate receptor. *Plant and Cell Physiology*, **44**, 667-675.
- Sivaguru, M., Yamamoto, Y. and Matsumoto, H.** (1999b) Differential impacts of aluminium on microtubule organisation depends on growth phase in suspension-cultured tobacco cells. *Physiologia Plantarum*, **107**, 110-119.
- Takahashi, H., Hirota, K., Kawahara, A., Hayakawa, E. and Inoue, Y.** (2003) Randomization of cortical microtubules in root epidermal cells induces root hair initiation in lettuce (*Lactuca sativa* L.) seedlings. *Plant and Cell Physiology*, **44**, 350-359.
- Tsvetkov, A.S., Samsonov, A., Akhmanova, A., Galjart, N. and Popov, S.V.** (2007) Microtubule-binding proteins CLASP1 and CLASP2 interact with actin filaments. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, **64**.
- Van Bruaene, N., Joss, G. and Van Oostveldt, P.** (2004) Reorganization and in vivo dynamics of microtubules during arabidopsis root hair development. *Plant Physiology*, **136**, 3905-3919.

- Van Gestel, K., Kohler, R.H. and Verbelen, J.P.** (2002) Plant mitochondria move on F-actin, but their positioning in the cortical cytoplasm depends on both F-actin and microtubules. *Journal of Experimental Botany*, **53**, 659-667.
- Verstraeten, S.V., Nogueira, L.V., Schreier, S. and Oteiza, P.I.** (1997) Effect of trivalent metal ions on phase separation and membrane lipid packing: Role in lipid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **338**, 121-127.
- Verstraeten, S.V. and Oteiza, P.I.** (2000) Effects of Al³⁺ and related metals on membrane phase state and hydration: Correlation with lipid oxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **375**, 340-346.
- Verstraeten, S.V. and Oteiza, P.I.** (2002) Al³⁺-mediated changes in membrane physical properties participate in the inhibition of polyphosphoinositide hydrolysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **408**, 263-271.
- Wang, X., Zhu, L., Liu, B.Q., Wang, C., Jin, L.F., Zhao, Q. and Yuan, M.** (2007) Arabidopsis MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN18 functions in directional cell growth by destabilizing cortical microtubules. *Plant Cell*, **19**, 877-889.
- Young, J.C., Moarefi, I. and Hartl, F.U.** (2001) Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *Journal of Cell Biology*, **154**, 267-273.
- Zajac, M., Moneo, M.V., Carnero, A., Benitez, J. and Martinez-Delgado, B.** (2008) Mitotic catastrophe cell death induced by heat shock protein 90 inhibitor in BRCA1-deficient breast cancer cell lines. *Molecular Cancer Therapeutics*, **7**, 2358-2366.

6 Publications and presentation of the results

Krtková, J., Zimmermann, A., Schwarzerová, K., Nick, P. (2012) Hsp90 binds microtubules and is involved in the reorganization of microtubular network in angiosperms, *Journal of Plant Physiology*, **169**, 1329-1339.

Krtková, J. and Havelková, L., Křepelová, A., Fišer, R., Vosolsobě, S., Novotná, Z., Martinec, J., Schwarzerová, K. (2012) Loss of membrane fluidity and endocytosis inhibition are involved in rapid aluminum-induced root growth cessation in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Physiology and Biochemistry*, **60**, 88-97.

Posters:

Krtková, J., Zimmermann, A., Schwarzerová, K., Nick, P.: Hsp90 Modulates the Plasticity of Plant Microtubules, Conference on Plant Cell and Developmental Biology May 31 – June 4, 2011, Shanghai, China

Vosolsobě, S., **Kobřlová, J.**, Schwarzerová, K.: Isolation of proteins mediating the interaction between plasma membrane and microtubular cytoskeleton in: Kovařík, A. et al. [eds]: Bulletin of the Czech Society for Experimental Plant Biology (ČSEBR). 5th conference of Methods in Plant Sciences, book of abstracts. Prague 2009. ISSN 1213-6670.

Kobřlová, J., Schwarzerová, K.: A novel method for isolation of proteins potentially interacting with plasma membrane and cortical cytoskeleton, in *Book of Abstracts*, XVI Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology. *Tampere*, Finland 2008

Kobřlová, J., Křepelová, A., Vosolsobě, S., Havelková, L., Fišer, R., Novotná, Z., Martinec, J., Schwarzerová, K.: Plasma membrane fluidity is the first target of aluminum in *Arabidopsis thaliana*. In *Book of Abstracts*, XVI Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology. *Tampere*, Finland 2008

Lectures:

Krtková, J. *, Schwarzerová, K.: Characterization of tobacco CLASP, 19th Cytoskeletal Club, Vranovská Ves 2011.

Kobřlová, J., Jovanović, A., Schwarzerová, K., Nick, P.: Hsp90 interacts with microtubules, 12th Conference on Experimental Plant Biology, Prague 2010

Kobřlová, J., Jovanović, A., Schwarzerová, K., Nick, P.: Hsp90 is a microtubule-interacting protein, 18th Cytoskeletal Club, Vranovská Ves 2010

*presenting author

7 Curriculum vitae

Name	RNDr. Jana Krtková
Address	Department of Plant Physiology Faculty of Science, Charles University in Prague Viničná 5, 128 44 Prague 2 Czech Republic Tel: +420 221 951 692; Fax: +420 221 951 704 e-mail: akcni.krtecek@post.cz
Private address	Jana Zajíce 7 400 11 Ústí nad Labem Czech republic Tel: +420 605 109 147
Date of Birth	25 th September 1981
Nationality	Czech
Education:	
2011	ZOP (Zentrale Oberstufenprüfung = C2 exam, German)
2009	CAE (Certificate of Advanced English)
2007	
since 2006	Ph.D. studies, Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Experimental Plant Biology.
2006	Master of Science
2001 – 2006	Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Experimental Plant Biology
1997-2001	Gymnázium, Jateční 22, Ústí nad Labem
1990-1997	language grammar school

Expertise, research fellowships:

Jana Krtková graduated in Biology, Faculty of Science, Charles University in Prague with summa cum laude. She defended her Diploma thesis on “The role of microtubular cytoskeleton in aluminum toxicity at the Department of Experimental Plant Biology (formerly Plant Physiology). Recently, she has offered her Ph.D. thesis “Search

for mechanism and functions of the interactions of microtubular cytoskeleton with other components in plant cell” at the same department. During her MSc. and Ph.D. studies, she gained experience in light, fluorescence and confocal microscopy, image analysis, immunofluorescence and *in vivo* methods, cell culture (BY-2) and model plant cultivation ((*Arabidopsis thaliana*, *Chenopodium rubrum*, *Nicotiana benthamiana*), bioinformatics, cytological methods (protoplast and membrane ghost isolation), biochemical methods (protein isolation, microtubule co-sedimentation, immunodetection, 2D electrophoresis and analysis (DIGE), His-tagged protein purification) and methods of molecular biology (PCR, RT PCR, endonuclease restriction, cloning, overexpression of recombinant proteins in *E.coli*, biolistics, infiltration, stable transformation of BY-2 mediated by *Agrobacterium tumefaciens*).

She spent half year at Albert-Ludwigsuniversität Freiburg, Germany (Prof. E. Wagner), where she was engaged in immunofluorescent methods, she studied half year at Universität Rostock, Germany, and in 2008 and 2009, she stayed each time three months at University of Karlsruhe (Prof. P. Nick) studying the interaction of plant Hsp90 with microtubules in the frame of bilateral DAAD-MŠMT ČR project. In the next two years, she spent one month each time in the same laboratory at University of Karlsruhe to investigate the proteins mediating the interaction of microtubules with other cell structures (DAAD-MŠMT ČR project). She was awarded a grant by Charles University (GAUK) to study the role of +TIP proteins in microtubular dynamics and plant cell growth and development.

She presented her results at conferences (lectures: The Cytoskeletal Club 2006, Vranovská Ves; The Cytoskeletal Club 2009, Vranov nad Dyjí; Conference of Plant Experimental Biology, Prague 20101; The Cytoskeletal Club 2010, Vranovská Ves). She also presented posters (FESPB 2008, Tampere, Finland). Her results were also presented by her supervisor at Conference on Plant Cell and Developmental Biology, 2011, Shanghai, China. Her results on the role of Hsp90 on plant microtubules and aluminum toxicity were published in *Journal of Plant Physiology* and *Plant Physiology and Biochemistry*.

In her free time, she is doing sports (cross-country skiing, cycling, swimming, mountaineering) and is engaged in German literature and opera singing.