

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Katedra experimentální biologie rostlin



Molekulární podstata interakce rostlinného Hsp90 s mikrotubuly

Martina Benáková

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jana Krtková, Ph.D.

Praha 2013

Práce byla vypracována za podpory následujícího grantového projektu: Grantová agentura Univerzity Karlovy: 990213/2013

Prohlašuji, že jsem předkládanou diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Jany Krtkové, Ph.D. a že nebyla předložena k získání titulu na žádné jiné vysoké škole.

V Praze 15. 8. 2013

Martina Benáková

Poděkování

Na prvním místě bych chtěla poděkovat mé vedoucí RNDr. Janě Krtkové, Ph.D. za rady, trpělivost a podporu při práci v laboratoři. Za odborné konzultace děkuji také RNDr. Kateřině Schwarzerové, Ph.D. a RNDr. Lukáši Fischerovi, Ph.D.

Dále můj velký dík patří Petře Schiebertové, Lucii Polákové a Katce Šlajcherové za podporu a dobrou náladu, kterou mě stále obohacují. Zapomenout bych nechtěla ani na RNDr. Lenku Dvořákovou, Ph.D. za její ochotu mi vždy pomoci.

Ing. Milanovi Urbanovi, DiS. a Mgr. Stanislavovi Vosolsobě za pomoc v závěru práce, kdy už síly docházely.

Mgr. Pavlu Vítámvásovi, Ph.D. z Výzkumného ústavu rostlinné výroby za poskytnutí potřebného vybavení pro závěrečné experimenty.

A samozřejmě nesmím opomenout Petra a Halku, kteří svou prací přispěli ke zdárnému ukončení mých pokusů.

Dále děkuji své rodině za trpělivost, snahu o pochopení mé práce a zázemí, které mi stále poskytují.

Abstrakt

Mikrotubuly (MT) jsou jednou ze základních buněčných struktur a účastní se mnoha klíčových dějů v rostlinných buňkách a jejich vlastnosti a funkce jsou ovlivňovány a modifikovány dalšími proteiny. Tyto proteiny řadíme do skupiny proteinů asociovaných s mikrotubuly (MAPs, microtubule-associated proteins). Jedním z MAP je také mnou zkoumaný molekulární chaperon Hsp90, který zastává v buňce velké množství nejrůznějších funkcí. Mimo jiné u něj byla již v minulosti prokázána kolokalizace s MT (Freudenreich a Nick, 1998; Petrášek *et al.*, 1998). Přímá vazba k MT byla však popsána teprve nedávno, a to za pomoci kosedimentačních reakcí specifické tabákové cytozolické izoformy Hsp90, která byla díky své schopnosti vázat MT nazvána Hsp90_MT. Zároveň bylo zjištěno, že vazba k MT je nezávislá na aktivitě ATP (Krtková *et al.*, 2012). Ve zmíněné práci autoři také zjistili pozitivní vliv Hsp90_MT na obnovu MT vystavených chladovému stresu.

Přestože se na dynamice MT cytoskeletu podílí v obrovské míře právě MAP, je s podivem, že u mnohých z nich dosud není známá molekulární podstata interakce s MT, tedy jejich MT-vazebná doména. Rozhodli jsme se proto určit tuto doménu u tabákového Hsp90_MT za pomoci tvorby rekombinantních proteinů obsahujících charakteristické domény pro rodinu Hsp90 a následných kosedimentačních reakcí s polymerovaným tubulinem. Již na počátku práce jsme předpokládali, že by za vazbu k MT mohla být zodpovědná variabilní KE-bohatá doména vzhledem k její podobnosti s jinými MT-vazebnými motivy u jiných živočišných i rostlinných MAP. Z našich výsledků vyplývá, že kandidátní úsek Hsp90_MT obsahující KE-bohatou doménu se opravdu nejvíce váže k MT, a je tedy zřejmě zodpovědný za vazbu Hsp90_MT k MT. Tento výsledek však bude nutné podpořit ještě dodatečnými experimenty a nelze vyloučit, že kromě specifického KE-motivu by za vazbu tohoto molekulárního chaperonu na MT mohly být zodpovědné také hydrofobní interakce či například specifická terciární struktura.

Klíčová slova: Hsp90, kosedimentace, mikrotubuly

Abstract

Microtubules (MTs) are one of the essential cell structure that participate in a number of key events in the plant cells and their properties and functions are influenced and modified by many other proteins. These proteins belong to a group of microtubule-associated proteins (MAPs, microtubule-associated proteins). One of the MAPs, the molecular chaperone Hsp90, examines and fulfills a large number of different functions in the cell. Its colocalization with MTs has been demonstrated previously by Freudenreich and Nick (1998) and Petrášek *et al.* (1998). However, direct interaction with MTs was described only recently using cosedimentation assay. The specific cytosolic isoform of tobacco Hsp90 bound to MTs was called Hsp90_MT due to its ability to bind MTs. It has been also found that the binding to MTs is independent on the activity of ATP (Krtková *et al.*, 2012). The authors also described a positive effect of Hsp90_MT on MT recovery after their exposure to cold stress.

Although MT cytoskeleton dynamics is influenced by a large number of MAPs, it is surprising that the molecular mechanism of MAPs interaction with MTs and their MT-binding domains have not been described yet. Therefore, we decided to determine the tobacco Hsp90_MT MT-binding domain by production of a set of recombinant proteins containing different combinations of putative MT-binding domains and subsequent cosedimentation assays with polymerized tubulin. We presumed the variable KE-rich domain to be responsible for MT binding due to its similarity to other MT-binding motives in other animal and plant MAPs. Our results show that the candidate Hsp90_MT section containing KE-rich domain is really the most binds to MT, and is therefore probably responsible for binding Hsp90_MT to MT. This result, however, will still be supported by additional experiments and can not be excluded that in addition to KE-specific motif could be also responsible for binding to MT hydrophobic interaction or for example a specific tertiary structure.

Key words: cesedimentation, Hsp90, microtubules

Seznam použitých zkratek

+TIP	+tip interacting proteins, proteiny vážící plus konec MT
AF	aktinová filamenta
ATP	adenosin trifosfát
CH doména	calponin homologní doména
CLASP	CLIP-170 asociovaný protein
BSA	bovine serum albumin, hovězí sérový albumin
EB1	end binding protein 1
EP	extrakční pufr
GADPH	glyceraldehyd-3-fosfát-dehydrogenáza
GDA	geldanamycin
Hsp90	heat shock protein 90, protein teplotního šoku 90
MAP	microtubule associated protein, protein asociující s MT
MT	mikrotubuly
MTB1 (C1)	MT binding domain 1
MTB2 (C2)	MT binding domain 2
MTOC	MT-organizing center, centra organizující MT
OE	overexpresce neboli zvýšená exprese
PCR	polymerázová řetězová reakce
PLD δ	fosfolipáza D δ
PM	plazmatická membrána
PPB	preprophase band, předprofázový prstenec

Obsah

1. Úvod.....	9
2. Literární přehled.....	12
2.1. Rostlinný cytoskelet a mikrotubuly	12
2.1.1. Proteiny asociované s MT – rostlinné MAP	13
2.1.1.1. Různá hlediska třídění MAP dle literatury.....	14
2.1.1.1.1. Prokázané MT-vazebné motivy některých MAP	17
2.1.1.1.2. Hsp90	20
2.1.1.1.2.1. Živočišný Hsp90	21
2.1.1.1.2.2. Rostlinný Hsp90, stavba a funkce	22
3. Materiál a metody	26
3.1. Navržení a klonování kandidátních úseků	26
3.1.1. Navržení primerů ke kandidátním úsekům Hsp90.....	26
3.1.2. Transformace <i>Escherichia coli</i>	27
3.1.3. Izolace plazmidové DNA z <i>E. coli</i> a příprava bakteriálních konzerv	27
3.1.4. PCR reakce a klonování kandidátních úseků do plazmidu pDrive	28
3.1.4.1. PCR reakce.....	28
3.1.4.2. Elektroforéza DNA	28
3.1.4.3. Extrakce DNA z agarózového gelu a přečištění DNA.....	29
3.1.5. Ligace do pDrive vektoru	29
3.1.6. Sekvence DNA.....	29
3.1.7. Restrikční štěpení fragmentů z pDrive vektoru a ligace do vektoru pET28b	30
3.2. Izolace úseků proteinu Hsp90_MT	31
3.2.1. Overexprese bakterií	31
3.2.2. Purifikace rekombinantních proteinů pomocí Ni kolony	32
3.3. Kosedimentace proteinů s mikrotubuly	33
3.4. Precipitace proteinu pomocí TCA.....	34
3.5. Proteinová SDS-PAGE elektroforéza (Laemmli, 1970)	35
3.6. Měření denzity kosedimentovaných proteinů úseků Hsp90_MT z SDS gelů	35
4. Výsledky	36
4.1. Navržení kandidátních úseků pro vazbu Hsp90_MT k MT.....	36
4.2. Přehled navržených kandidátních úseků Hsp90_MT	39
4.3. Vytvoření overexpresních vektorů.....	41
4.4. Overexprese a purifikace rekombinantních proteinů	41
4.4.1. Testovací overexprese rekombinantních proteinů	41
4.4.2. Purifikace rekombinantních proteinů přes agarózovou kolonu.....	44

4.4.3. Purifikace proteinů přes kolonu His -Trap FF	45
4.5. Kosedimentace úseků Hsp90_MT s MT	50
4.6. Analýza denzity úseků Hsp90_MT z kosedimentačních reakcí na SDS gelech	54
4.7. Určení MT-vazebné domény Hsp90_MT	57
5. Diskuze	59
5.1. Výzkum v oblasti poznatků o Hsp90	59
5.2. KE-doména jako kandidát pro vazbu Hsp90_MT k MT	59
5.3. Navržení kandidátních úseků Hsp90_MT pro vazbu na MT a tvorba overexpresních vektorů	61
5.4. Purifikace proteinů, testy kosedimentace s analýzami denzit	62
5.5. Doplnující experimenty	64
5.6. Význam znalosti MT-vazebné domény Hsp90_MT	65
6. Závěr	67
7. Seznam použité literatury.....	67
8. Přílohy.....	77
8.1. Příloha 1	77
8.2. Příloha 2.....	78

1. Úvod

Cytoskelet je jedna z nejdůležitějších struktur v rostlinné buňce. Významně se podílí na správném růstu a vývoji a mnoha dalších biologických dějích prostřednictvím transportu látek a jiných buněčných komponent, podpoře správného buněčného dělení či například určení buněčného tvaru. Mikrotubuly (MT) jsou velice dynamická a proměnlivá struktura, jejíž regulace je nezbytná pro růst buněk, buněčnou morfogenezi či buněčnou signalizaci (Lloyd a Chan, 2004). Rostlinná buňka je charakteristická tvorbou speciálních MT struktur vyskytujících se v různých fázích buněčného cyklu. Mezi tyto struktury patří kortikální MT, předprofázový prstenec (preprophase band, PPB), mitotické vřetenko a fragmoplast. Aktivita a schopnost reorganizace mikrotubulů v jednotlivé struktury je umožněna proteiny asociovanými s mikrotubuly (MAP, microtubule associated proteins).

Termínem MAP jsou zpravidla označovány různé druhy proteinů, které asociují s MT a jsou nezbytné pro správné fungování cytoskeletu v buňce v průběhu různých buněčných a vývojových procesů. Dokážeme-li charakterizovat a popsat funkce u MAP, dojdeme zároveň k lepšímu pochopení procesu vzniku nových MT struktur a také samotné dynamiky MT (Hamada *et al.*, 2007). U rostlin existuje mnoho druhů MAP, některé mají své homology v živočišné říši, jiné jsou specificky rostlinné. Obecně lze tvrdit, že MAP mají především stabilizační funkci a podporují polymeraci MT (Hussey *et al.*, 2002). Je však zajímavé, že i přes velké množství dosud objevených MAP výzkumy v mnohých případech opomíjí bližší identifikaci domény zodpovědné za vazbu na MT. Jeden z možných postupů, jak lze určit MT-vazebnou doménu, je porovnání sekvence daného MAP s databázemi obsahujícími sekvence známých MT-vazebných domén. Vzhledem k menšímu množství těchto prokázaných motivů je však toto porovnávání často bez výsledků. Bylo by proto přínosné popsat i další motivy zodpovědné za vazbu na MT. Kromě klasických MAP, tedy proteinů, jejichž primární fyziologickou funkcí je vazba na MT, totiž v buňce existují také proteiny, které plní vícero rozdílných funkcí a jednou z nich je za určitých podmínek také vazba na MT. Znalost obecných vlastností MT-vazebných domén by umožnila předpovídat MT-vazebnou aktivitu právě u těch proteinů, které mají primárně jinou fyziologickou funkci než vazbu na MT. Mezi takovéto proteiny můžeme řadit například elongační faktor 1α (EF1 α) (Gungabissoon *et al.*, 2001), glycerinaldehyd-3-fosfát-dehydrogenázu (GAPDH) (Tisdale *et al.*, 2009), fosfoglycerátkinázu (Walsh *et al.*, 1989), Hsp70 (Ho *et al.*, 2009) či Hsp90 (heat shock protein 90), molekulární chaperon asociovaný s mnoha klientními proteiny v rámci celého buněčného cyklu (Freudenreich a Nick, 1998; Petrášek *et al.*,

1998). Z určitého pohledu by se do této kategorie daly zařadit i proteiny, které zprostředkovávají interakci MT s dalšími buněčnými strukturami, např. plazmatickou membránou, aktinovými filamenti či dalšími proteiny. Mezi takové proteiny patří například SB401 (Huang *et al.*, 2007), fosfolipáza D δ (PLD δ ; Ho *et al.*, 2009), některé forminy (Deeks *et al.*, 2010).

V této práci se blíže věnuji vazbě na MT u Hsp90. Hsp90 je hojný eukaryotický chaperon s mnoha rozličnými funkcemi. Napomáhá správné konformaci proteinů, podílí se na přenosu signálu v buňce nebo na epigenetických přeměnách chromatinu, během tepelného stresu brání denaturaci proteinů (Csermely *et al.*, 1998; Pearl *et al.*, 2008). Kromě těchto fyziologických funkcí se Hsp90 v živočišných buňkách váže na tubulinové dimery (Weis *et al.*, 2010), celé MT (Williams a Nelsen, 1997), je součástí heterokomplexu asociovaného s MT během transportu steroidních hormonů (Pratt *et al.*, 1999; Harrell *et al.*, 2002), jako součást centrozomu se podílí na jeho správném uspořádání (Lange *et al.*, 2000; Glover, 2005) a na nukleaci MT (de Carcer *et al.*, 2001). V rostlinných buňkách je zřejmě Hsp90 důležitý při obnově MT po chladovém stresu a spekuluje se také o jeho podílu na nukleaci MT i v rostlinných acentrozomálních buňkách (Krtková *et al.*, 2012). Hsp90 se u rostlin nachází na kortikálních MT, PPB a fragmoplastu (Petrášek *et al.*, 1998; Krtková *et al.*, 2012). Přímá vazba na tubulin a MT byla poprvé zjištěna u specifické cytozolické formy tabákového Hsp90, následně nazvané Hsp90_{MT} (Krtková *et al.*, 2012). Není však známo, která část molekuly je za vazbu na MT zodpovědná.

Vzhledem k možnosti srovnání jednotlivých cytozolických forem Hsp90 a dalších rostlinných MAP lze na základě podobnosti sekvencí relevantních úseků orientačně určit doména, která by mohla být zodpovědná za vazbu Hsp90_{MT} k MT. Předpokládáme, že by se mohlo jednat o dva variabilní úseky molekuly Hsp90_{MT}, které jsou bohaté na kyselinu glutamovou a lysin (KE-bohaté úseky, Krtková *et al.*, 2012). Právě tento střídající se aminokyselinový motiv je prokázán jako nezbytná sekvence důležitá pro vazbu proteinu na MT u některých živočišných i rostlinných MAP (Noble *et al.*, 1989; Wang *et al.*, 2007).

Cíle diplomové práce spočívaly v testování hypotézy, že za vazbu na MT je u Hsp90_{MT} zodpovědná KE-doména:

- Navržení kandidátních úseků molekuly Hsp90_{MT} tak, abychom testovali zodpovědnost KE-domény za vazbu na MT

- Klonování kandidátních úseků do overexpresního vektoru
- Exprese a purifikace rekombinantních kandidátních úseků molekuly Hsp90_MT
- Kosedimentace kandidátních úseků Hsp90_MT s polymerovaným tubulinem (testování vazby KE-bohaté domény na MT), analýzy denzit a objasnění molekulární podstaty vazby Hsp90_MT k MT.

2. Literární přehled

2.1. Rostlinný cytoskelet a mikrotubuly

Rostlinná buňka obsahuje dva druhy cytoskeletálních struktur, a to aktinová filamenta (AF) a mikrotubuly (MT) (Goddard *et al.*, 1994). Tyto dvě struktury tvoří v buňce velice dynamickou síť, která umožňuje rostlině například reagovat na podmínky vnějšího prostředí a tím ovlivňovat celkovou morfogenezi, přijímat a předávat signály uvnitř buňky, transportovat různé buněčné náklady, určovat ukládání celulózních mikrofibril a v neposlední řadě podstupovat buněčné dělení (Wasteneys, 2004).

MT se vyskytují u všech eukaryot. Jedná se o proteinové tubulární struktury s průměrem 25 nm, které vznikají polymerací α - a β - tubulinu. Tubulin je vysoce konzervovaný protein sestávající ze 450 aminokyselin, molekulová hmotnost je zhruba 55 kDa. Jako převážná většina proteinů podstupuje i tubulin různé posttranslační modifikace zahrnující například glykosylaci, fosforylaci, tyrosinaci či acetylaci (Smertenko *et al.*, 1997). Tyto modifikace mohou mít vliv na chování svazků MT, například mohou snižovat dynamiku či odolnost MT vůči chladu (Breviaro a Nick, 2000). Jeden mikrotubulus je tvořen 13 protofilamenty, v nichž se pravidelně střídá α - a β - podjednotka.

Stejně jako AF jsou MT vysoce polarizované struktury sestávající z plus konce, na němž dochází k dynamickému růstu či krácení, a minus konce, který je zakotvený v nukleačních centrech. Vzhledem k nepřítomnosti centrozomů u rostlin jsou nukleační centra nejčastěji roztroušena v kortikální vrstvě či na jaderném obalu (Murata *et al.*, 2005). Dynamika MT sítě spočívá v procesech označovaných jako „dynamická nestabilita“ probíhající na plus konci jednotlivých MT (Howard a Hyman, 2003). Dynamická nestabilita zahrnuje procesy růstu (polymerace) a krácení (depolymerace) či stavy, kdy neprobíhá růst ani krácení. Rychlost změn u jednotlivých MT bývá různá, poločas rozpadu protofilamenta může být v řádu minut či méně (Goddard *et al.*, 1994). Obecně platí, že rostlinné MT jsou oproti živočišným více dynamické, podstupují častěji krácení než růst a celkový turnover¹ polymerů je vyšší (Dhonukshe a Gadella, 2003). Regulace dynamiky MT závisí především na vazbě GTP či GDP

¹ Termín „turnover“ je anglický výraz, který je nicméně ve vědecké obci běžně využívaný a zavedený. České ekvivalenty, jako například „přeměna“ či „kolování“ zcela nevystihují přesnou podstatu děje.

na β -podjednotku tubulinu a dále také na přítomnosti proteinů vázících se na plus konec MT (Dimitrov *et al.*, 2008). Dynamická nestabilita je pro buňku zásadní vlastnost umožňující účinně reagovat například na hormonální signály a ovlivňovat tak růst a tvar buňky či fázi buněčného cyklu a modifikovat MT struktury dle potřeby.

Rostlinné buňky jsou unikátní vzhledem ke své schopnosti tvořit čtyři odlišné MT struktury během trvání buněčného cyklu. Jedná se o kortikální MT vyskytující se v interfázi a určují směr buněčné expanze (Smertenko *et al.*, 2000), PPB určující rovinu růstu budoucí buněčné desky, mitotické vřetenko umožňující separaci chromatid a fragmoplast, který je zásadní pro vlastní cytokinezi (Smertenko *et al.*, 2000; Breviario a Nick, 2000). Pouze mitotické vřetenko lze nalézt také v živočišných buňkách, ostatní MT struktury jsou rostlinně specifické. Každá z těchto MT struktur je řízena a ovlivňována pestrou škálou MAP, jichž se v rostlinné buňce nachází značné množství a jejichž funkce jsou postupně objevovány.

Vyšší rostliny jsou tzv. acentrozomální organizmy charakteristické nepřítomností centrozomů a rozptýlením jednotlivých center organizujících mikrotubuly (microtubule-organizing center, MTOC) v kortikální vrstvě na PM a na stávajících MT (Murata *et al.*, 2005). Mechanismus nukleace MT je však u rostlin stejný jako u kvasinek i živočichů. Základní složkou nukleačního komplexu je třetí člen tubulinové rodiny, γ -tubulin, který slouží jako „templát“ pro vznik nového MT (Moritz *et al.* 1995). Dalšími složkami nukleačního komplexu jsou proteiny tvořící kruhový γ TuRC komplex (γ -tubulin ring complex), tyto proteiny však byly dosud nalezeny pouze u živočichů. Jednou ze součástí nukleačního centra u *Drosophily* a obratlovců je i protein Hsp90, který se podílí na nukleaci MT a funguje jako integrální protein centrozomu a součást γ -tubulinového komplexu (Lange *et al.*, 2000; Glover, 2005; de Carcer *et al.*, 2001). Přestože u rostlin byly také objeveny proteinové struktury obklopující γ -tubulin (Dryková *et al.*, 2003), klasickým kruhovým komplexům u živočichů se nepodobají a není ani jasné, zda je zde přítomen i Hsp90.

2.1.1. Proteiny asociované s MT – rostlinné MAP

Jak již bylo zmíněno, velice důležitou vlastností MT je jejich dynamická nestabilita, pro jejíž správné fungování jsou MAP nezbytné. Vazba MAP na MT je regulována mnoha různými mechanismy, jako příklad lze uvést kontrolu prostřednictvím kináz či fosfatáz (Cassimeris a Spittle, 2001). MAP jsou vysoce

konzervované v rámci eukaryot, rostlinný genom jich kóduje velké množství s homology jak u kvasinek, tak u živočichů. Na druhé straně ale u rostlin nalezneme i některé specifické MAP.

2.1.1.1. Různá hlediska třídění MAP dle literatury

Současná literatura rozlišuje různé kategorie MAP vytvořené na základě nejrůznějších kritérií. Nejčastěji se lze setkat s dělením na strukturní MAP, ke kterým bývají řazeny i MAP vázající se preferenčně na + konec MT (+tip interacting proteins, +TIP), a motorové MAP.

Jednou z nejlépe prostudovaných genových rodin strukturních MAP je genová rodina MAP65/Ase1p/PRC1, která se vyskytuje v celé eukaryotické říši (Hussey *et al.*, 2002). Genom *Arabidopsis thaliana* kóduje 9 izoform MAP65 (Hussey *et al.*, 2002) a je zajímavé, že i přes vysokou sekvenční homologii zastává každá izoforma v buňce více či méně odlišnou funkci (Van Damme *et al.*, 2004). AtMAP65-1, 2, 4 a 5 se v buňce vyskytují po většinu buněčného cyklu a podílí se především na stabilizaci MT struktur pomocí svazkování jednotlivých MT vláken kortikálních MT, PPB, vřeténka, či fragmoplastu (Smertenko *et al.*, 2000, 2004; Van Damme *et al.*, 2004; Mao *et al.*, 2005; Gaillard *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2009; Fache *et al.*, 2010). Rozdílnou úlohu pak plní AtMAP65-3, který je v buňce lokalizován až během počáteční profáze a na MT se váže dokonce až v pozdní anafázi jako nezbytná součást správného fungování fragmoplastu (Müller *et al.*, 2004; Smertenko *et al.*, 2008). Zajímavá je také funkce AtMAP65-6, který se podílí na asociaci kortikálních MT a mitochondrií (Mao *et al.*, 2005). Dalším MAP svazkujícím MT podobně jako MAP65 je u rostlin například WAVE-DAMPENED 2, vázící také kortikální MT a MT na pólech vřeténka (Perrin *et al.*, 2007).

+TIP jsou významnou podskupinou strukturních MAP. Váží se především na + konce MT, kde jsou schopné tvořit velké proteinové komplexy. +TIP ovlivňují svoji aktivitou především MT dynamiku a také napomáhají interakcím MT s dalšími MT či AF, buněčnými membránami, organelami či kinetochory (Kaloriti *et al.*, 2007). Mezi nejlépe prostudovaný +TIP u rostlin můžeme zařadit konzervovaný protein End binding protein 1 (EB1; (Chan *et al.*, 2003; Bisgrove *et al.*, 2008)), který je schopný snižovat frekvence katastrof na plus konci MT a podporovat polymeraci MT (Lansbergen a Akhmanova 2006; Manna *et al.*, 2008). Nejdůležitější se však zdá jeho funkce z hlediska zprostředkování vazby ostatních proteinů k + konci MT. U všech dosud

známých +TIP můžeme totiž nalézt informaci, že se k MT váží prostřednictvím EB1 (shrnutí v Galjart, 2010). Dalšími +TIP proteiny jsou u rostlin CLASP (Bisgrove *et al.*, 2004), SPR1 (SPIRAL 1) či ATK5 (Sedbrook *et al.*, 2004; Ambrose *et al.*, 2005).

Motorové proteiny jsou vedle strukturních jednou z nejčastěji zkoumaných skupin MAP. Velice širokou a různorodou rodinou motorových proteinů využívajících MT k dopravě buněčného nákladu jsou u rostlin kinesiny. Jejich počet dokonce v genomu *Arabidopsis thaliana* převyšuje počet kinesinů kódovaných genomem člověka (Miki *et al.*, 2005; Richardson *et al.* 2006). Kinesiny využívají ke svému pohybu po MT energii z hydrolýzy ATP, přičemž u rostlin jsou některé kinesiny schopné pohybu jak k plus konci MT, tak k jeho minus konci (shrnutí v Kaloriti *et al.*, 2007). Je možné, že tak zastupují funkce u rostlin nepřítomných dyneinů (Hamada *et al.*, 2007)

Jiné hledisko, jak lze MAP dělit, je povaha jejich vazby k MT. Z povahy vazby na MT se dají rozlišovat dva typy MAP. První skupinu tvoří typické MAP vážící se na MT v rámci buď celého buněčného cyklu, či jen na MT struktury specifické pro danou fázi buněčného cyklu. Tato skupina je charakteristická právě vazbou na MT, které může ovlivňovat na různých úrovních, například jednotlivá vlákna svazkovat, stabilizovat či usměřňovat. Pokud mají tyto MAP v rostlinné buňce ještě jiné funkce, nejsou natolik zásadní jako funkce spojené s MT. Do této skupiny tak můžeme řadit například rodinu MAP65, jejíž funkce je popsána výše.

Druhým typem proteinů asociovaných s MT jsou ty, které v buňce většinou plní jiné fyziologicky významné funkce a na MT se váží jen v některých životních situacích nebo za určitých podmínek. Jedním z takovýchto MAP je například EF α , jehož hlavní funkcí je navádět aminoacyl-tRNA k ribozomu. Bylo nicméně zjištěno, že v závislosti na vazbě kalmodulinu či hodnotě pH uvnitř buňky je schopný asociovat s MT, ale také s AF (Moore *et al.*, 1998; Gungabissoon *et al.*, 2001). K MT cytoskeletu se v některých případech váží také různé enzymy či chaperony. Glycerinaldehyd-3-fosfát-dehydrogenáza (GAPDH) je v buňce hojně se vyskytující protein se zásadní funkcí především v průběhu glykolýzy, ale důležitou roli hraje také například během membránového transportu, jaderného exportu RNA, při kontrole translace, DNA replikace či DNA oprav a v neposlední řadě také při uspořádávání MT (shrnutí v Sirover, 1999). Vzhledem k poslední zmiňované schopnosti GAPDH uspořádávat MT není překvapením jeho prokázaná asociace s tubulinem a přímá interakce s MT (Kumagai a Sakai, 1983; Volker a Knull, 1997; Walsh *et al.*, 1989; Tisdale *et al.*, 2009). Společně s GAPDH řadíme mezi enzymy schopné vazby na MT také laktát dehydrogenázy,

pyruvát kinázy, aldolázy či fosfoglycerát kinázy (Walsh *et al.*, 1989). Známým a prvně objeveným enzymem, který je zároveň schopný propojovat MT s plazmatickou membránou (Gardiner *et al.*, 2001), je fosfolipáza D δ (PLD δ), hydrolyzující strukturní fosfolipidy za vzniku kyseliny fosfatidové, ethanolaminu či cholinu (shrnuto ve Wang, 2002). Proteinem vážícím se na MT i PM, ale zároveň zastávajícím mnoho dalších funkcí je také Hsp90, který se podílí na obnově MT po chladovém stresu. Další chaperon, Hsp70, byl taktéž popsán jako interakční partner MT a membránových struktur (Ho *et al.*, 2009).

Z určitého pohledu by se do této kategorie daly zařadit i proteiny, které zprostředkovávají interakci MT s dalšími buněčnými strukturami, například s již výše zmíněnou plazmatickou membránou, dalšími proteiny (např. Hsp90, Hsp70) či aktinovými filamenti. Mezi proteiny interagujícími jak s MT, tak s AF patří například SB401 (Huang *et al.*, 2007), EF-1 α (Gungabissoon *et al.*, 2001) či MAP190, zřejmě nezbytný pro koordinaci správné aktivity MT a AF ve fragmoplastu (Igarashi *et al.*, 2000), a některé forminy (Deeks *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010).

Další možností třídění MAP je na základě zohlednění jejich výskytu v různých organizmech. Tak lze MAP dělit na univerzálně se vyskytující nebo rostlinně specifické². Mezi významné rostlinně specifické MAP řadíme například již zmíněné SPR1 a ATK5. Dále můžeme do této kategorie zahrnout proteiny TORTIFOLIA1/SPIRAL2 vážící se ke všem MT strukturám v průběhu buněčného cyklu a obohacující také plus konce MT *in vivo* (Buschmann *et al.*, 2004; Shoji *et al.*, 2004; Yao *et al.*, 2008). Další rostlinně specifické proteiny zahrnují rodinu MAP70 popsanou u *Arabidopsis thaliana*. Tyto proteiny nemají homology v jiných eukaryotických říších. Předpokládá se jejich význam v udržování polarity buněk a následném správném zvětšování pletiv (Korolev *et al.*, 2007). Jiným zajímavým případem rostlinně specifického MAP je již zmiňovaný SB401, jehož homology byly nalezeny pouze v pylových láčkách u čeledi *Solanaceae*. Tento protein váže a svazuje AF a MT a předpokládá se proto jeho účast na růstu pylové láčky a pohybu organel, tedy na procesech závislých na spolupráci AF a MT (Huang *et al.*, 2007). Významným MAP, který lze nalézt opět pouze u rostlin, je MAP18. Podle imunofluorescenčních značení publikovaných skupinou Wang *et al.* (2007) asociuje MAP18 u *Arabidopsis thaliana* s MT *in vitro* i *in vivo* a inhibuje polymeraci tubulinu. Jednalo by se tudíž

² Samozřejmě existují i živočišně specifické MAP, jejich detailnější rozbor by však překračoval rozsah mé práce.

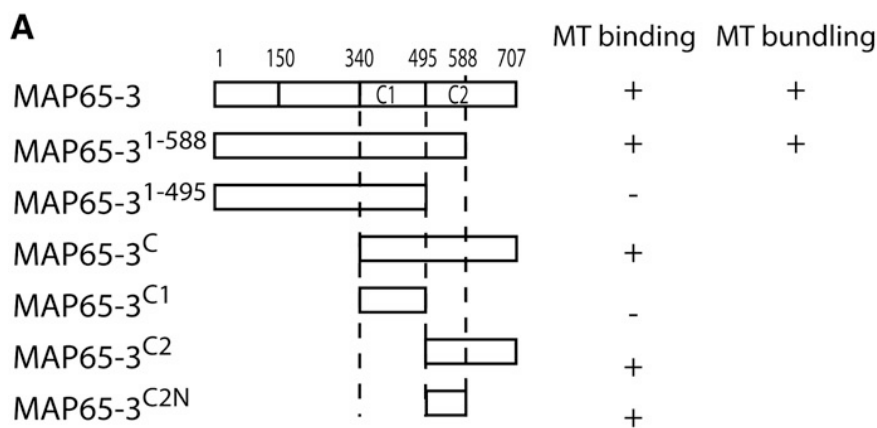
o jeden z mála známých MAP s destabilizující funkcí. V nedávné době bylo zjištěno, že MAP18 je divergovaný paralog proteinu developmentally regulated plasma membrane polypeptide, (DREPP; syn. u *Arabidopsis* PCaP1), který je rozšířený v celé rostlinné říši již od kaprad'orostů (Vosolsobě, 2010). Přesná funkce MAP18 není dosud spolehlivě zjištěna, můžeme pouze předpokládat, že souvisí s aktivitou kortikálních MT a jejich asociací s PM.

2.1.1.1. Prokázané MT-vazebné motivy některých MAP

V poslední době bylo objeveno velké množství rostlinných MAP, jejichž lokalizace, funkce a význam jsou popsány například ve shrnující práci Hamada (2007) či Kaloriti *et al.* (2007). Většina publikovaných studií se však logicky zaměřuje spíše na objasnění lokalizace daného MAP v rámci buněčného cyklu, na jeho vliv na MT či na fenotypový projev. Méně informací je zatím známo o doménách, které by mohly být za vlastní vazbu k MT zodpovědné, ačkoliv jde o zásadní znalost, která dělá protein pravým MAP. Jak uvádí Hamada *et al.* (2007), definovat striktně pravý MAP je však celkem obtížné. S pomocí genetických analýz bylo totiž nalezeno mnoho MAP, jejichž vliv na regulaci a stavbu MT struktur je prokázáný, ale některé následně nelze kosedimentovat s MT. Jiný případ jsou MAP nalezené právě na základě vazby k MT, ale jejich vliv na organizaci MT je zřejmě zanedbatelný či dosud nezjištěný.

Vzhledem k charakteru své práce bych nyní ráda popsala některé prokázané MT-vazebné motivy u živočišných i rostlinných MAP. MT-vazebné domény jsou dobře prostudované u jedné z největších rodin MAP u rostlin, a to MAP65. Jednou z izoform MAP65 u *Arabidopsis thaliana* je MAP65-3, vyskytující se na plus koncích antiparalelně uspořádaných MT ve fragmoplastu. MAP65-3 je nezbytný pro správné umístění a funkci těchto antiparalelních MT. Lokalizace MAP65-3 je překvapivě odlišná od lokalizace MAP65-1, který asociuje také s MT ve fragmoplastu, ale po celé jejich délce, a ne tedy pouze na jejich plus koncích (Müller *et al.*, 2004; Smertenko *et al.*, 2008). Vzhledem k tomu, že při absenci MAP65-3 v buňce dochází k závažným defektům během cytokineze, byla analyzována doména, která je zodpovědná za vazbu proteinu k MT, a tudíž hraje významnou roli během buněčného dělení. Všichni členové rodiny MAP65 u *Arabidopsis thaliana* obsahují relativně konzervovaný N-terminální konec. Variabilní C-konec je rozdělený do dvou domén, které jsou schopny vázat MT, tyto domény se nazývají MTB1 (MT binding domain 1, C1) a MTB2 (MT binding domain 2, C2) (Smertenko *et al.*, 2004) (schéma je možné ukázat na příkladu MAP65-3

proteinu, viz Obrázek 1). Za vazbu k MT ve fragmoplastu u MAP65-1, -4 a -5 je zodpovědná C1 doména (Smertenko *et al.*, 2004; Gaillard *et al.*, 2008; Fache *et al.*, 2010). U MAP65-3 je C2 doména v porovnání s ostatními izoformami delší. Autoři Ho *et al.* (2012) se proto rozhodli zjistit, zda je právě tato doména zodpovědná za vazbu k MT a mohla by být příčinou rozdílné lokalizace a funkce tohoto proteinu oproti ostatním členům rodiny MAP65, především pak MAP65-1. Díky vazebným analýzám částí proteinu MAP65-3 za využití fúzních úseků MAP65-3-GFP exprimovaných v tabákových buňkách pod kontrolou 35S promotoru a následné detekci za pomoci konfokální mikroskopie bylo zjištěno, že za vazbu k MT ve fragmoplastu zodpovídá opravdu doména C2, která se nachází mezi 496 až 588 aminokyselinou (Obrázek 1). Tato doména je kratší než C1, svou povahou silně zásaditá a jedná se o nejvíce variabilní úsek proteinu v rámci celé rodiny MAP65 (Smertenko *et al.*, 2008). Vzhledem k výsledkům tohoto výzkumu je patrné, že MAP65-3 si zřejmě vytvořil vlastní MT-vazebný mechanismus odlišný od ostatních izoform MAP65.



Obrázek 1: Přehled kandidátních úseků AtMAP65-3 pro vazbu na MT. Vazba na MT je u jednotlivých úseků vyjádřena symboly +/- . Za vazbu proteinu k MT je zodpovědná C2 doména na C-konci proteinu. MAP65-3^{C2N} zahrnuje sekvenci, bez níž se vyskytují u mutantních rostlin *dyc283 MAP65-3* defekty fragmoplastu. Ho *et al.* (2012).

Dalším příkladem klasického MAP, u kterého je známá MT-vazebná doména, je EB1, který patří mezi proteiny asociované s + koncem MT (shrnutí v Hamada *et al.*, 2007). Veškeré výzkumy se však doposud prováděly s lidskými formami EB1. Přestože byl dlouho znám význam EB1 pro dynamiku MT a segregaci chromosomů, regulace této aktivity nebyla dostatečně popsána. Byly proto vytvořeny modely EB1, které

se snaží vysvětlit způsob vazby proteinu k MT a ostatním +TIP v živočišných buňkách. EB1 se skládá z coiled-coil C-terminální domény a vysoce konzervované CH (calponin homologní) domény na N-konci, která je zodpovědná za vazbu k plus konci MT (Morrison *et al.*, 1998). Při bližším zkoumání CH domény byla zjištěna její vysoká podobnost s CH doménou typickou pro proteiny interagující s aktinovým cytoskeletem. CH doména ve formě dimeru u nich zodpovídá za vazbu na AF. Protein EB1 se váže k MT, avšak pomocí monomerní CH domény. Jde o první prokázaný případ vazby k cytoskeletální struktuře pomocí monomerní CH domény (Hayashi a Ikura, 2003; Frey *et al.*, 2009). Ve studii autorů Hayashi a Ikura (2003), kteří vytvořili krystalickou strukturu proteinu, bylo navíc zjištěno, že vazba EB1 k MT je závislá částečně na elektrostatických vlastnostech proteinu, ale především také na hydrofobních interakcích.

Stejně jako u EB1, je i u dalšího +TIP známa jeho MT-vazebná doména, která byla ovšem zkoumána zatím jen u jeho živočišného homologa. Jedná se o protein CLASP (CLIP-170 asociovaný protein). U živočichů je CLASP důležitý v mnoha ohledech, například během buněčné organizace, pohyblivosti a především během mitózy (shrnuto v Gajlart, 2005). Nejlépe prostudovanou lidskou izoformou je CLASP1 α , na jehož začátku lze nalézt TOG a TOG-like motivy. Ty jsou následované oblastí bohatou na serin a arginin, která je zodpovědná za vazbu CLASP k EB1 a také k MT (Mimori-Kiyosue *et al.*, 2005). Nicméně nejnovější výzkumy ukazují, že kvasinkový CLASP je schopen přepravovat tubulin k rostoucím koncům MT také prostřednictvím jeho asociace s TOG doménami na N-konci proteinu (Al-Bassam *et al.*, 2010). CLASP se váže na MT i u rostlin, ale jeho funkce u nich není dosud přesně objasněna (Gardiner a Marc, 2003; Ambrose *et al.*, 2007; Kirik *et al.*, 2007).

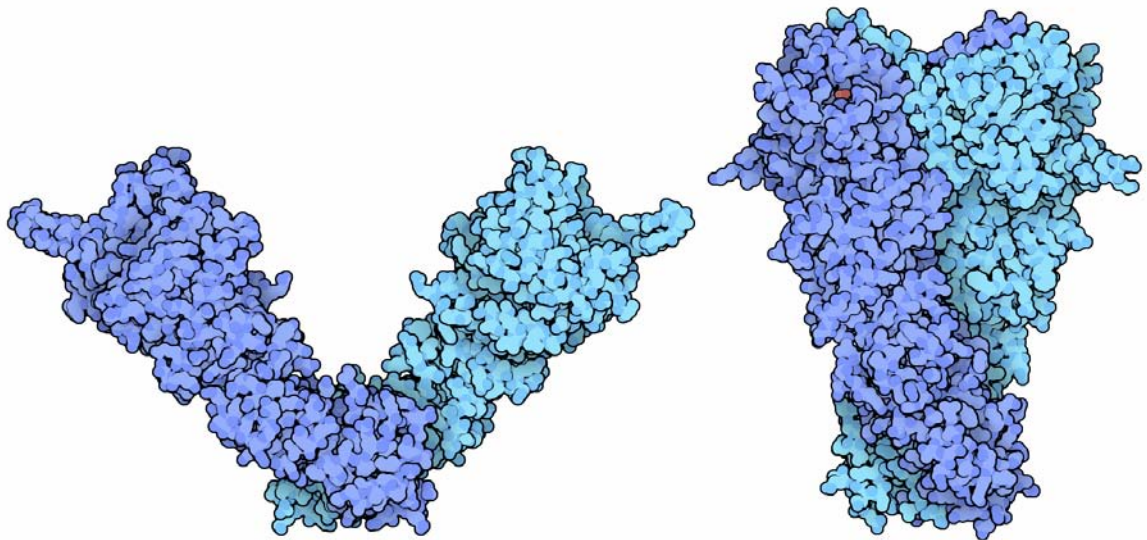
Kromě živočišných MT-vazebných domén máme dílčí znalosti také o doménách u rostlin, například u již zmiňovaného SB401. Jeho MT vazebná doména obsahuje šestkrát nedokonale se opakující motiv V-V-E-KK-N/E-E (Huang *et al.*, 2007). Dalším příkladem může být výše popsany MAP18, u něž se předpokládá, že za vazbu k MT může být zodpovědný motiv VEEKK. Tento motiv se vyskytuje také u MAP18 příbuzných proteinů DREPP (Vosolsobě, 2010). Je zajímavé, že autoři Wang *et al.* (2007) si vybrali MAP18 na základě hledání sekvenční analogie repetitivního motivu K-K-E-E programem BLAST a opravdu prokázali, že protein, který v databázi s podobnou sekvencí našli a pojmenovali MAP18, asociuje s MT. Oba dva výše zmíněné proteiny obsahují ve své MT-vazebné doméně větší množství lysinu, kyseliny

glutamové a valinu. Podobnou sekvenci, tedy úsek bohatý na kyselinu glutamovou a lysin, lze nalézt také u Hsp90_{MT} (Krtková *et al.*, 2012).

2.1.1.2. Hsp90

Hsp90 je hojný molekulární chaperon, který v buňce plní primárně funkce spojené s utvářením správné konformace proteinů (Pearl *et al.*, 2008). Také se podílí na ochraně proteinů při stresu (Boter *et al.*, 2007). Byla u něj ale zjištěna i vazba na MT u živočichů i u rostlin (Nick *et al.*, 1995; Williams a Nelsen, 1997; Freudenreich a Nick 1998; Petrášek *et al.*, 1998; Pratt *et al.*, 1999; Lange *et al.* 2000; Harrell *et al.*, 2002; Weis *et al.*, 2010; Krtková *et al.*, 2012). Hsp90 můžeme tedy považovat za MAP, ale musíme si uvědomit, že má v buňce odlišnou primární fyziologickou funkci než vazbu na MT.

Molekula Hsp90 je tvořena zhruba 700 aminokyselinami. Jedná se o vysoce konzervovaný protein [63–71% v rámci eukaryot a 88–93% v rámci rostlin (Krishna a Gloor, 2001)] vyskytující se u bakterií a všech eukaryot. Dokladem jeho vysoké konzervovanosti i z hlediska funkce Hsp90 je zachování jeho správné aktivity i v případě, že přeneseme rostlinný Hsp90 do živočišné buňky (Pratt *et al.*, 2001). V živočišných buňkách Hsp90 pracuje jako dimer závislý na hydrolýze adenosin trifosfátu (ATP) (Obrázek 2), podílí se mimo jiné na sestavování, stabilizaci, kontrole a aktivaci důležitých klientních proteinů, jako jsou protein kinázy nebo například různé transkripční faktory. Hsp90 však zastává v buňce mnoho významných funkcí souvisejících například s přenosem signálů uvnitř buňky, remodelacemi chromatinu či regulacemi epigenetických změn uvnitř organismu (Pearl *et al.*, 2008).



Obrázek 2: U živočichů Hsp90 prochází během svého funkčního cyklu konformačními změnami. Molekula se může vyskytovat jednak v neaktivním stavu (vlevo), po navázání ATP do specifického místa dochází k aktivaci proteinu.

2.1.1.2.1. Živočišný Hsp90

V živočišných buňkách se vyskytují převážně dvě cytozolické formy Hsp90, které jsou identické na aminokyselinové úrovni ze 76%. Kromě těchto nejvíce zastoupených forem byl objeven také protein grp94 lokalizovaný v endoplazmatickém retikulu, sdílející 50% podobnost s cytozolickými formami Hsp90 (Dechert *et al.*, 1994). Autoři Felts *et al.* (2000) předpokládají, že izoformou Hsp90 je také protein TRAP1, který sdílí s cytozolickým Hsp90 35% podobnost a je lokalizovaný v mitochondriích (Felts *et al.*, 2000). V živočišných buňkách je popsána interakce Hsp90 s MT hned na čtyřech buněčných úrovních. Hsp90 interaguje s tubulinovými dimery (Weis *et al.*, 2010), s kompletně sestavenými MT (Williams a Nelsen, 1997), Hsp90 je součástí heterokomplexu asociovaného s MT během jaderného transportu steroidních hormonů (Pratt *et al.*, 1999; Harrell *et al.*, 2002) a v neposlední řadě je také součástí živočišného centrozomu, pro jehož funkci a stavbu je nezbytný. Přítomnost Hsp90 v živočišném centrozomu byla prokázána a popsána poprvé v publikaci Lange *et al.* (2000) na modelovém organismu *Drosophila*. V případě, že byla zrušena aktivita Hsp90 mutací v jeho genu či přidáním inhibitoru Hsp90 geldanamycinu, došlo k významným změnám ve stavbě a organizaci centrozomu, mitotického vřetenka a narušena byla také segregace chromozomů, která úzce souvisí se správnou funkcí centrozomu.

V souvislosti s živočišným Hsp90 probíhá v dnešní době rozsáhlý výzkum zasahující především do oblasti rakovinných buněk. Zvýšená exprese a aktivita Hsp90 je typickým znakem pro nádorové buňky a přirozený inhibitor Hsp90 geldanamycin vykazuje silný protinádorový účinek. Mechanismus funkce Hsp90 v nádorových buňkách spočívá v jeho přednostní vazbě mnoha onkoproteinů, na jejichž aktivitě je rakovinná buňka závislá. V praxi již bylo u pacientů s rakovinou testováno kromě geldanamycinu i několik dalších inhibitorů Hsp90, bohužel však výsledky nejsou vzhledem k častým vedlejším účinkům uspokojivé (pro více informací odkazují na článek Růčková *et al.*, 2011).

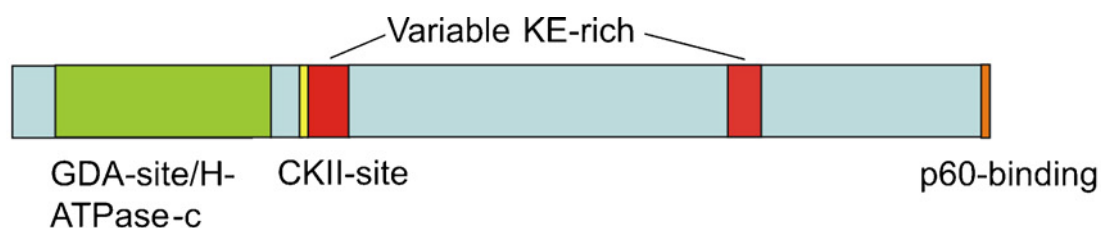
2.1.1.2.2. Rostlinný Hsp90, stavba a funkce

Základní funkce rostlinných Hsp90 se oproti formám živočišným liší jen v málo ohledech. Mezi hlavní aktivity patří opět vazba klientních proteinů a jejich modifikace mnoha různými způsoby (Wegele *et al.*, 2004). V rostlinách se také nachází geny kódující tzv. kochaperony Hsp90, podobné těm v živočišných buňkách, kde napomáhají správné funkci Hsp90 (Krishna a Gloor, 2001). V rostlinných buňkách však můžeme nalézt také aktivity, které se u živočišných forem Hsp90 nevyskytují. Jedná se například o směřování prekurzorů proteinů putujících k membráně chloroplastů a jejich ochranu před degradací (Flores-Pérez *et al.*, 2012), reakci na stres vyvolanou tzv. R-proteiny (Boter *et al.*, 2007) či o pomoc při formaci AGO4/siRNA komplexu účastnícího se RNA-řízené DNA metylace (RNA-directed DNA methylation (Ye *et al.*, 2012)).

V genomu modelového organismu *Arabidopsis thaliana* je kódováno celkem sedm izoform Hsp90, z toho jsou čtyři cytozolické a dále je zde po jedné formě chloroplastové, mitochondriální a formě lokalizované v endoplazmatickém retikulu (Krishna a Gloor, 2001). Exprese Hsp90 je regulována především v závislosti na vývojové fázi a v některých případech také v reakci na chladový stres a světelný signál (Krishna a Gloor, 2001).

Rostlinné cytozolické formy Hsp90 sdílí některé charakteristické vlastnosti. Mezi ně patří přítomnost tří základních domén, a to konzervované N- a C- terminální domény a sekvence středního úseku o variabilní délce (Pearl a Prodromou, 2000). Na N-terminálním konci proteinu se vyskytuje ATP-vazebná doména (ATP-binding pocket), důležitá pro aktivaci klientních proteinů, zároveň se na ni váže specifický inhibitor geldanamycin (GDA; Pearl a Prodromou, 2000), který vytěsňuje ATP a inhibuje tak aktivitu Hsp90 (Stebbins *et al.*, 1997). Na ATP-vazebnou doménu

navazuje oblast lišící se svou délkou a složením v závislosti na izoformě a rostlinném druhu. Cytosolické formy Hsp90 obsahují v této oblasti kasein kinázový II vazebný motiv KEISDDE (casein-kinase II binding motif), kam se váže kasein-kináza II (Krishna a Gloor, 2001). C-terminální doména zahrnuje motiv MEEVD zprostředkující vazbu kochaperonů, jako například imunophilinů či p60 (Krishna and Gloor, 2001; Young *et al.*, 2001). Hlavní rozdíly mezi jednotlivými Hsp90 proteiny jsou lokalizovány ve dvou variabilních úsecích uvnitř molekuly Hsp90, které jsou bohaté na kyselinu glutamovou a lysin (KE-bohaté úseky), a které zřejmě zprostředkovávají rychlou interakci s klientními proteiny (Cadepond *et al.*, 1994). Oba dva úseky obsahují střídající se pozitivně (K) a negativně (E, D) nabitě aminokyselinové zbytky, jejichž shluky se několikrát opakují. Grafické znázornění molekuly Hsp90 je na obrázku (Obrázek 3).

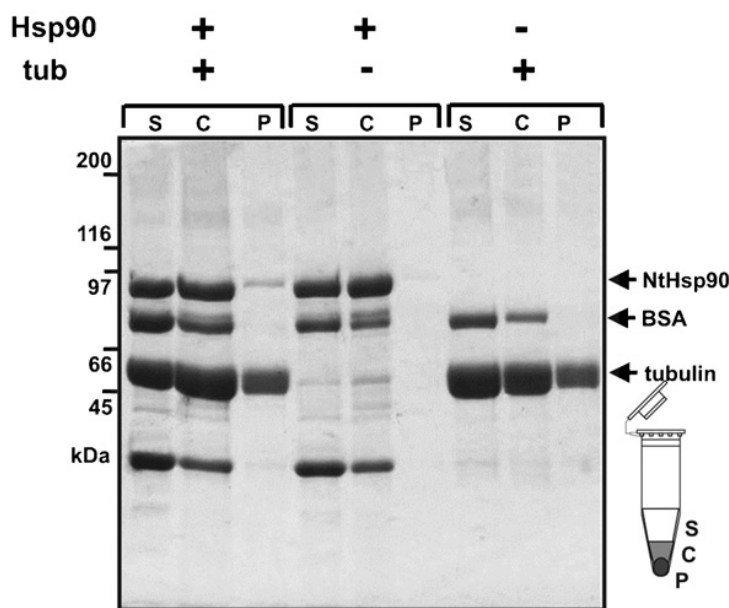


Obrázek 3: Grafické znázornění charakteristických domén cytosolických Hsp90; N-terminální ATP vazebná doména interagující s inhibitory, například geldanamycinem (zeleně), konzervovaná CKII kasein kinázy vážící doména (žlutě), KE-bohaté domény (červeně), C-terminální doména vážící kochaperony, například p60 (oranžově); Krtková *et al.*, 2012.

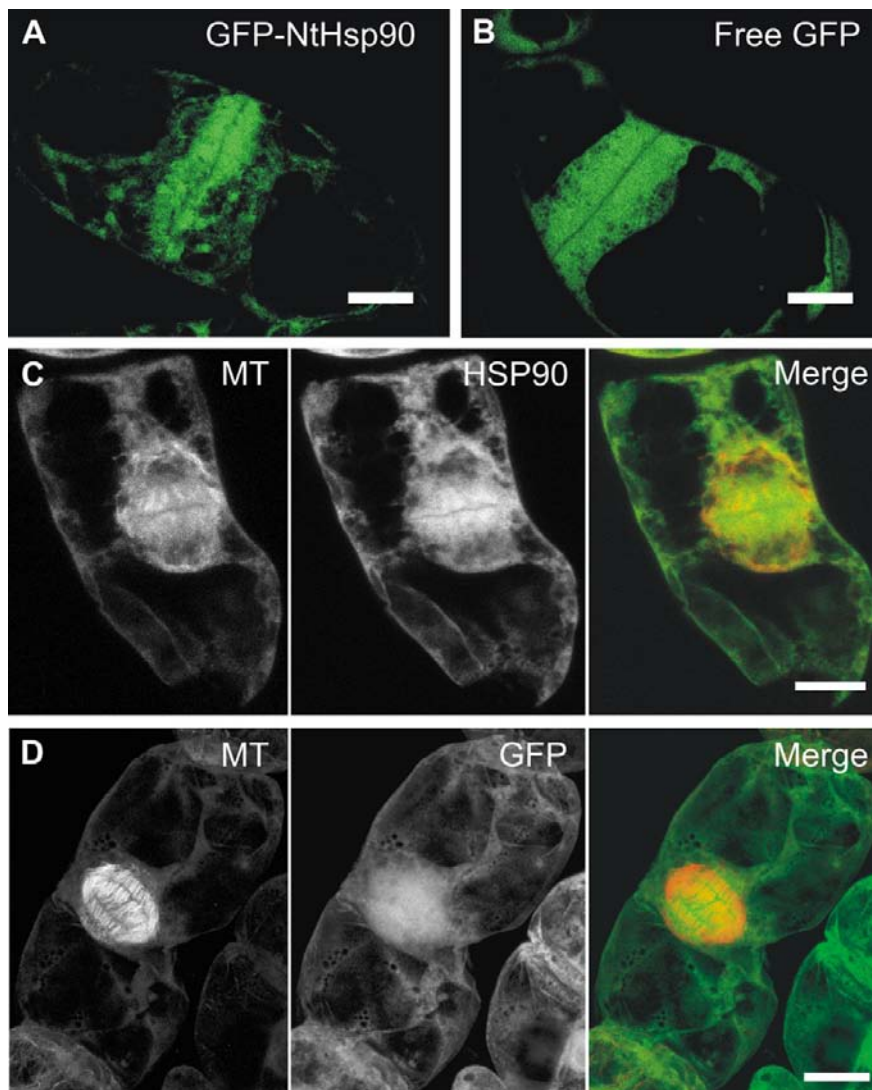
Studii zabývajících se vazbou rostlinného Hsp90 k cytoskeletálním strukturám není mnoho. Poprvé byla vazba Hsp90 s MT zjištěna v termostabilní frakci izolované z kukuřičných koleoptilí (Nick *et al.*, 1995). Asociace Hsp90 s MT byla zkoumána na základě imunofluorescenčního značení v tabákových VBI-0 buňkách, kde byla prokázána překrývající se lokalizace Hsp90 s kortikálními MT, PPB a fragmoplastem (Petrášek *et al.*, 1998). *In vitro* byla vazba s MT sledována ve studii Freudenreich a Nick (1998). Přímá vazba cytosolické izoformy z tabáku, specifické svou vazbou na MT (vzhledem ke své schopnosti vázat se na MT byla tato izoforma Hsp90 následně pojmenována Hsp90_{MT}), však byla prokázána až v nedávné době za pomoci kosedimentačních metod s polymerovaným tubulinem *in vitro* (Obrázek 4), v této studii

byla také opětovně potvrzena kolokalizace kortikálních MT a MT fragmoplastu s GFP-Hsp90_MT v buňkách BY-2 stabilně exprimujících GFP-Hsp90_MT (Obrázek 5) (Krtková *et al.*, 2012).

V souvislosti s Hsp90 dosud nebylo zjišťováno, která jeho doména je zodpovědná za vazbu k MT. V závislosti na struktuře Hsp90 a možnosti porovnání MAP, u nichž je daná doména určena, lze pouze orientačně uvažovat o možném kandidátním úseku. Takovým úsekem by mohla být část Hsp90_MT s KE-bohatými opakováními, která je nejvíce variabilní i mezi jednotlivými cytozolickými formami a zároveň byla popsána jako motiv zprostředkovávající vazbu na MT například u proteinu MAP1B (Noble *et al.*, 1989) nebo jako tubulin-vazebný motiv u rostlinného AtMAP18 (Wang *et al.*, 2007) či SB401 (Huang *et al.*, 2007). V těchto dvou úsecích sdílí cytozolické MT-vazebné Hsp90 40% identitu s AtMAP18 (Krtková *et al.*, 2012) a můžeme je proto považovat za horké kandidáty na úseky zprostředkovávající vazbu na MT u rostlin.



Obrázek 4: Purifikovaný rekombinantní NtHsp90_MT byl inkubovaný s MT stabilizovanými taxolem a jako negativní kontrola byl přidán BSA. Jednotlivé frakce byly centrifugovány přes sacharózový polštář. Supernatant (S), polštář (C) a pelet (P) byly následně detekovány pomocí SDS-PAGE. NtHsp90_MT sedimentoval v peletu v přítomnosti tubulinu, kdežto BSA zůstal v supernatantu a polštáři. Krtková *et al.* (2012).



Obrázek 5: Zobrazení lokalizace Hsp90_MT na MT pomocí konfokální mikroskopie. A – Vazba Hsp90_MT na fragmoplast během telofáze. B – telofázní buňka exprimující volné GFP, kde GFP není navázáno na MT tvořících fragmoplast. C – GFP-NtHsp90_MT linie s imunofluorescenčně značenými MT, v telofázní buňce dochází k asociaci Hsp90 s MT fragmoplastu. D – linie exprimující volné GFP s imunofluorescenčně značenými MT, GFP neinteraguje s fragmoplastovými MT; Krtková *et al.*, 2012.

3. Materiál a metody

3.1. Navržení a klonování kandidátních úseků

Ověřenou sekvenci celého (full length) tabákového Hsp90_{MT} v klonovacím vektoru pET28b (Novagen) jsem získala od školitelky (RNDr. J. Krtkové, Ph.D.). Úseky, u kterých jsem zamýšlela testovat jejich vazbu na MT, jsem navrhovala s přihlédnutím k publikaci Krishna a Gloor (2001) a Krtková *et al.* (2012). Podrobněji o jednotlivých úsecích pojednávám v kapitole Výsledky (str. 39).

3.1.1. Navržení primerů ke kandidátním úsekům Hsp90

Ke každému ze šesti kandidátních úseků molekuly Hsp90_{MT} jsem navrhla primery s kotvami obsahujícími odpovídající restrikční místa pro orientované klonování do overexpresního vektoru. Při navrhování primerů jsem zohlednila následující pravidla. Délka primeru by se měla pohybovat mezi 20 – 30 bp, zastoupení GC párů by mělo být 40 – 60%, přičemž GC páry by měly být rovnoměrně rozmístěny, nikdy by se však neměly opakovat více jak tři GC páry za sebou, na 3' konci primeru by mělo být přítomno G/C, nikoliv T/A a T_m (teplota nasedání primerů) by se měla pohybovat okolo 58°C.

Primery pro začátek a konec sekvence Hsp90_{MT} (vyznačeny tučně) byly již zavedené na pracovišti, kompletní seznam primerů je uveden v tabulce 1 (Tabulka 1).

<u>Úsek</u>	<u>primer</u>	<u>délka</u>	<u>sekvence</u>	<u>Restrikční místo</u>
1	Forw.	24	GTCGACATGGCGGAGGCAGAGACG	SalI
	Rev.	31	AAGCTTTTAAAGTTGATCCTCCTTGAGGAAG	HindIII
2	Forw.	24	GTCGACATGGCGGAGGCAGAGACG	SalI
	Rev.	32	AAGCTTTTAATTAGTCAAGCTCTTATAGAAAG	HindIII
3	Forw.	28	GTCGACTTCCTCAAGGAGGATCAACTTG	SalI
	Rev.	32	AAGCTTTTAATTAGTCAAGCTCTTATAGAAAG	HindIII
4	Forw.	28	GTCGACTTCCTCAAGGAGGATCAACTTG	SalI
	Rev.	29	CTCGAGTTAGTCAACTTCCTCCATCTTGC	XhoI
5	Forw.	31	GTCGACGCTTTCTATAAGAGCTTGACTAATG	SalI
	Rev.	29	CTCGAGTTAGTCAACTTCCTCCATCTTGC	XhoI
6	Forw.	26	GTCGACCTCTTGCTGTTTGAGACTGC	SalI
	Rev.	29	CTCGAGTTAGTCAACTTCCTCCATCTTGC	XhoI

Tabulka 1: Přehled primerů využitých pro amplifikaci jednotlivých úseků Hsp90_{MT}

3.1.2. Transformace *Escherichia coli*

Ligační směsi, popř. vektory jsem transformovala metodou teplotního šoku do kompetentních bakterií *Escherichia coli* XL1blue (Sambrook a Russel, 2001) nebo DH5 α (Sambrook *et al.*, 1989). Pro expresi rekombinantních proteinů jsem využila overexpresní kmen Rosetta 2 (Novagen). 4 μ l liganí směsi, resp. 1-3 μ l vektoru jsem přidala k 0,5 ml bakterií rozmražených na ledu a inkubovala dále na ledu 25 min,

	Množství
pepton	20 g/l
yeast extrakt	5 g/l
glukosa	20 mM
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM

poté jsem směs vystavila 42°C 1 min. a znovu zchladila 2 min na ledu. Ke směsi jsem ihned přidala 1 ml SOC média (Tabulka 2), ve kterém byly bakterie zotaveny při 37°C za stálého třepání (180rpm) 1 hodinu. Nadbytečné médium jsem odstranila centrifugací a transformované bakterie rozetřela na plotnu s LB médiem (Tabulka 3) s přidavkem kanamycinu (50 mg/l), v případě AT klonování

Tabulka 2: Složení SOC média

Složky	Množství (g/l)
pepton	10
yeast extrakt	5
NaCl	10
agar	17,5

obohaceným o 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranosid (X-gal, 80 mg/l), a kultivovala při 37°C do

Tabulka 3: Složení LB média

druhého dne. Selektce po AT klonování je tedy založena jednak na kanamycinové rezistenci nesené plazmidem pDrive, kdy přežívají jen transformované buňky, a za druhé na aktivitě LacZ-peptidu, který štěpí X-gal za vzniku modrého indolového zbarvení bakteriálních kolonií. Klonovací místo plasmidu pDrive leží uvnitř LacZ genu, inzerce fragmentu tudíž ruší aktivitu LacZ-peptidu a bakteriální kolonie zůstávají bílé. Selektce kolonií obsahujících overexpresní vektor je založena na rezistenci ke kanamycinu, kterou nese pET28. Přítomnost fragmentu jsem dodatečně zkontrolovala také po přečárkování předběžně vybraných kolonií na nové plotny (kultivace 1 den, 37°C) pomocí PCR. Přečárkované bakterie jsem skladovala při 4°C, přičemž životaschopné zůstaly minimálně jeden měsíc.

3.1.3. Izolace plazmidové DNA z *E. coli* a příprava bakteriálních konzerv

Vybrané kolonie *E. coli* jsem zaočkovala do 3ml tekutého LB média s kanamycinem (50 mg/l) a kultivovala přes noc při 37°C. Bakterie jsem sklízela centrifugací (8000 g, 1 min). Izolaci plazmidu jsem provedla pomocí kitu Wizard *Plus*

SV Minipreps Purification System (Promega) dle přiloženého protokolu. Izolovaný plazmid jsem skladovala při -20°C .

Z každé narostlé bakteriální kultury jsem připravila bakteriální konzervy pro případné pozdější využití. 270 μl narostlých bakterií v LB médiu jsem smíchala s 30 μl glycerolu, vortexovala a ihned zamrazila v tekutém dusíku.

3.1.4. PCR reakce a klonování kandidátních úseků do plazmidu pDrive

3.1.4.1. PCR reakce

Reakce jsem připravila podle základního schématu, které jsem podle potřeby modifikovala: 10 ng templátu, tj. plazmidové DNA; 2,5 u rekombinantní Taq DNA polymerázy (Fermentas), $1\times$ Taq pufr s 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Fermentas), 1,5 mM MgCl_2 , 1 μM specifické primery (Tabulka 1) a 0,2 mM dNTPs. Během reakce jsem používala program zahrnující počáteční denaturaci (94°C , 3 min) a tři opakující se kroky: denaturace (94°C , 30 s), „annealing“ (nasedání primerů: $T_m - 5^{\circ}\text{C}$, 30-60 s), polymerace (72°C , cca 1 min/1000 bp). Počet cyklů jsem volila dle charakteru reakce. Vzhledem k amplifikaci fragmentu určeného pro TA klonování jsem na konec programu navíc zařadila krok prodloužené polymerace (72°C , 10 min), který zajistil připojení dATP na 3' konce fragmentu.

3.1.4.2. Elektroforéza DNA

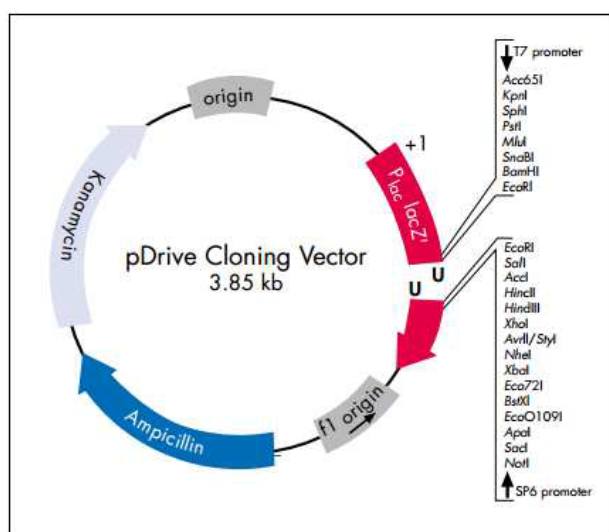
Elektroforéza DNA (Sambrook *et al.*, 1989) probíhala v agarózovém gelu. Koncentrace agarózy byla 1,2%. Naváženou agarózu jsem rozvařila v objemu $0,5\times$ TAE pufru (na 1000 ml: 2,42 g Tris base, 5,71 ml ledové kyseliny octové, 1 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)). Po ochlazení na přibližně 70°C jsem přidala GelRed (Biotium) v koncentraci 10 μl /100 ml. Po ztuhnutí (cca 45 minut) jsem gel přelila $0,5\times$ TAE pufrem a do jamek nanasela vzorky DNA smíchané s nanášecím pufrem 6x DNA Loading Dye (Fermentas) v poměru 5:1. Jako marker jsem použila 2 μl GeneRuler (Fermentas). Dělení probíhalo v poli stejnosměrného elektrického proudu o intenzitě elektrického pole asi 4 V/cm. Gel s rozdělenou DNA jsem vyfotila pomocí UV transiluminátoru a fotoaparátu Olympus Camedia C-3030ZOOM. Koncentrace DNA či plazmidů jsem stanovovala pomocí programu GeneSnap na základě záznamu agarózového gelu.

3.1.4.3. Extrakce DNA z agarózového gelu a přečištění DNA

DNA jsem izolovala z gelu pomocí kitu QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit (QIAGEN). Čistým ostrým skalpelem jsem z agarózového gelu vyřízla bloček gelu s fragmentem požadované velikosti. Dále probíhala izolace podle protokolu dodaného s kitem. Purifikovanou DNA jsem na závěr rozpustila v 50 μ l 1mM Tris-HCl (pH 8,5) a skladovala při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.1.5. Ligace do pDrive vektoru

Izolovanou DNA jsem ligovala do linearizovaného AT klonovacího vektoru pDrive (Qiagen) (Obrázek 6) pomocí kitu QIAGEN PCR Cloning Kit (QIAGEN). Složení 10 μ l reakční směsi: 1 μ l pDrive Cloning Vector, 4 μ l ligační směsi, 5 μ l 2x ligačního pufru. Ligace probíhala přes noc při 4°C .



Obrázek 6: AT klonovací vektor pDrive.

3.1.6. Sekvence DNA

Plazmidy na ověření sekvencí klonovaných úseků jsem izolovala podle výše zmíněného postupu. Sekvence zajišťovala Laboratoř sekvenace DNA (PřF UK, Viničná 7). Směsi na sekvenaci jsem zpočátku připravovala do objemu 14 μ l, později do 8 μ l. Směs obsahovala vždy 5 pmol pouze jednoho primeru (forward či reverse pro

daný vektor), a 200 – 300 ng plazmidu. Pro vektor pDrive byly jako primery použity M13 primery (forward či reverse; Qiagen), pro vektor pET28 primery T7 (forward či reverse; Qiagen).

3.1.7. Restrikční štěpení fragmentů z pDrive vektoru a ligace do vektoru pET28b

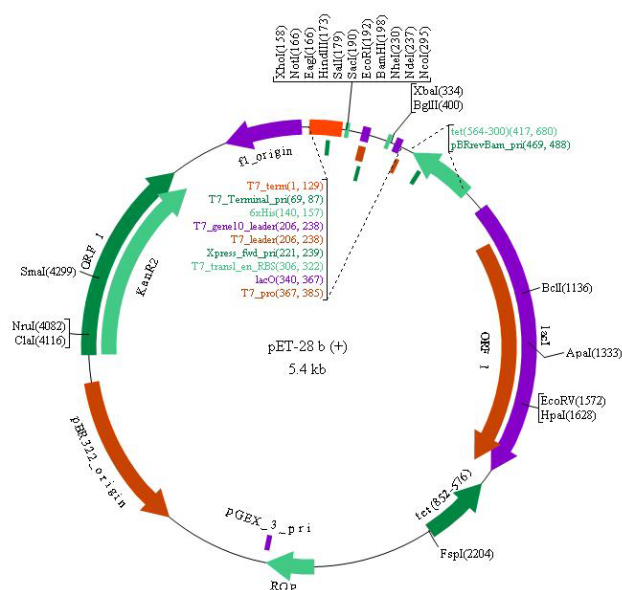
Vektory pDrive obsahující jednotlivé úseky Hsp90_MT jsem podrobila spolu s vektorem pET28b (Novagen) restrikčnímu štěpení. Restrikční enzymy byly použity na základě příslušných zanesených restrikčních míst. Restrikční směs (restrikční enzymy i pufr, Fermentas) použitá pro každý kandidátní úsek je uvedena v tabulce (Tabulka 4). Štěpení probíhalo 3 hodiny při 37° C. Naštěpené produkty jsem dělila v 1,2% agarózovém gelu a požadovanou DNA jsem izolovala dle výše zmíněného postupu.

Úsek Hsp90_MT	Restrikční směs (50 µl)
1	30 µl plazmidové DNA 6,2 µl SalI 1,5 µl HindIII 10 µl Tango2x 2,3 µl dH ₂ O
2	31,69 µl plazmidové DNA 6,46 µl SalI 1,85 µl HindIII 10 µl Tango2x
3	7,5 µl plazmidové DNA 1,8 µl SalI 0,6 µl HindIII 10 µl Tango2x 30,1 µl dH ₂ O
4	7,5 µl plazmidové DNA 1,35 µl SalI 2,77 µl XhoI 5 µl Orange buffer 33,4 µl dH ₂ O
5	7,5 µl plazmidové DNA 1,5 µl SalI 3 µl XhoI 5 µl Orange buffer 33 µl dH ₂ O
6	7,5 µl plazmidové DNA 1,85 µl SalI

	3,75 µl XhoI 5 µl Orange buffer 31,9 µl dH ₂ O
--	-----------------------------------------------------------------

Tabulka 4: Složení restrikčních směsí pro ligaci do vektoru pET28b

Ligace naštěpeného fragmentu do overexpresního vektoru pET28b (přes noc, 4°C; Novagen, Obrázek 7) zajistila připojení N-terminální polyhistidinové kotvy. Ligační směs jsem transformovala do bakterií *E. coli* XL1blue (Sambrook a Russel, 2001) či DH5 α (Sambrook *et. al.*, 1989).



Obrázek 7: Vektor pET28b.

3.2. Izolace úseků proteinu Hsp90_{MT}

3.2.1. Overexprese bakterií

Bakterie *E. coli* Rosetta2 (Novagen), určené pro expresi rekombinantních proteinů, jsem transformovala (viz výše) a selektovala na základě rezistence ke kanamycinu. Veškerá LB média připravovaná pro následné overexprese jsem vyráběla ze sojového peptonu. Jednu kolonii jsem zaočkovala do 10 ml tekutého LB média s kanamycinem, kde byla inkubována za stálého třepání přes noc při 37°C. 3ml narostlé bakteriální kultury jsem přenesla do 500ml čerstvého tekutého LB média

s kanamycinem, kde rostly při 37°C do dosažení optické denzity $OD_{600} = 0,35$. Pak jsem přidala 1 mM IPTG (isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid) a bakterie jsem kultivovala dalších 3-5 hodin při 37°C. Počet hodin byl určen na základě testu optimální doby overexprese pro každý úsek.

Bakterie jsem následně centrifugovala při 7000g, 10 min, ve 4°C. Supernatant jsem odstranila, bakteriální pelet jsem resuspendovala v 10 ml 1x vazebného pufru (20 mM 8xPhosphate stock solution, 500 mM NaCl, 20 mM imidazol, pH 7,4-7,6; ředěno ze zásobního 8x koncentrovaného roztoku dodávaného jako součást kitu (HisTrap FF crude kit, GE Healthcare) na cílovou 20 mM koncentraci. K resuspendovaným peletům jsem přidala 10 mM DTT (dithiotreitol) a sonikovala je na ledu 20 x 8 sec, při 50% výkonu. Supernatant jsem centrifugovala při 14 000g, 10 min, 4°C a přefiltrovala přes 0,22 μ m filtrátka, čímž se odstranily zbylé nečistoty.

3.2.2. Purifikace rekombinantních proteinů pomocí Ni kolony

Části proteinu Hsp90_MT jsem z bakterií izolovala na stejném principu, tedy afinity His-kotvy k Ni^{2+} iontům, ale dvěma různými způsoby. První způsob využíval Ni-NTA kolonu, která již byla dříve sestavena na pracovišti. Kolonu s navázanými Ni^{2+} ionty jsem čtyřikrát promyla roztokem 10 mM imidazolu (50 mM Tris, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, 100 mg/l cholát, pH 7,8), na konci čtvrtého promývání jsem změřila OD_{280} . Následně jsem na kolonu nalila přečištěný supernatant obsahující rekombinantní protein a nechala roztok kolonou projít pouze na základě gravitace. Poté jsem vymývala nenavázané proteiny 10 mM imidazolem, dokud se OD_{280} nerovnálo hodnotě prvního měření. Kolona byla poté jednou promyta roztokem 10 mM imidazolu s 1M NaCl (50 mM Tris, 1M NaCl, 10 mM imidazol, 100 mg/l cholát, pH 7,8) a jednou opět roztokem 10 mM imidazolu s 300 mM NaCl. Navázaný rekombinantní protein jsem z kolony vymyla roztokem koncentrovaného imidazolu (50 mM Tris, 300 mM NaCl, 250 mM imidazol, pH 7,8) a jímala po 7 ml do sterilních falkon. Vzorky jsem následně využila ke kosedimentaci s MT.

Druhou možností byla purifikace pomocí komerčně dostupné agarózové kolony s obsahem Ni^{2+} iontů (HisTrap FF crude kit, GE Healthcare). Po inkubaci agarózy se supernatantem obsahujícím rekombinantní protein jsem kolonu promývala roztoky se zvyšující se koncentrací imidazolu (EB40 (dodávaný fosfátový pufr s 40 mM imidazolem, pH 7,4-7,6), EB300 (dodávaný fosfátový pufr s 300 mM imidazolem, pH

7,4-7,6) a EB500 (dodávaný fosfátový pufr s 500 mM imidazolem, pH 7,4-7,6). Frakce prošlé kolonkou jsem jíkala a přítomnost rekombinantního purifikovaného proteinu jsem ověřovala SDS elektroforézou. Pro další pokusy byla vybrána frakce s nejvyšším obsahem příslušného úseku Hsp90_{MT}.

Vzhledem k nečistotám, které se spolu se zkrácenými proteiny na gelu vyskytovaly, bylo nutné promývat kolonku s navázanými proteiny také eluačními roztoky EB100 (dodávaný fosfátový pufr se 100 mM imidazolem, pH 7,4-7,6) a EB 200 (dodávaný fosfátový pufr s 200 mM imidazolem; pH 7,4-7,6).

Koncentrace proteinů byla změřena pomocí Bradford Bio-Rad Protein Assay (BIO-RAD, kat. č. 500-0006).

3.3. Kosedimentace proteinů s mikrotubuly

1) Polymerace tubulinu

250 µg hovězího neurotubulinu (Cytoskeleton, Inc.) jsem rozpustila ve 25 µl polymeračního pufru (PEM, 100 mM PIPES, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, pH 6,8 upraveno KOH; výsledná koncentrace 10mg/ml) a smíchala s 25 µl PEMgly (20% (v/v) glycerol v PEM pufru) a 2 mM GTP. Roztok byl inkubován 20 min při 35°C (bez třepání), aby došlo k polymeraci tubulinu. Mezitím jsem připravila roztok 400 µl PEM obohacený o 1 mM GTP a 40 µM taxol (PEMGT) a temperovala na 35°C. PEMGT jsem smíchala s 50 µl roztoku tubulinu, a dále uchovávala při teplotě 28°C.

2) Příprava reakčních směsí pro kosedimentaci

Připravila jsem proteinové roztoky v extrakčním pufru (A-D) a přidala k nim tubulin či kontrolní roztok (pouze PEM) dle níže uvedeného rozpisu. V každé variantě byl použit extrakční pufr (EP, 25mM MES, 5mM EGTA, 5mM MgCl₂, 1M glycerol, pH 6,9) a byly přidány také inhibitory proteáz (Protease inhibitor cocktail, Sigma, kat.č. 9599) v poměru 1:100. Proteiny byly inkubovány s polymerovaným tubulinem 1 hodinu při 28°C.

Reakcí směsi pro test kosedimentace jednotlivých úseků:

A - 133μl EP + 0,05mg/ml BSA + prot.	+ taxol 8μM	1 - roztoku tubulinu (10mg/ml) + A
B - 133μl EP + 0,05mg/ml BSA + prot.	+ taxol	2 - 142μl PEM + 8μl PEMgly + B
C - 200μl EP + 0,05mg/ml BSA	+ taxol	3 - roztoku tubulinu (10mg/ml) + C
D - 200μl EP +	+ taxol	4 - roztoku tubulinu (10mg/ml) + D

Koncentrace proteinů byla volena 2x nižší oproti koncentraci tubulinu a pro každý úsek Hsp90_MT byla stanovena metodou podle Bradforda (1976). Koncentrace proteinů jednotlivých úseků jsou uvedeny v tabulce v kapitole Výsledky (Tabulka 8).

3) Kosedimentace s polymerovaným tubulinem

Mikrotubuly s navázanými proteiny jsem ultracentrifugovala přes sacharózový polštář [20% sacharóza v EP s inhibitory proteáz 1:100 (Protease inhibitor cocktail, Sigma, 9599)] při 100 000g 1 hodinu, 25°C. Supernatant a polštář jsem odebrala a srážela TCA. Pelet jsem resuspendovala ve 100μl EP a ihned zamrazila.

3.4. Precipitace proteinu pomocí TCA

Vzorky (supernatanty, sacharózový polštář) z kosedimentačních reakcí jsem srážela TCA (Bensadoun a Weinstein, 1976). Vzorek jsem smíchala 1:1 s roztokem 1,5% deoxycholátu sodného a 1% azidu sodného, promíchala a inkubovala 15 minut při laboratorní teplotě. Následně jsem přidala 10% roztoku 72% kyseliny trichlóroctové, promíchala a centrifugovala (30 min, 15 000 g). Supernatant jsem odstranila, vzniklý pelet resuspendovala v 1 ml ledového 80% acetonu a suspenzi jsem znovu centrifugovala (30 min, 15 000 g), supernatant jsem odsála a sediment vysušila na vzduchu.

3.5. Proteinová SDS-PAGE elektroforéza (Laemmli, 1970)

Vzorky z TCA srážení (supernatanty, polštáře) jsem rozpustila ve 100 μ l vzorkového denaturačního pufru (Tabulka 5). Pelety s polymerovaným tubulinem a navázanými proteiny v EP jsem smíchala 1:1 se vzorkovým denaturačním pufrem. Před nanášením na gel jsem všechny vzorky zahřála (5 min, 99°C).

Složky	Množství
Tris - HCl, pH	50mM
SDS	2%
urea	36%
glycerol	30%
merkaptoetanol	5%
bromfenolová modř	0,5%

Při nanášení jsem dbala na zachování poměrného množství vzorků supernatantu/polštáře vůči peletu.

Na rozdělení proteinů SDS (sodium-dodecylsulfát)/polyakrylamidovou elektroforézou bylo použito zařízení Minigel twin (Biometra). Byl používán 4% zaostřovací gel [roztok monomerů (30% roztok akrylamidu); 1,5 M TRIS; pH 6,8; H₂O; 10% SDS; 40% AP (ammoniumpersulfát), TEMED] a 10% či 15% dělicí gel pro krátké úseky Hsp90_MT [roztok monomerů (30% roztok akrylamidu); 1,5 M TRIS; pH 8,8; H₂O; 10% SDS; 40% AP (ammoniumpersulfát); TEMED], napětí 100V, proud 25 mA/gel a výkon 70W. Elektroforeticky rozdělené proteiny byly vizualizovány pomocí barviva Coomassie Brilliant Blue R-250 (0,25%, Sigma-Aldrich) v 10% kyselině octové a 45% metanolu nebo pomocí barvení stříbrem (ProteoSilver™ Silver Stain kit, Sigma-Aldrich) s postupem dle návodu.

3.6. Měření denzity kosedimentovaných proteinů úseků Hsp90_MT z SDS gelů

Denzitu jednotlivých úseků Hsp90_MT na SDS gelech z kosedimentačních reakcí jsem měřila s pomocí kalibrovaného denzitometru GS-800 (BioRad) ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby, v.v.i. (Drnovská 507/73, Praha 6 – Ruzyně) s laskavým souhlasem a pomocí Mgr. Pavla Vítámváse, Ph.D. Získaná data byla analyzována v programu QuantityOne- 4.6.2. a vyhodnocena v programu Microsoft Office Excel.

4. Výsledky

4.1. Navržení kandidátních úseků pro vazbu Hsp90_MT k MT

Vazba Hsp90 k MT byla pozorována jak u živočichů, tak u rostlin. Asociace těchto dvou struktur se v živočišných buňkách odehrává dokonce na čtyřech úrovních, a to vazbou Hsp90 k tubulinovým dimerům (Weis *et al.*, 2010), k celým MT (Williams a Nelsen, 1997), Hsp90 je součástí heterokomplexu podílejícího se na transportu steroidních hormonů, který je asociovaný s MT (Pratt *et al.*, 1999; Harrell *et al.*, 2002) a v neposlední řadě je nezbytnou součástí centrosomu (Lange *et al.*, 2000; Glover, 2005). U rostlin byla nepřímá vazba Hsp90 na tubulin v minulosti několikrát prokázána (Nick *et al.*, 1995; Petrášek *et al.*, 1998; Freudenreich a Nick, 1998), nicméně doklad o přímé interakci Hsp90 s MT se podařilo prokázat až v nedávné době za pomoci kosedimentačních metod s polymerovaným tubulinem *in vitro* (Krtková *et al.*, 2012). Vzhledem ke schopnosti této specifické cytozolické izoformy Hsp90 vázat se k MT ji autoři Krtková *et al.* (2012) nazvali Hsp90_MT a uložili pod číslem HQ834904 v databázi GenBank, popřípadě A2YWQ1 v databázi UniProt.

Kompletně anotovaná sekvence Hsp90 u modelového organismu *Arabidopsis thaliana* je popsána u sedmi cytozolických forem AtHsp90 (Obrázek 8). Autoři zde rozdělili pomocí programu CLUSTALX molekulu Hsp90 do několika bloků, které zahrnují sekvence charakteristické pro rodinu Hsp90 (Krishna a Gloor, 2001).

```

AtHsp90-3 1 -----
AtHsp90-2 1 -----
AtHsp90-4 1 -----
AtHsp90-1 1 -----
AtHsp90-7 1 -----MRKRTLVSVLFLFSLFLLPDQGRKLHANAESSDDVTDPP
AtHsp90-5 1 -----MAPALSRSLYTSPLTSVP----ITPLFSSLSS-----
AtHsp90-6 1 MIRLSKRSVSTLLRSGNQSFRIAAAASSTRSSPSATDVKRSDTESRWYSSLTNGQSKNSG
-----
                                BLOCK_A
AtHsp90-3 1 -----MADAETFAFQAEINQLLSLIINTFYSNKE
AtHsp90-2 1 -----MADAETFAFQAEINQLLSLIINTFYSNKE
AtHsp90-4 1 -----MADAETFAFQAEINQLLSLIINTFYSNKE
AtHsp90-1 1 -----MADAETFAFQAEINQLLSLIINTFYSNKE
AtHsp90-7 42 KVEEKIGGHGGLSTDSDVVHRESESMKKTLRNSAEKFEFQAEVSRLLMIIINSLYSNKD
AtHsp90-5 29 ---EKLVSPTRRSFKNRRFCDAAVAEEKETTEEGSGEKFEYQAEVSRLLDLIVHSLYSHKE
AtHsp90-6 61 SF-AQLNMKTNWFMGYRNESSAAASDSSSQAPPAEKFEYQAEVSRLLDLIVNSLYSNKE
                                . . * * .***. * . * . . * * . .
-----HATPase-c-family-----
                                BLOCK_A                                BLOCK_B
AtHsp90-3 30 IFLRELISNSSDALDKIRFESLTDKSKLD--GQPELFIHIIIPDKTNNTLTIIDSGIGMTK
AtHsp90-2 30 IFLRELISNSSDALDKIRFESLTDKSKLD--GQPELFIHIIIPDKTNNTLTIIDSGIGMTK
AtHsp90-4 30 IFLRELISNSSDALDKIRFESLTDKSKLD--GQPELFIHIIIPDKTNNTLTIIDSGIGMTK
AtHsp90-1 30 IFLRELISNSSDALDKIRFESLTDKSKLD--GQPELFIHIIIPDKTNNTLTIIDSGIGMTK
AtHsp90-7 102 IFLRELISNASDALDKIRFLALTDKDLGEGDTAKLEIQIKLDAKKILSIRDRGIGMTK
AtHsp90-5 86 VFLRELISNASDALDKIRFLSVTEPSLLG--DGGDLERIKPPDPNGTITITDTGIGMTK
AtHsp90-6 120 VFLRELISNASDALDKIRFLSVINPELSK--DAPDLDIRIYADKENGITLTDGIGMTK
                                .*****. * * . . . . . . . . . . * * . . . . . * .*****.
-----
                                BLOCK_B                                BLOCK_C
AtHsp90-3 88 ADLVNNLGTIARSGTKEFMEALA---AGADVSMIGQFGVGFYSAYLVADKVVV--TTKH
AtHsp90-2 88 ADLVNNLGTIARSGTKEFMEALA---AGADVSMIGQFGVGFYSAYLVADKVVV--TTKH
AtHsp90-4 88 ADLVNNLGTIARSGTKEFMEALA---AGADVSMIGQFGVGFYSAYLVADKVVV--TTKH
AtHsp90-1 88 ADLVNNLGTIARSGTKEFMEALQ---AGADVSMIGQFGVGFYSAYLVADKVVV--TTKH
AtHsp90-7 162 EDLIKNLGTIAKSGTSAFVEKMQ---SSGDLNLIGQFGVGFYSAYLVADYIEV--ISKH
AtHsp90-5 144 EELIDCLGTIAQSGTSKFLKALKENKDLGADNGLIGQFGVGFYSAYLVADKVVV--TTKH
AtHsp90-6 178 QELVDCLGTIAQSGTAKFMKALKDSDKAGDNNLIGQFGVGFYSAYLVADRVIV--STKSP
                                . * .*****. * * . . . . . . . . . . * * .*****. * * .*****.
-----
                                BLOCK_C                                BLOCK_D
AtHsp90-3 142 NDDEQYVWESQAGG-SFTVTRDTSGE-ALGRGTMVLYLKEDQM-EYIEERLKDVLVKKH
AtHsp90-2 142 NDDEQYVWESQAGG-SFTVTRDTSGE-TLGRGTMVLYLKEDQL-EYLEERLKDVLVKKH
AtHsp90-4 142 NDDEQYVWESQAGG-SFTVTRDTSGE-ALGRGTMVLYLKEDQM-EYIEERLKDVLVKKH
AtHsp90-1 142 NDDEQYVWESQAGG-SFTVTRDVTGGE-PLGRGTKISLFLKDDQL-EYLEERLKDVLVKKH
AtHsp90-7 216 NDDSQYVWESKANG-KFAVSEDTWNE-PLGRGTEIRLHLRDEAG-EYLEESKLELVKRY
AtHsp90-5 204 KSDKQYVWESVADSSSYLIREETDPDNLRRGTQITLYLREDDKYEFABSTRIKLVKNY
AtHsp90-6 237 KSDKQYVWEGEANSSTFIQEDTDPQSLIPRGTRITLHLKQEAQ-NFADPERIQLVKNY
                                . * .*****. * * . . . . . . . . . . * * .*****.
-----
                                GLU_RICH_PROSITE                                211-279
                                CK-II site
                                _D                                _BLOCK_E
AtHsp90-3 199 SEFISMGISLWIEKTIKEISDDE----E---KKDEEGKVEEVDEEKEKEKKEKKEKIK
AtHsp90-2 199 SEFISYPISLWIEKTIKEISDDE----E---KKDEEGKVEEVDEEKEKEKKEKKEKIK
AtHsp90-4 199 SEFISYPISLWIEKTIKEISDDE----E---KKDEEGKVEEVDEEKEKEKKEKKEKIK
AtHsp90-1 199 SEFISYPIYLWTEKTEKEISDDE----DEDEPKKENEGEVEEVEEKEKDKGKKEKIK
AtHsp90-7 273 SEFINFPISLWASKEVETEVPVEEDESADDEETETSTEEBKEEDAEEEDGEEKKTKKVK
AtHsp90-5 264 SQFVGFPIYTWQEKSRITVEE-ED----EPVK-----EG-EEVKKGEPKKEKTKK--T
AtHsp90-6 296 SQFVSFPIYTWQEKGYTKEVEVED----DPTE-----TK-KDDQDDQTEKKKTKKVV
                                * . . . . * . * . * . * . . . . . . . . . . * . . . .

```



```

    _GLU_RICH_PROSITE_
    _BLOCK_E_
AtHsp90-3 253 EVSHEWDLVNKQKPIWMRKPEEINKEEYAAFYKSLNDWDKD--LAVKHFVVEGQLEFKA
AtHsp90-2 253 EVSHEWDLVNKQKPIWMRKPEEINKEEYAAFYKSLNDWEEH--LAVKHFVVEGQLEFKA
AtHsp90-4 253 EVTHEWDLVNKQKPIWMRKPEEINKEEYAAFYKSLNDWEEH--LAVKHFVVEGQLEFKA
AtHsp90-1 254 EVSHEWELINKQKPIWLRKPEEITKEESAIFYKSLTNDWEDH--LAVKHFVVEGQLEFKA
AtHsp90-7 333 ETVYEWELLDNVKATWLRSPKEVTEEBEYTKFYHSLSKDFTDEKPMWSSHFAEGDVVFKA
AtHsp90-5 309 EKYWDWELANETKPLWMRISKVEVKEGYEFYKKAFFEFDLP--LAHTHFTTEGEVEFERS
AtHsp90-6 344 ERYWDWELTNETQPIWLRNPKVTTAEYNEFYKKAFFEYLDLP--LASSHFTTEGEVEFERS
*  .*. * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . .

    _BLOCK_F_
AtHsp90-3 311 ILFVPKRRPFDLLYTKKKPN--NISLYVRRVFIMTYCE-DIIPYELGFVKGIVDSEDLPL
AtHsp90-2 311 ILFVPKRAPPDLFDTKKKPN--NIKLYVRRVFIMDNCE-DIIPYELGFVKGIVDSEDLPL
AtHsp90-4 311 ILFVPKRAPPDLFDTKKKPN--NIKLYVRRVFIMDNCE-DIIPDYELGFVKGIVDSEDLPL
AtHsp90-1 312 ILFVPKRAPPDLFDTRKKNL--NIKLYVRRVFIMDNCE-ELIPEYLSFVKGIVDSDLLPL
AtHsp90-7 393 VLYVPKAPHDLYESYNSKANLKYVRRVFI SDEFD-ELLPKYLSFKLGLVDSDTLPL
AtHsp90-5 367 ILYIPGMGPLNNDVTVNPKT-KNIRLYVRRVFI SDHFDGELFPRYLSFVKGIVDSDLLPL
AtHsp90-6 402 ILYVPPVPSGKDDIVNPKT-KNIRLYVRRVFI SDDFDGELFPRYLSFVKGIVDSDHLLPL
*. * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . .

    _BLOCK_G_
AtHsp90-3 368 NISRETLQQNKISMVIRKNLVKKCLELFFEIAENKED-----Y
AtHsp90-2 368 NISRETLQQNKILKVIIRKNLVKKCLELFFEIAENKED-----Y
AtHsp90-4 368 NISRETLQQNKILKVIIRKNLVKKCLELFFEIAENKED-----Y
AtHsp90-1 369 NISRETLQQNKILKVIIRKNLVKKCIEMFNIEIAENKED-----Y
AtHsp90-7 452 NVSREMLQQHSSLKTIKKLIRKALDMIRKLAEEDPDEIHDEKDKVEKSGENDEKKGQY
AtHsp90-5 426 NVSREILQERRIVRIMRKRIRKTFDMIQESISSENKED-----Y
AtHsp90-6 461 NVSREILQESRIVRIMRKRIRKAFDMILGISLSENRED-----Y
* . . . . * . . . . * . . . . * . . . . *

    _BLOCK_H_
AtHsp90-3 406 NKFYEAFSKNLPGIHEDSKI RTKIAELLRYHSTKSGDELTSKDYVTRMKEGQNDIFYI
AtHsp90-2 406 NKFYEAFSKNLKLGIHEDSQNR TKIAELLRYHSTKSGDELTSKDYVTRMKEGQNDIFYI
AtHsp90-4 406 NKFYEAFSKNLKLGIHEDSQNR TKIAELLRYHSTKSGDELTSKDYVTRMKEGQNDIFYI
AtHsp90-1 407 TKFYEAFSKNLKLGIHEDSQNR GKIAELLRYHSTKSGDEMTSPKDYVTRMKEGQNDIFYI
AtHsp90-7 512 TKFWNEFGKSVKLGIEIDAANRNLAKLLRFETTKSDGKLTSLDQYIKRMKKSQKIDFYI
AtHsp90-5 466 KKFWEFGRFLKLGCIEDTGNHKRI TPLLRFFSSKNEEELTSLDDYIENMGENQKAIYYL
AtHsp90-6 501 EKFWDNFGKHLKLGCIEDRENHKRIAPLLRFFSSQSENDMISLDEYVENMKPEQKAIYFI
* . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . .

    _BLOCK_H_ | _BLOCK_I_
AtHsp90-3 466 TGESKKAVENTSPFLEKLLKKGIEVLYMVD AIDEYAI GQLKEFE GKKLVSATKEGLKLD--
AtHsp90-2 466 TGESKKAVENTSPFLEKLLKKGIEVLYMVD AIDEYAI GQLKEFE GKKLVSATKEGLKLD--
AtHsp90-4 466 TGESKKAVENTSPFLEKLLKKGIEVLYMVD AIDEYAI GQLKEFE GKKLVSATKEGLKLE--
AtHsp90-1 467 TGESKKAVENTSPFLERLKKRGYEVLYMVD AIDEYAV GQLKEYD GKKLVSATKEGLKLED--
AtHsp90-7 572 TGSKEQLKSPFLERLIKGYEVIFFTDPV DEYLMQYLM DYEDKKFQNVMSKEGLKVG--
AtHsp90-5 526 ATDSLKSAKSAFPLEKLIKQKDI ELYLVLEPI DEVAIQNLQTYK KKFVDISKEDLELG--
AtHsp90-6 561 ASDSITSAKNAPLEKMLEKGLEVLYLVEPI DEVAVQSLKAYKEKDFVDISKEDLDLGNM
* . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . .

    _BLOCK_J_
AtHsp90-3 583 RIMKAQALRDSSMGYMSKKTMEINPENLIMDELRRKRADADKNDKSVKDLVLLLFETAL
AtHsp90-2 583 RIMKAQALRDSSMGYMSKKTMEINPENLIMDELRRKRADADKNDKSVKDLVLLLFETAL
AtHsp90-4 583 RIMKAQALKDSNTGGYMSKKTMEINPENLIMDELRRKRAEADKNDKSVKDLVLLLFETAL
AtHsp90-1 585 RIMKAQALRDSSMGYMSKKTMEINPDNGIMEELRRKRAEADKNDKSVKDLVMLLYETAL
AtHsp90-7 686 RIMQSQTLSANKQAYMRGKRVLINRHPH I IKELKDRIASDPEDES KETAQLMYQTAL
AtHsp90-5 641 RLKKAQALGDTSSLEFMRGRRILEINPDHPI IKDLNAACKNAPESTEATRVDLLDYDTAI
AtHsp90-6 680 RLKKAQSTGDTTSLDYMKGRRVFEINPDHSI IKNINAAYNSNPDEDAMRAIDLMDYDAAL
*. * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . .

AtHsp90-3 643 LTSGFSLDEPNTFGSRIHRMLKLGLSIEEDDAVEADAEMPPLDADDAGSKMEEVD---
AtHsp90-2 643 LTSGFSLDEPNTFGSRIHRMLKLGLSIDDDDAVEADAEMPPLDADDAGSKMEEVD---
AtHsp90-4 643 LTSGFSLDEPNTFGSRIHRMLKLGLSIEEDDAVEADAEMPPLDADDAGSKMEEVD---
AtHsp90-1 645 LTSGFSLDEPNTFAARIHRMLKLGLSIDEDENVEEDGMPELEDDAAEE-SKMEEVD---
AtHsp90-7 746 IESGFI LTPDKPFAARIYNSVKSGLNISPDAVADEEIEAAEPEPTESEATETKSDDLLAGGL
AtHsp90-5 701 ISGGFTPDPSPAEELGNKIYEMMAVAVGGRWGR-VEEE-ESSTVNEGDDKSGETEVEVE---
AtHsp90-6 740 VSSGFTPDNPAELGGKIYEMMVALSGKWSS-PEVQPQQQMAHSHDAETFEEAVEVE---
*. * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . .

AtHsp90-3 -----
AtHsp90-2 -----
AtHsp90-4 -----
AtHsp90-1 -----
AtHsp90-7 806 NIEAEPVEQQEENTKDEL
AtHsp90-5 756 -----PSEVRAESDPWQD
AtHsp90-6 796 -----PVEVDGKK-----

```

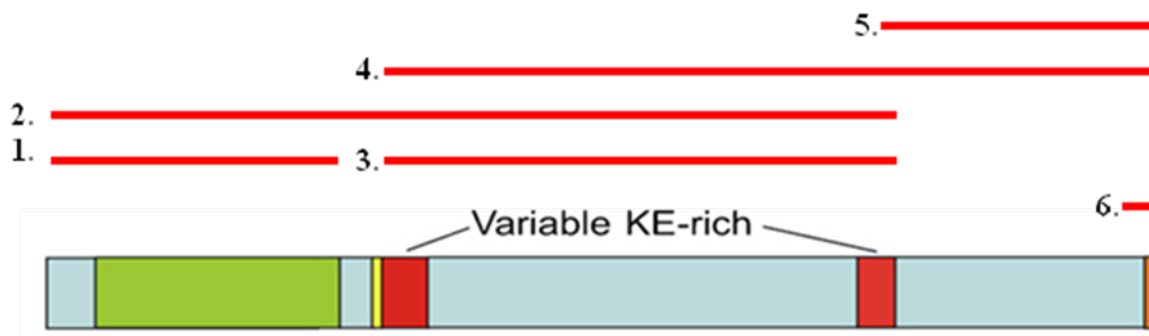
Obrázek 8: Sekvence cytozolických forem Hsp90 u *Arabidopsis thaliana*, Krishna a Gloor (2001).

Vzhledem k využívání cytozolické formy tabákového Hsp90_{MT} byly sekvence z *Arabidopsis thaliana* (AtHsp90-1) a *Nicotiana tabacum* porovnány, aby bylo orientačně určeno, v jakých místech tabákového Hsp90_{MT} se nachází charakteristické domény, konkrétně především ATP-vazebná doména a KE-bohaté úseky (7.1. Příloha 1). Sekvence jsou podle porovnání v programu BLAST identické z 87%, aminokyselinová podobnost je ještě vyšší, a to 92%. Následné kandidátní úseky molekuly Hsp90_{MT} byly voleny vzhledem k předpokladu, že za vazbu Hsp90_{MT} k proteinu je zodpovědná KE-bohatá doména.

4.2. Přehled navržených kandidátních úseků Hsp90_{MT}

Jednotlivé kandidátní úseky jsem zvolila na základě následujících předpokladů. Hsp90 obsahuje uvnitř své sekvence tzv. KE-bohatou oblast. Právě aminokyseliny lysin a kyselina glutamová jsou součástí MT-vazebných motivů také u některých živočišných i rostlinných MAP, například MAP1B, SB401 či MAP18 (Noble *et al.*, 1989; Huang *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007). Tato oblast se proto stala nejdůležitějším kandidátem pro vazbu Hsp90_{MT} k MT a je přítomna ve třech vytvořených kandidátních úsecích. Během navrhování úseků jsem však nechtěla opomenout ani ATP-vazebnou doménu vzhledem k přítomnosti potenciálně použitelných nukleotidů (GTP) na MT. První kandidátní úsek proto zahrnuje pouze tuto ATP-vazebnou doménu, druhý kandidátní úsek pak navíc obsahuje také KE-bohatou doménu, což umožní porovnat sílu vazby každé z domén k tubulinu v případě pozitivních kosedimentačních reakcí u obou úseků. Také konzervovaný C-terminální konec zahrnující sekvenci MEEVD typickou pro některé cytozolické formy Hsp90 jsem nemohla vyloučit jako jeden z možných kandidátů pro vazbu k MT, a zahrnula jsem ho proto v rámci šestého kandidátního úseku.

Pro přehlednost bude každý kandidátní úsek Hsp90_{MT} popsán zvlášť. Sekvence každého úseku je vyznačena v příloze 2 (7.2. Příloha 2) na předloze kompletní sekvence Hsp90_{MT}. Pro lepší představu zařazuji ještě grafické orientační zpracování jednotlivých kandidátních úseků molekuly Hsp90_{MT} (Obrázek 9) a tabulku, kde jsou vyznačeny délky sekvencí, molekulové hmotnosti a přítomnost charakteristických motivů v jednotlivých kandidátních úsecích Hsp90_{MT} (Tabulka 6).



Obrázek 9: Vyznačení šesti kandidátních úseků molekuly NtHsp90_MT. N-terminální ATP vazebná doména (zeleně), konzervovaná CKII kasein kinázy vážící doména (žlutě), KE-bohaté domény (červeně), C-terminální doména (oranžově); Krtková *et al.*, 2012. Pozn. – třetí úsek Hsp90_MT zahrnuje také CKII doménu.

Úsek Hsp90_MT	Umístění sekvence	Délka sekvence (pb)	Molekulová hmotnost bez His kotvy (kDa)	Molekulová hmotnost s His kotvou (kDa)	Charakteristické motivy
1	1-549	549	20	21	ATP-vazebná doména
2	1-876	867	33	34	ATP-vazebná doména; KE-bohatá doména
3	620-868	248	13,7	14,7	KE-bohatá doména
4	620-2100	1481	57	58	KE-bohatá doména, C-terminální konec
5	843-2100	1257	48	49	C-terminální konec
6	1902-2100	198	7	8	C-terminální doména (motiv MEEVD)

Tabulka 6: Umístění, délka sekvencí, molekulová hmotnost a přítomnost charakteristických domén v jednotlivých kandidátních úsecích Hsp90_MT

4.3. Vytvoření overexpresních vektorů

Všech šest úseků molekuly Hsp90_MT jsem za pomoci PCR amplifikovala, klonovala do pDrive vektoru, pomocí odpovídajících restričních enzymů vyštěpila a ligovala do overexpresního vektoru pET28b tak, aby 6xHis kotva byla na N-konci rekombinantního proteinu. To umožnilo následnou purifikaci rekombinantních úseků pomocí Ni-NTA kolony.

Úspěšná ligace do vektoru pET28b proběhla u pěti ze šesti kandidátních úseků. Do vektoru se zřejmě vzhledem k malé velikosti nepodařilo i přes opakované pokusy ligovat 6. kandidátní úsek Hsp90_MT (198 pb).

Přítomnost jednotlivých úseků Hsp90_MT ve vektoru pET28b byla ověřena dvěma způsoby. Jednak byla provedena kontrolní restrikce, jednak sekvenace vložených úseků.

4.4. Overexprese a purifikace rekombinantních proteinů

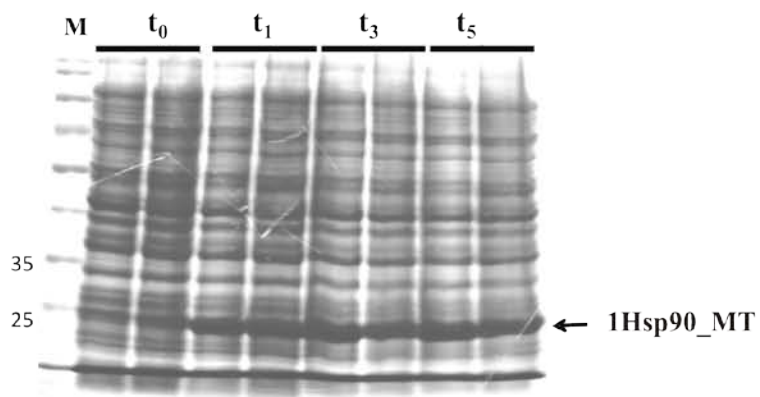
4.4.1. Testovací overexprese rekombinantních proteinů

Vektory pET28 nesoucí rekombinantní úseky Hsp90_MT jsem transformovala do overexpresního kmene Rosetta 2 *E. coli* linie, v nichž byla exprese rekombinantních úseků indukována 1mM IPTG. Nejprve jsem provedla test overexprese (OE) každého úseku u dvou náhodně vybraných bakteriálních kolonií; bakteriální proteiny spolu s overexprimovaným proteinem jsem vizualizovala na SDS gelu (Obrázek 10). Poté jsem provedla overexpresi daného úseku ve větším množství LB média. Doba exprese proteinu po indukci jsem určila podle optimální doby zjištěné při testu overexprese. Optimální doba exprese pro každý úsek je zapsána v tabulce 7 (Tabulka 7).

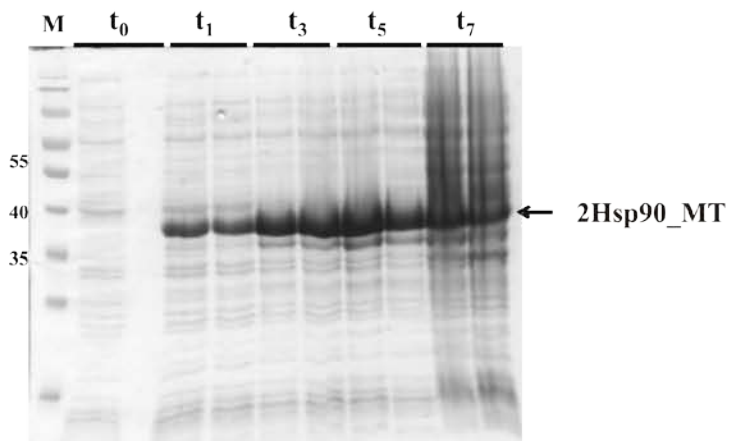
Úsek	Doba
1	3 h
2	4 h
3	3 h
4	5 h
5	5 h

Tabulka 7: Doba, po kterou probíhala exprese ve větším objemu u jednotlivých kandidátních úseků Hsp90_MT

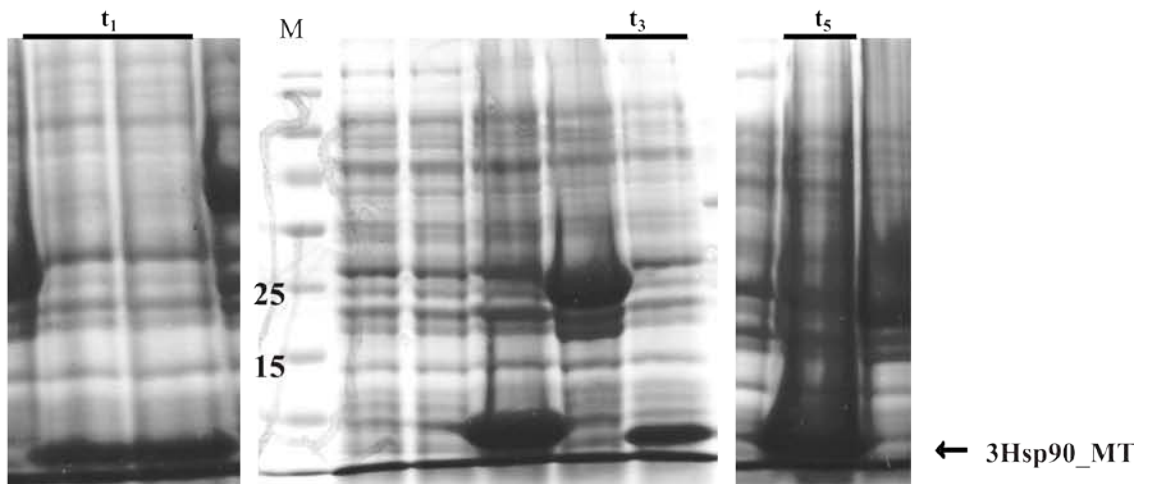
A
1. úsek Hsp90_MT



B
2. úsek Hsp90_MT

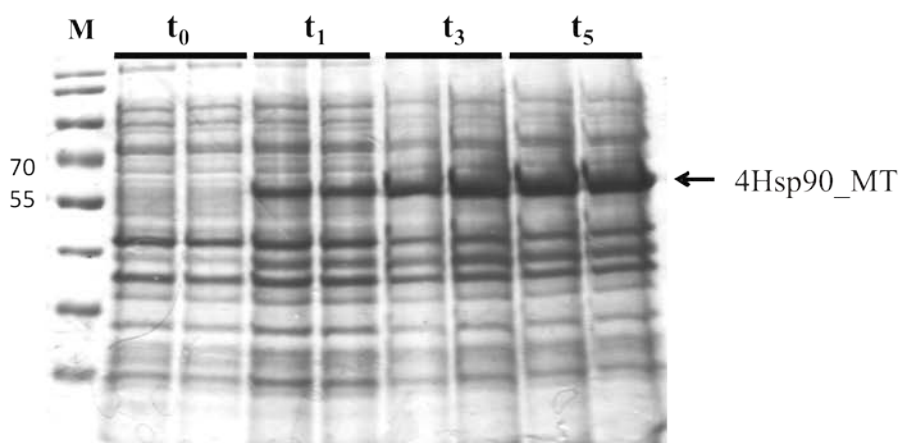


C
3. úsek Hsp90_MT



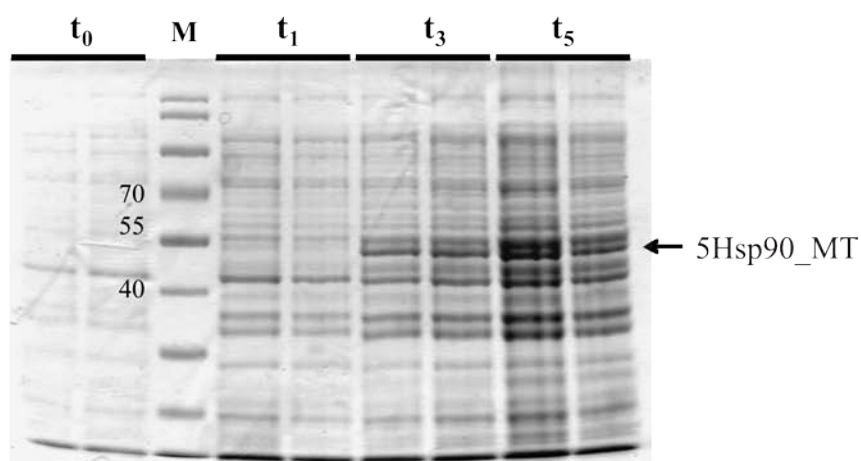
D

4. úsek Hsp90_MT



E

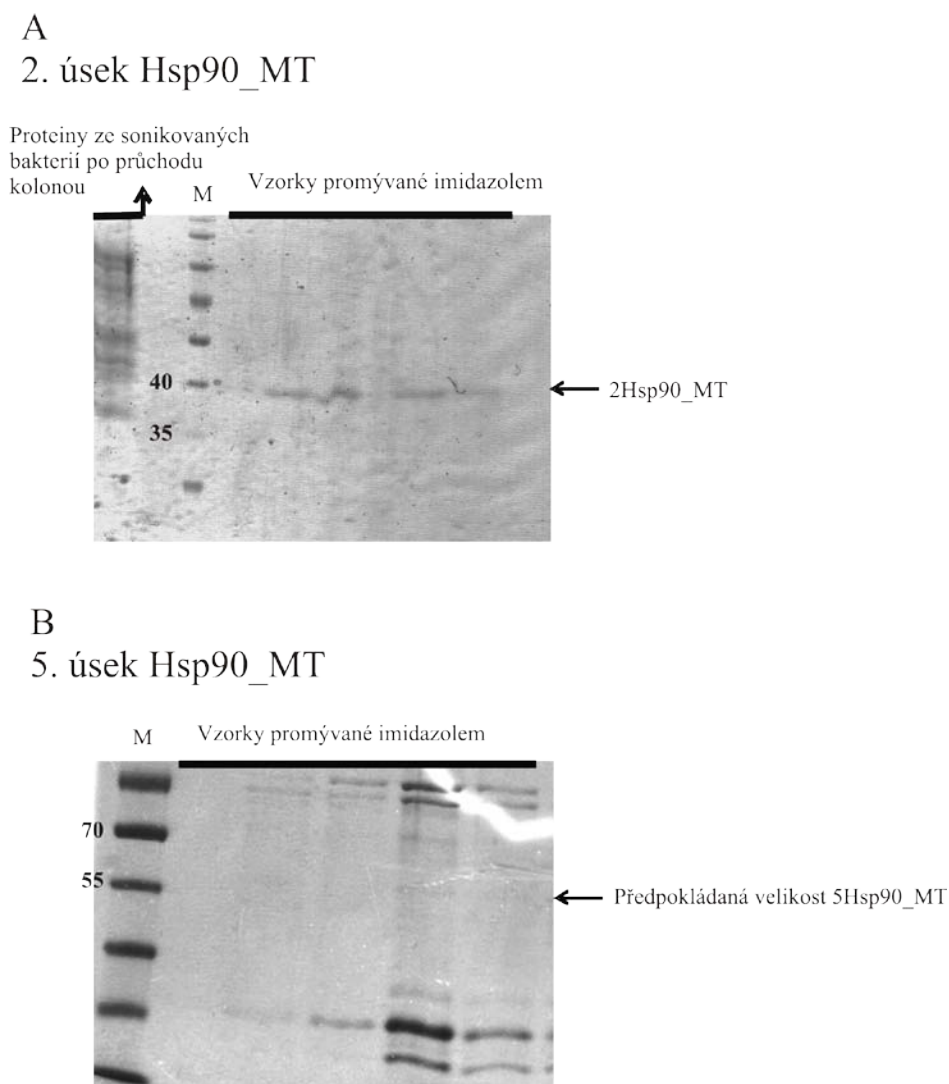
5. úsek Hsp90_MT



Obrázek 10: Kontrolní overexprese prvních pěti kandidátních úseků Hsp90_MT (A-E), exprimovaný úsek je vždy vyznačen šipkou. Testování bylo detekováno na SDS-PAGE v časech t₀ (počátek indukce), t₁ (jedna hodina po indukci), t₃ (tři hodiny po indukci) a t₅ (pět hodin po indukci), jako marker byl použit GeneRuler Prestained (Fermentas). A – Kontrolní overexprese 1. úseku Hsp90_MT, bakterie exprimují daný úsek již jednu hodinu po indukci. B - Kontrolní overexprese 2. úseku Hsp90_MT, největší míra exprese je v době mezi třemi až čtyřmi hodinami po indukci. C - Kontrolní overexprese 3. úseku Hsp90_MT, dostatečná exprese je detekovatelná již jednu hodinu po indukci. D - Kontrolní overexprese 4. úseku Hsp90_MT, daný úsek je nejvíce exprimován pět hodin po indukci. E - Kontrolní overexprese 5. úseku Hsp90_MT, exprese je v tomto případě slabá, nicméně největší míry dosahuje pět hodin po indukci.

4.4.2. Purifikace rekombinantních proteinů přes agarózovou kolonu

Purifikace proteinů z bakterií probíhala na základě vazby histidinové kotvy na Ni^{2+} ionty imobilizované na agaróze. Zpočátku jsem pro purifikace využívala kolonu s Ni^{2+} -agarózou již zavedenou na pracovišti. Protein jsem vymývala pomocí roztoku o 250mM koncentraci imidazolu. Výsledky však nebyly přesvědčivé, koncentrace proteinu byla velice nízká a produkt obsahoval znečišťující bakteriální proteiny nebo produkty degradace rekombinantního úseku (Obrázek 11).



Obrázek 11: Purifikace druhého (A) a pátého (B) kandidátního úseku Hsp90_MT přes Ni^{2+} -agarózovou kolonu. Proteiny jsem detekovala pomocí SDS-PAGE. Proteinové frakce jsem vymývala roztokem koncentrovaného (250mM) imidazolu. A – Purifikovaný druhý úsek Hsp90_MT, nečistoty se neobjevují, nicméně detekovaný rekombinantní protein je velice slabý. B – Purifikovaný pátý úsek Hsp90_MT, protein se v předpokládané velikosti vyskytoval pouze velice slabě, naopak byly detekovány znečišťující proteiny.

4.4.3. Purifikace proteinů přes kolonu His -Trap FF

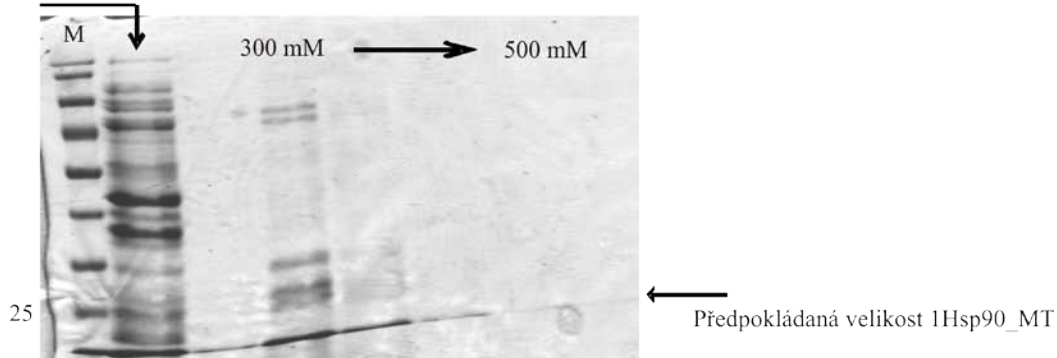
Vzhledem ke špatným výsledkům purifikace s pomocí velké Ni²⁺ agarózové kolony, kde je třeba pracovat s velkými objemy bakteriálních suspenzí, byly nakoupeny komerčně dostupné kolonky His-trap FF crude kit umožňující práci s menšími objemy za vyššího výtěžku a purifikace probíhala s jejich využitím. Purifikace úseků 1-3 však nepřinesly očekávaný výsledek, množství proteinu na SDS gelech bylo opět velice nízké a objevovaly se znečišťující proteiny (Obrázek 12).

A

1. úsek Hsp90_MT

Proteiny ze sonikovních bakterií po průchodu kolonou

Stoupající koncentrace imidazolu v promývacím pufru

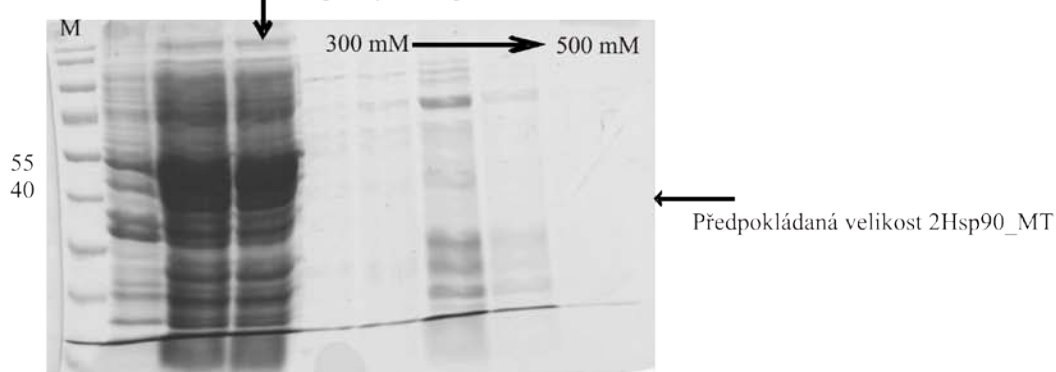


B

2. úsek Hsp90_MT

Proteiny ze sonikovních bakterií po průchodu kolonou

Stoupající koncentrace imidazolu v promývacím pufru

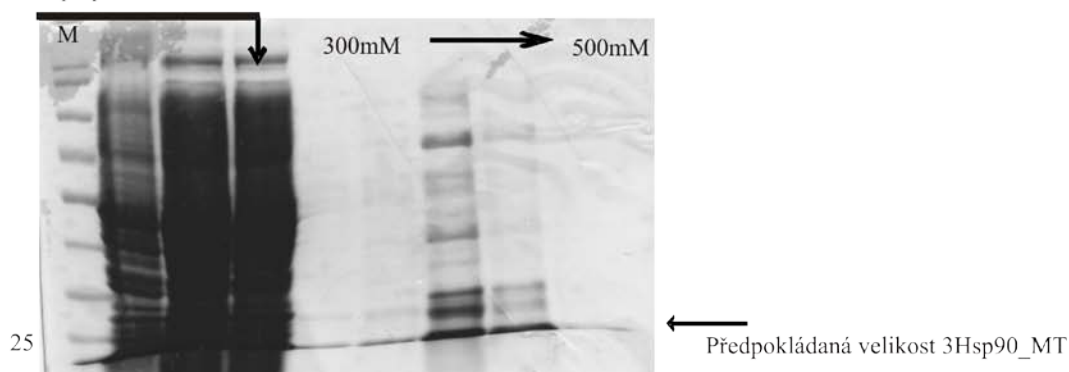


C

3. úsek Hsp90_MT

Proteiny ze sonikovních bakterií po průchodu kolonou

Stoupající koncentrace imidazolu v promývacím pufru



Obrázek 12: Purifikovaný úsek 1-3 Hsp90_MT (A-C) přes kolony His-Trap FF. U všech purifikací se objevují znečišťující proteiny. A – Purifikace 1. úseku Hsp90_MT, daný úsek se na SDS gelu neobjevuje. B - Purifikace 2. úseku Hsp90_MT s velice nízkou a pro další reakce nepoužitelnou koncentrací získaného proteinu. C - Purifikace 3. úseku Hsp90_MT, koncentrace daného úseku je opět velice nízká.

Tyto neuspokojivé výsledky vedly k domněnce, že v průběhu přípravy bakterií pro purifikaci proteinů dochází k chybě, která způsobuje ztrátu proteinu. Postup jsem proto modifikovala a bakteriální pelety jsem nezamrazovala, ale ihned jsem s nimi co nejrychleji pracovala dál. Tento postup se opravdu ukázal jako vhodný a purifikace proteinů byla až na izolaci 5. úseku Hsp90_MT úspěšná (Obrázek 13).

Vzhledem k znečišťujícím proteinům, které se u vzorků stále objevovaly, jsem k následujícím purifikacím použila promývání postupnější řadou eluačních roztoků se zvyšující se koncentrací imidazolu. Kolonu s navázaným proteinem jsem tedy nepromývala pouze roztokem se 40 mM a 300 mM imidazolem, ale také se 100 mM a 200 mM imidazolem. Jak je však patrné z výsledků purifikace druhého úseku, vazba proteinu s His kotvou je zřejmě slabá, protože protein se vymýval již v roztoku se 100 mM imidazolem, nicméně právě v této frakci se vyskytovalo také nejvíce nečistot. Nižší koncentraci proteinu jsem získala u prvního a čtvrtého úseku Hsp90_MT. Hodnoty koncentrací jednotlivých úseků Hsp90_MT jsou uvedeny v tabulce 8 (Tabulka 8).

Úsek Hsp90_MT	Koncentrace (µg/µl)
1	0,18
2	4,13
3	4,23
4	2,07

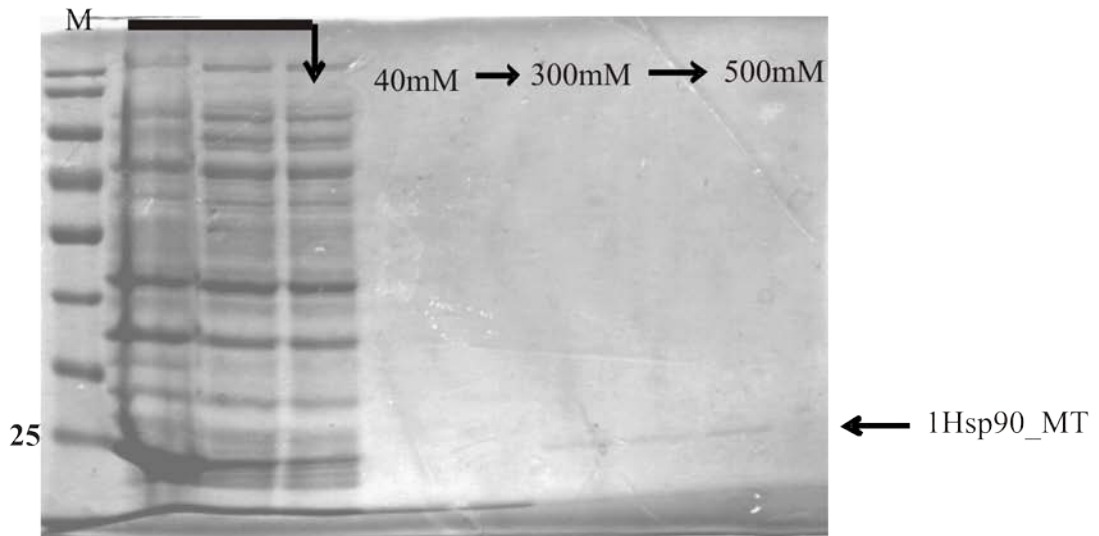
Tabulka 8: Naměřené koncentrace úseků 1-4 Hsp90_MT

A

1. úsek Hsp90_MT

Proteiny ze sonikovních
bakterií po průchodu kolonou

Stoupající koncentrace imidazolu
v promývacím pufru

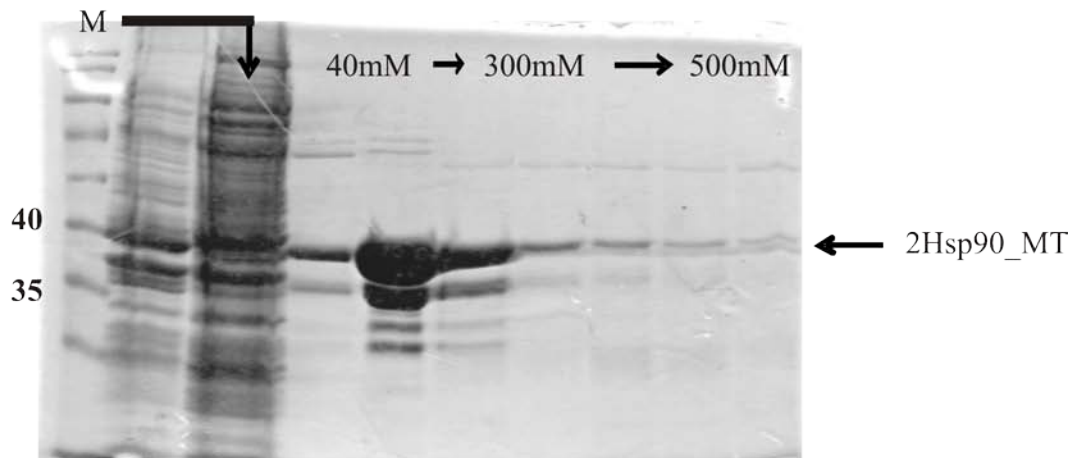


B

2. úsek Hsp90_MT

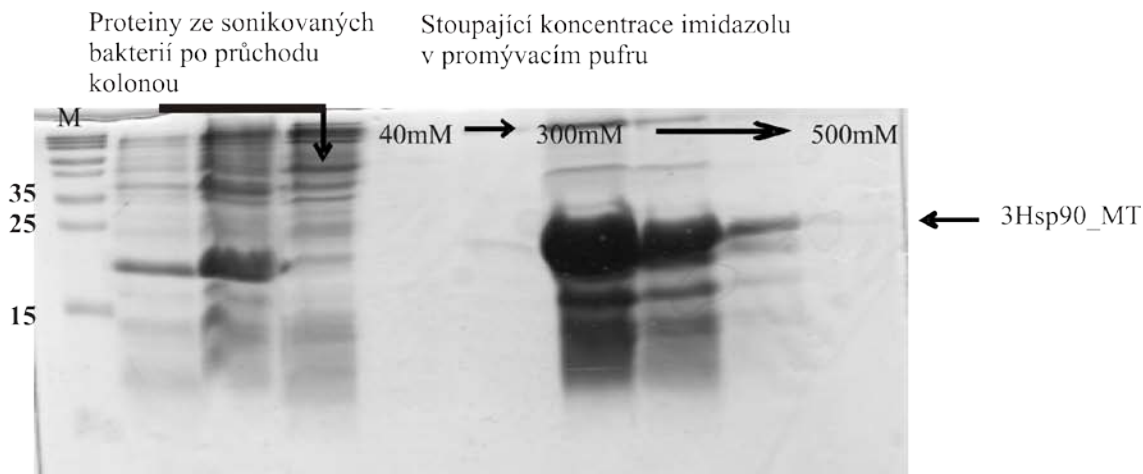
Proteiny ze sonikovních
bakterií po průchodu kolonou

Stoupající koncentrace imidazolu
v promývacím pufru



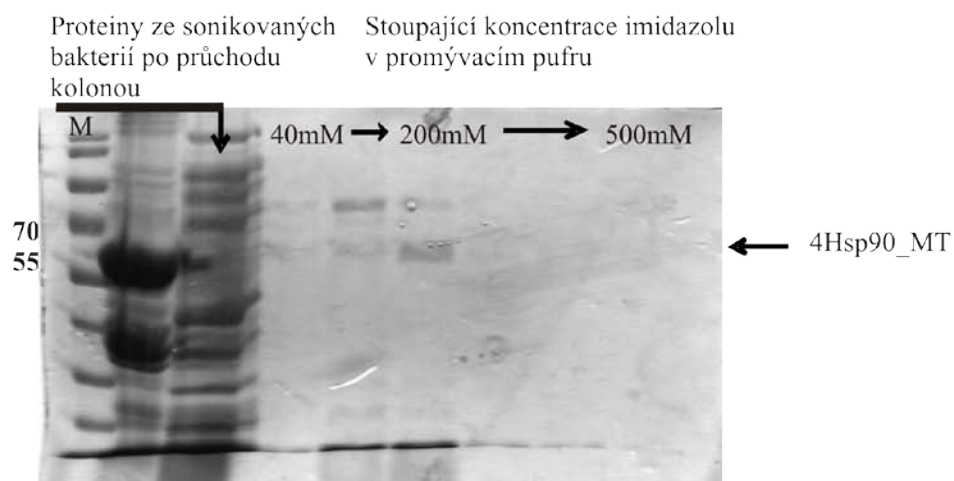
C

3. úsek Hsp90_MT



D

4. úsek Hsp90_MT



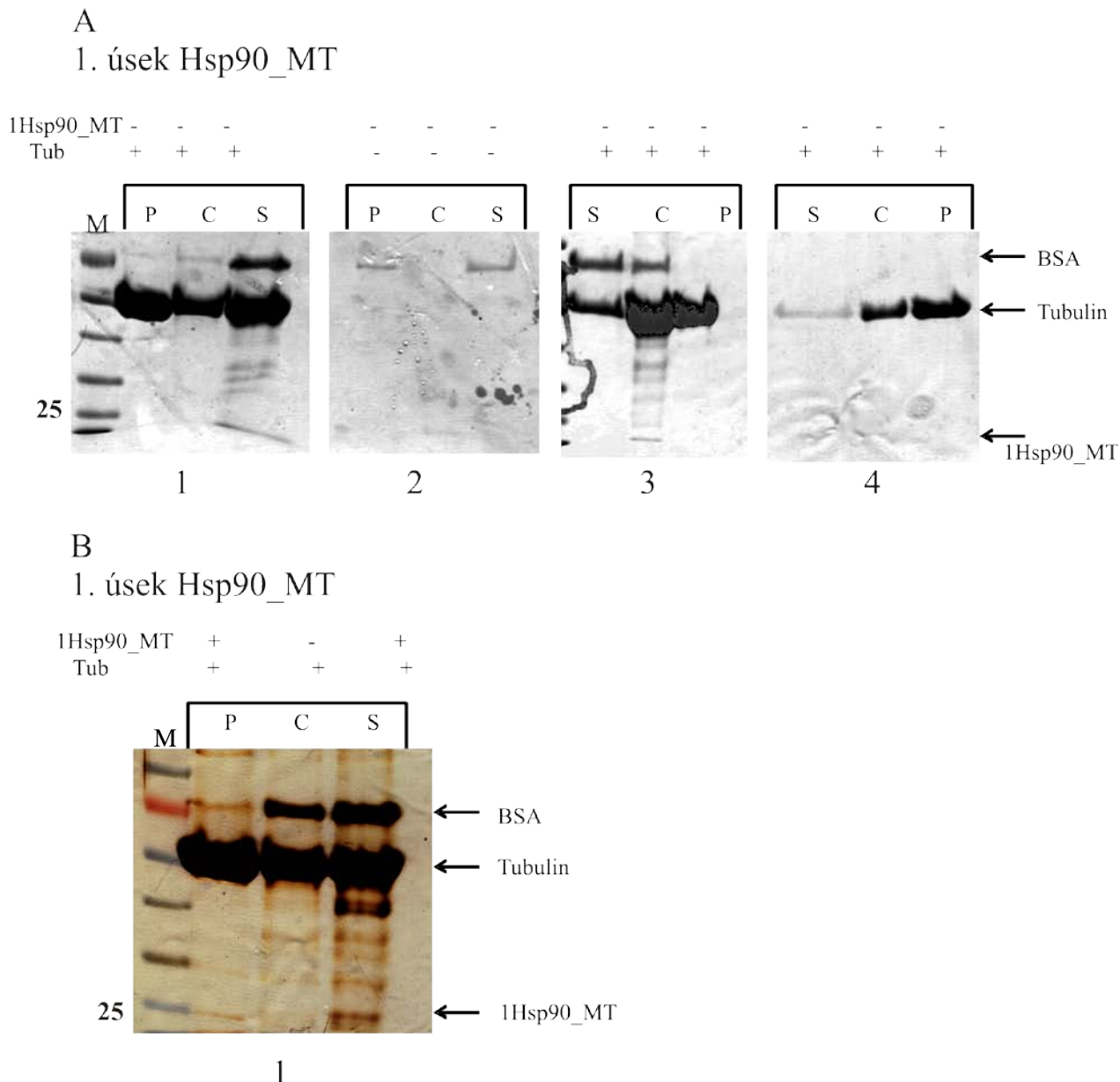
Obrázek 13: Purifikovaný protein 1. až 4. úseku Hsp90_MT (A-D) detekovaný na SDS gelu. A – Purifikovaný 1. úsek Hsp90_MT je na SDS gelu detekován velice slabě, nicméně je čistý a pro následující kosedimentační reakce použitelný. B – Purifikovaný 2. úsek Hsp90_MT je dostatečně koncentrovaný pro další použití, a to konkrétně vzorek z frakce vymývané roztokem se 100 mM imidazolem, nevýhodou této frakce je přítomnost znečišťujících proteinů. C – Purifikovaný 3. úsek Hsp90_MT obsahuje stejně jako úsek předcházející znečišťující proteiny, nicméně jeho výtěžnost je vysoká. D – Purifikovaný 4. úsek Hsp90_MT je detekován v menším množství, nicméně jsem ho použila pro následující pokusy.

4.5. Kosedimentace úseků Hsp90_MT s MT

Izolované proteiny jednotlivých kandidátních úseků Hsp90_MT jsem inkubovala s polymerovaným tubulinem, jako kontrola byl použit BSA, který se na MT neváže, a tudíž by se neměl vyskytovat v peletu. Po inkubaci úseků s MT a následné ultracentrifugaci přes sacharózový polštář jsem jednotlivé proteiny detekovala pomocí SDS PAGE.

Barvení SDS gelu obsahujícího proteiny z testu kosedimentace 1. úseku Hsp90_MT probíhalo nejprve za pomoci barvy Coomassie brilliant blue, nicméně vzhledem ke slabé detekci proteinu na SDS gelu (Obrázek 13A) jsem variantu 1 (protein+tubulin+BSA) obarvila také stříbrem (Obrázek 13B). Z SDS gelu barveného stříbrem je patrné, že 1. úsek Hsp90_MT je přítomen v peletu spolu s polymerem. Větší množství daného úseku však zůstává ve variantě 1 v supernatantu. Z obrázku SDS gelu barveného Coomassie brilliant blue není dobře vidět, jestli se první úsek Hsp90_MT vyskytuje v peletu také ve variantě bez přidaného tubulinu, slabě detekovatelný je tento úsek snad pouze v polštáři (varianta 2, obrázek 13A).

Výsledky naznačují, že množství prvního úseku Hsp90_MT kosedimentovaného s polymerovaným tubulinem je zřejmě vyšší, než množství samovolně sedimentujícího proteinu do peletu ve variantě bez přidaného tubulinu. Můžeme uzavřít, že první úsek Hsp90_MT by se mohl podílet na MT-vazebné aktivitě proteinu Hsp90_MT, nicméně pro jednoznačný závěr chybí spolehlivá kontrola agregace a následné sedimentace úseku 1 do peletu bez přítomnosti tubulinu. Navíc kontrolní BSA sedimentuje oproti všem předpokladům taktéž do peletu jak u varianty s tubulinem, tak u varianty bez tubulinu. Výsledky testu kosedimentace 1. úseku je možné považovat za orientační, pro učinění jednoznačného závěru však budou nutné ještě další experimenty.

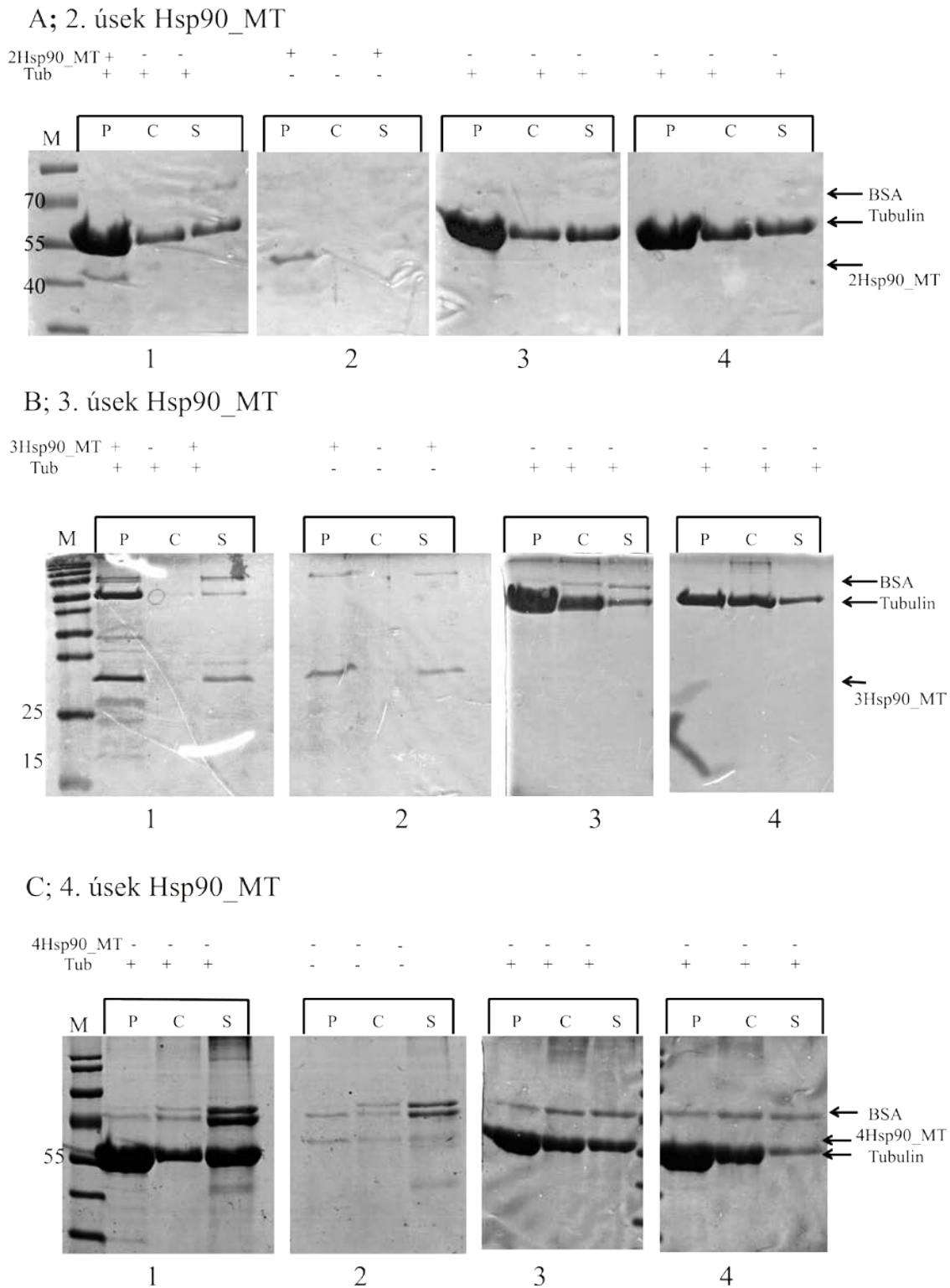


Obrázek 13: Kosedimentační reakce 1. úseku Hsp90_MT (A-B). Purifikovaný 1. úsek Hsp90_MT byl inkubovaný s MT stabilizovanými taxolem a jako negativní kontrola byl přidán BSA. Jednotlivé frakce byly centrifugovány přes sacharózový polštář. Supernatant (S), polštář (C) a pelet (P) byly následně detekovány pomocí SDS-PAGE. Varianta 1 – tubulin+protein+BSA, varianta 2 – protein+BSA, varianta 3 – tubulin+BSA, varianta 4 – tubulin. A – Kosedimentace 1. úseku Hsp90_MT, barvení pomocí Coomassie brilliant blue. Slabě detekovatelný pruh obsahující 1. úsek Hsp90_MT se vyskytuje v polštáři u varianty bez tubulinu. B - Kosedimentace 1. úseku Hsp90_MT, barvení pomocí stříbra. V přítomnosti tubulinu zůstává daný úsek převážně v supernatantu, menší množství se vyskytuje také v peletu. Množství prvního úseku Hsp90_MT je ve variantě s tubulinem vyšší než ve variantě bez tubulinu, mohli bychom tedy předpokládat zodpovědnost tohoto úseku za MT-vazebnou aktivitu proteinu Hsp90_MT. Do peletu se u variant 1 a 2 v menším množství váže také BSA.

Rozdělené proteiny z kosedimentačních analýz úseků 2-4 Hsp90_MT (Obrázek 14) jsem barvila pomocí Coomassie brilliant blue. Výsledky u 2. úseku Hsp90_MT ukazují přítomnost daného úseku v peletu u varianty 1 s přidaným tubulinem, nicméně zhruba stejné množství proteinu se vyskytuje také v peletu ve variantě 2 bez tubulinu. Tento výsledek svědčí o sedimentaci proteinu do peletu, a proto nelze z kosedimentační reakce určit, zda je druhý úsek Hsp90_MT zodpovědný za MT-vazebnou aktivitu proteinu Hsp90_MT. BSA se ve variantách 1-3 vyskytuje pouze v supernatantu a do peletu nesedimentuje.

Třetí úsek Hsp90_MT se stejně jako dva předcházející vyskytuje v peletu u varianty 1 s přidaným tubulinem, ale opět je také detekovatelný ve variantě 2 bez tubulinu. Lze však na rozdíl od výsledků druhého úseku Hsp90_MT pozorovat, že množství třetího úseku Hsp90_MT v peletu u varianty s tubulinem je větší, než v peletu u varianty bez přidaného tubulinu. Toto nasvědčuje o možné zodpovědnosti třetího úseku za vazbu Hsp90_MT k MT. Z SDS gelů se ovšem zdá, že BSA u variant 1-3 sedimentuje do peletu.

V případě 4. úseku Hsp90_MT jsem zjistila chybu vzniklou již na počátku své práce, při navrhování jednotlivých úseků. Velikost čtvrtého úseku Hsp90_MT (57 kDa) se totiž téměř shoduje s velikostí tubulinu (55 kDa), na SDS gelu proto nelze přesvědčivě detekovat, zda se protein v supernatantu či v peletu ve variantě s tubulinem vyskytuje, i když varianta bez tubulinu daný úsek obsahuje a jeho lokalizace a velikost je mírně větší než umístění tubulinu. Je možné diskutovat o tom, že úsek se vyskytuje ve slabém proužku v peletu u varianty s tubulinem (Obrázek 14C, varianta 1, dále také Obrázek 15). I přes to, pokud bychom tento proužek považovali za daný úsek, však nelze určit, zda je zodpovědný za MT-vazebnou aktivitu Hsp90_MT, a to vzhledem k jeho sedimentaci do peletu také v nepřítomnosti tubulinu (Obrázek 14C, varianta 2). Stejně jako u třetího úseku Hsp90_MT do peletu sedimentoval kontrolní BSA, v tomto případě však v ještě větší míře.



Obrázek 14: Kosedimentační reakce 2. až 4. úseku Hsp90_MT (A-C). Purifikovaný rekombinantní 2., 3. a 4. úsek Hsp90_MT byl inkubovaný s MT stabilizovanými taxolem a jako negativní kontrola byl přidán BSA. Jednotlivé frakce byly centrifugovány přes sacharózový polštář. Supernatant (S), polštář (C) a pelet (P) byly následně detekovány pomocí SDS-PAGE. Varianta 1 – tubulin+protein+BSA, varianta 2 – protein+BSA, varianta 3 – tubulin+BSA, varianta 4 – tubulin; A – Kosedimentace 2. úseku Hsp90_MT, výsledky ukazují na přítomnost proteinu v peletu jak u varianty s tubulinem (1P), tak ve variantě bez tubulinu (2P), nelze proto

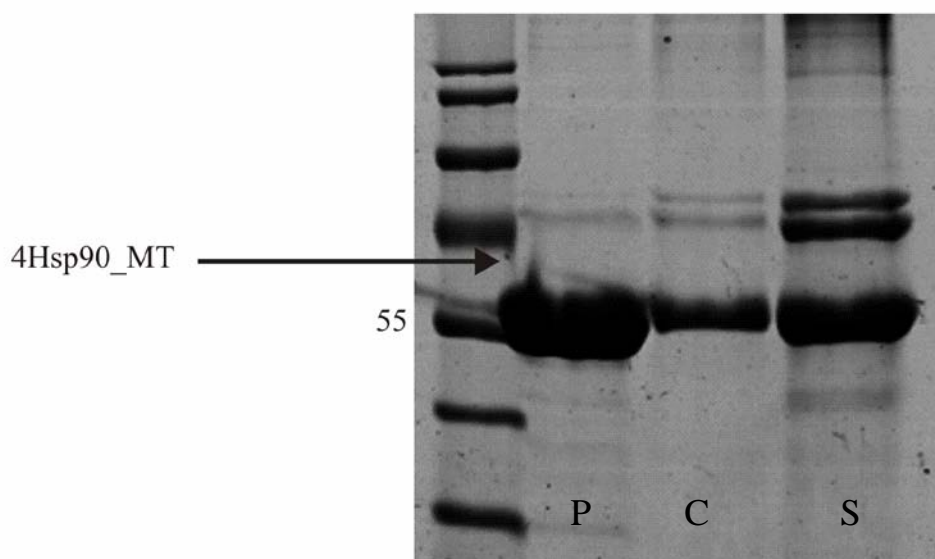
určit zodpovědnost tohoto úseku za vazbu Hsp90_MT k MT. BSA zůstává vždy v supernatantu; B – kosedimentace 3. úseku Hsp90_MT, protein se vyskytuje v supernatantu i peletu u variant s i bez tubulinu (1P,S; 2P,S), nicméně jeho množství v peletu u varianty 1 se zdá být vyšší než u varianty 2 a můžeme se proto domnívat, že daný úsek by se mohl podílet na MT-vazebné aktivitě Hsp90_MT, BSA se zřejmě váže také do peletu. C – Kosedimentace 4. úseku Hsp90_MT, protein se vyskytuje v peletu (2P) i supernatantu (2S) ve variantě bez tubulinu, slabý proužek nad tubulinem ve variantě 1 (1P) dává možnost k diskuzi, zda se jedná o daný úsek vyskytující se v peletu spolu s tubulinem, BSA se u variant 1-3slabě váže také do peletu.

4.6. Analýza denzity úseků Hsp90_MT z kosedimentačních reakcí na SDS gelech

Analýza denzity jednotlivých úseků Hsp90_MT vizualizovaných na SDS gelech z kosedimentací mi pomohla určit míru vazby jednotlivých úseků Hsp90_MT na MT, tedy množství daného úseku v peletu za přítomnosti tubulinu oproti jeho množství v peletu za nepřítomnosti tubulinu.

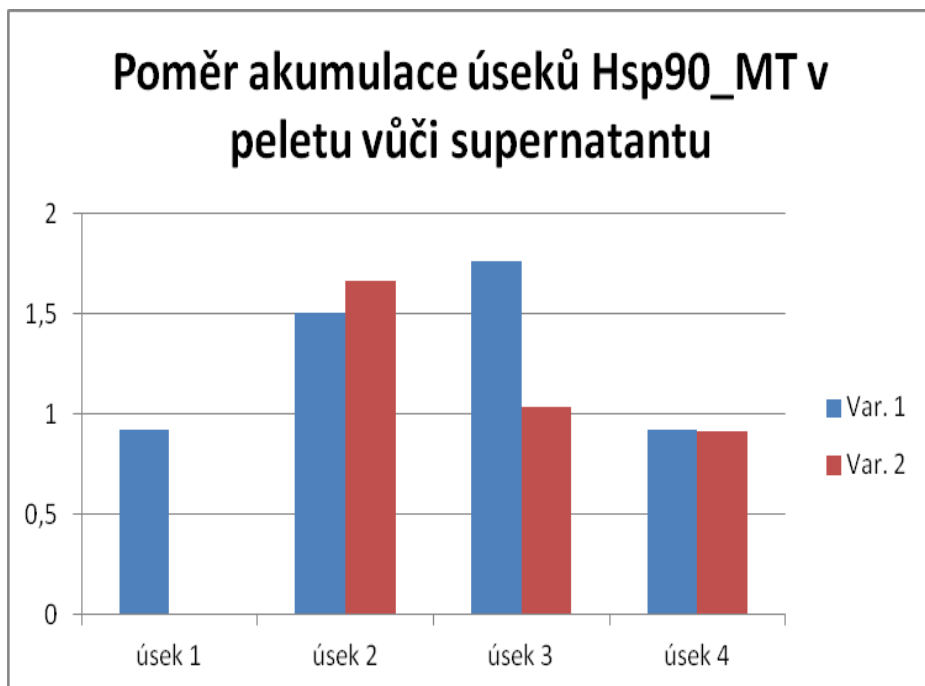
Pro analýzu jsem využívala SDS gely s kosedimentačními reakcemi, které jsou vyfocené v rámci výsledků kapitoly 4.5.(str.50). Vzhledem k absenci SDS gelu s variantou bez tubulinu u kosedimentačních reakcí prvního úseku Hsp90_MT (protein+BSA) jsem nemohla tento úsek porovnat. U čtvrtého úseku Hsp90_MT jsem za protein vázaný k MT považovala slabý pruh vyskytující se těsně nad tubulinem, jak jsem již uvedla výše. Pro lepší představu jsem se pokusila daný SDS gel zvětšit a zvýraznit možnou polohu 4. úseku Hsp90_MT (Obrázek 15).

4. úsek Hsp90_MT využíváný pro analýzu denzit



Obrázek 15: Detail SDS gelu kosedimentační reakce 4. úseku Hsp90_MT. P – pelet, C – polštář, S – supernatant. 4. úsek Hsp90_MT se zřejmě slabě vyskytuje v peletu spolu s MT. Daný proužek na SDS gelu byl využit pro analýzy denzit.

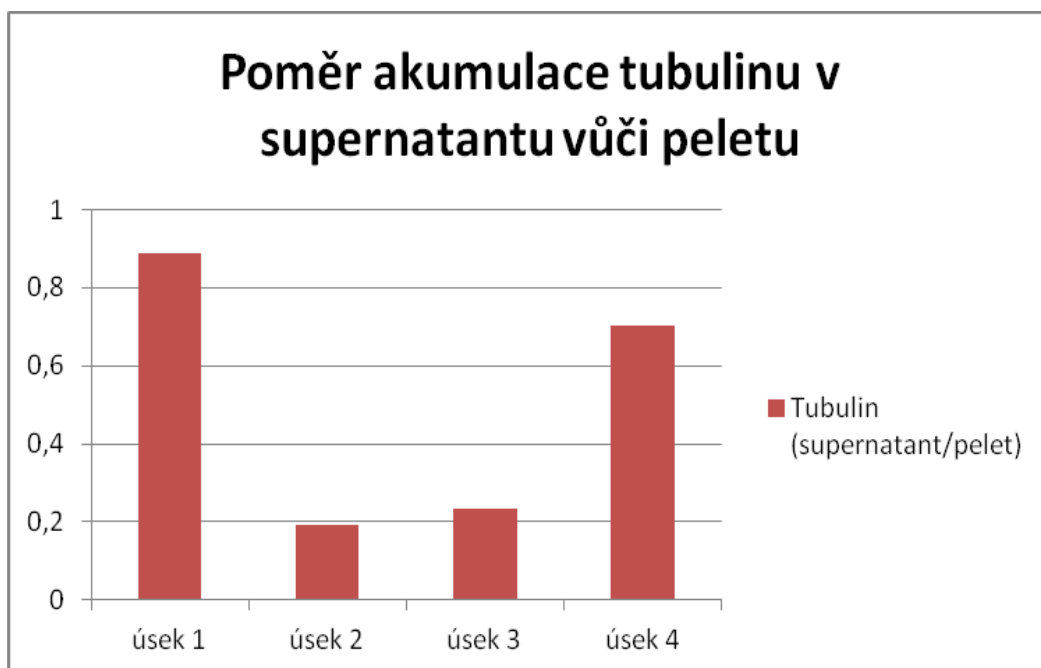
Porovnávala jsem poměr množství jednotlivých úseků Hsp90_MT v peletu vůči supernatantu v přítomnosti polymerovaného tubulinu, tedy množství rekombinantního proteinu navázaného na MT, s poměrem jeho množství v peletu vůči supernatantu za nepřítomnosti tubulinu (Graf 1). Jak jsem již zmiňovala dříve, první úsek Hsp90_MT jsem nemohla vzhledem k absenci SDS gelu s variantou 2 zhodnotit a výsledky lze vyvodit pouze na základě optického hlediska. Z výsledků u druhého úseku Hsp90_MT vyplývá, že jak ve variantě 1 s tubulinem, tak ve variantě 2 bez tubulinu se vyskytuje v peletu téměř stejné množství proteinu, nepatrně více je ho v peletu dokonce ve 2. variantě. Nelze tedy říci, že se úsek 2Hsp90_MT váže na MT. Opačná situace je však v případě třetího úseku Hsp90_MT, kde se viditelně větší množství proteinu vyskytuje v peletu než v supernatantu za přítomnosti tubulinu. Tento výsledek prokazuje schopnost vazby třetího úseku Hsp90_MT k MT. Měření v případě čtvrtého úseku Hsp90_MT ukázalo shodné množství proteinu v peletu jak ve variantě s tubulinem, tak bez tubulinu, pokud připustíme, že slabý pruh v peletu u první varianty z kosedimentační reakce je daný úsek. O tomto problému jsem se zmiňovala již výše. Tento výsledek tak stejně jako v případě druhého úseku Hsp90_MT vyvrací jeho MT-vazebnou aktivitu.



Graf 1: Poměr akumulace úseků Hsp90_MT v peletu vůči supernatantu. První úsek Hsp90_MT nemohl být vzhledem k absenci SDS gelu s danou variantou porovnán. Poměr množství druhého úseku Hsp90_MT v peletu vůči supernatantu ve variantě 2 bez tubulinu je nepatrně vyšší než u varianty s tubulinem. Druhý úsek se tedy zřejmě neváže na MT. Třetí úsek Hsp90_MT vykazuje znatelně vyšší poměr proteinu vázaného v peletu vůči supernatantu u varianty s přidáním tubulinem, má tedy zřejmě schopnost vázat MT. Čtvrtý úsek Hsp90_MT pak má srovnatelný poměr proteinu v peletu vůči supernatantu u obou variant a tento úsek zřejmě také není zodpovědný za MT-vazebnou aktivitu Hsp90_MT.

Z SDS gelů je patrné, že tubulin inkubovaný s jednotlivými úseky nebyl vždy plně zpolymerován. Vzhledem k tomu, že protein Hsp90_MT má schopnost vazby jak na MT, tak na dimerní tubulin (Krtková et al., 2012), mohly přítomné volné dimery tubulinu částečně vázat i určité množství testovaného úseku, bránit tak jeho vazbě na polymerovaný tubulin a měnit poměr úseku detekovaného v peletu a v supernatantu za přítomnosti tubulinu. Proto jsem porovnála množství tubulinu v supernatantech a v peletech (pouze ve variantách 1) u všech analyzovaných úseků Hsp90_MT (Graf 2). Z výsledků je patrné, že v testu vazby prvního a čtvrtého úseku Hsp90_MT k MT bylo množství zpolymerovaného tubulinu jen o něco vyšší než poloviční (poměr dimerního tubulinu v supernatantu vůči zpolymerovanému tubulinu v peletu je cca 0,9; respektive 0,7) a dimery tubulinu s potenciálně navázaným úsekem mohou tedy poměrně dost zkreslovat množství rekombinantního prvního či čtvrtého úseku Hsp90_MT navázaného na MT. Naopak u druhého a třetího úseku Hsp90_MT je znatelně menší množství

tubulinu přítomno v supernatantu v dimerní formě a výsledky kosedimentační analýzy můžeme považovat za relevantní.



Graf 2: Poměr akumulace tubulinu v supernatantu vůči peletu. Poměr dimerního tubulinu v supernatantu vůči zpolymerovanému tubulinu v peletu je u prvního a čtvrtého úseku Hsp90_MT cca 0,9 a 0,7, množství zpolymerovaného tubulinu je tedy v těchto dvou případech pouze nepatrně vyšší než poloviční. V případě druhého a třetího úseku Hsp90_MT je v supernatantu přítomno znatelně menší množství dimerního tubulinu, což zvyšuje relevantnost analýz u těchto dvou úseků.

4.7. Určení MT-vazebné domény Hsp90_MT

Testy kosedimentace a měření denzity proteinů z SDS gelů jednotlivých kandidátních úseků Hsp90_MT s polymerovaným tubulinem mi pomohly určit, který z úseků by mohl být zodpovědný za vazbu k MT.

Z grafů vytvořených na základě analýzy denzit vyplývá, že schopnost vazby k MT má třetí úsek Hsp90_MT, který se vyskytoval v prokazatelně největším poměrném množství v peletu vůči supernatantu u varianty s přidaným tubulinem. Hojně zastoupen byl v peletu také druhý úsek Hsp90_MT, nicméně jeho množství bylo srovnatelné jak u varianty s tubulinem, tak ve variantě bez tubulinu a vazba tohoto úseku k MT tudíž není prokázána. Totéž lze tvrdit o čtvrtém úseku, připustíme-li, že SDS gel se čtvrtým úsekem Hsp90_MT obsahuje také malé množství daného úseku v peletu. Z výsledků analýz denzit však také není moc zjevná vazba prvního úseku Hsp90_MT k MT.

Hodnocení schopnosti vazby je relevantní především u druhého a třetího úseku Hsp90_MT, protože u prvního a čtvrtého úseku se jednak vyskytovaly problémy popsané již dříve (nízká koncentrace, stejná velikost jako tubulin), jednak byly dané úseky inkubované s pouze částečně zpolymerovaným tubulinem. Úseky Hsp90_MT se tedy mohly vázat na volné dimery tubulinu místo na MT.

Kosedimentační reakce a analýzy denzit potvrdily vazbu pouze třetího úseku Hsp90_MT k MT, tedy úseku zahrnujícího KE-doménu. Tento výsledek je v souladu s hypotézou, kterou jsme si na počátku práce stanovili.

5. Diskuze

5.1. Výzkum v oblasti poznatků o Hsp90

Přítomnost Hsp90 v buňce je významná jak u živočichů, tak u rostlin. Zásadní je především schopnost Hsp90 napomáhat správné konformaci klientních proteinů, dále například traslovat buněčné signály, regulovat epigenetický stav uvnitř organismu či reagovat na stres (Boter *et al.*, 2007; Pearl *et al.*, 2008). Kromě těchto fyziologických funkcí působí Hsp90 díky své asociaci s tubulinem také na MT cytoskelet, který ovlivňuje na různých úrovních, popsanych především u živočišných buněk. Vzhledem k množství funkcí, které Hsp90 v souvislosti s MT zastává, se s velkou pravděpodobností v budoucnosti jistě setkáme s nově popsány aktivitami také u rostlinných forem Hsp90. Prvním náznakem je popsání tabákové cytozolické izoformy Hsp90 vážící se k MT a zřejmě napomáhající jejich polymeraci po chladovém stresu (Krtková *et al.*, 2012). Tato specifická izoforma byla vzhledem ke své schopnosti vazby na MT nazvána Hsp90_MT. V účasti Hsp90_MT v obnově MT po chladovém stresu můžeme vidět jistou souvislost s živočišným Hsp90, který je nezbytný pro správnou funkci centrozomu (Lange *et al.*, 2000), tedy MT nukleačního centra u živočichů. Zda se však Hsp90 váže také ke γ -tubulinu u rostlin, se dosud neví a tento zajímavý a pro rostlinnou biologii jistě přínosný fakt zbývá dořešit. Další souvislost se schopností Hsp90_MT účastnit se obnovy MT po chladovém stresu lze vidět u živočišného Hsp90, který dokáže chránit tubulin před denaturací vlivem tepelného stresu, přičemž tento proces je nezávislý na aktivitě ATP (Weis *et al.*, 2010).

Na těchto a mnoha dalších literaturou uváděných výsledcích vidíme, že Hsp90 zastává v buňce mnoho funkcí se širokým záběrem a že samotná schopnost asociace s MT by vzhledem k těmto vlastnostem mohla být regulována nejrůznějšími vnějšími vlivy a stavy buňky řídicími aktivitu tohoto chaperonu.

Cílem mé práce bylo určení molekulární podstaty interakce tabákové cytozolické formy Hsp90_MT s MT, tedy znalost, která může v budoucnu přispět k lepšímu poznání rostlinného Hsp90 a jeho vlivu na MT cytoskelet.

5.2. KE-doména jako kandidát pro vazbu Hsp90_MT k MT

Během své práce jsem vycházela z předpokladu, že doména, která by mohla být zodpovědná za vazbu Hsp90_MT k MT, je střední KE-bohatý úsek. Tento předpoklad

je založen hned na několika důvodech. V minulosti již byla vyslovena domněnka, že motivy se střídajícími se aminokyselinami K a E (KEKE motivy) či VEEKK jsou zodpovědné za protein-proteinové interakce či interakce s MT (Realini *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 2007).

Dalším důvodem je fakt, že tato KE-bohatá doména je nejvariabilnějším úsekem u různých cytozolických izoform Hsp90, kterých se vyskytuje u eukaryot značné množství (např. lidský genom obsahuje 17 genů kódujících různé izoformy Hsp90 (Chen *et al.*, 2005)), zatímco celkově je chaperon velmi konzervovaný (Krishna a Gloor, 2001). Pokud je proto u takto konzervovaného proteinu KE-bohatá doména variabilní, mohla by být zřejmě právě ona zodpovědná za rozličné funkce jednotlivých cytozolických izoform Hsp90, a tedy například i za schopnost vazby k MT.

Významným důvodem, proč lze předpokládat odpovědnost KE-bohaté domény za vazbu k MT, je vysoká sekvenční podobnost tohoto motivu s již prokázanými MT-vazebnými motivy u jiných MAP, konkrétně například u živočišného proteinu MAP1B obsahujícího nepravidelně se opakující motivy KKEE a KKEVI (Noble *et al.*, 1989). Stejně tak kvasinkový (*Kluyveromyces lactis*) protein Cbf5 zahrnuje na svém C-terminálním konci opakující se motiv KKE/D zodpovědný za vazbu k MT (Winkler *et al.*, 1998). U rostlin byl tento motiv objeven u pylově specifického SB401 (Huang *et al.*, 2007), ale také například u AtMAP18 (Wang *et al.*, 2007), který s cytozolickou formou NtHsp90_MT sdílí v tomto úseku 40% identitu (Krtková *et al.*, 2012).

Při navrhování kandidátních úseků Hsp90_MT jsem vytvořila také jeden samostatný úsek obsahující ATP-vazebnou doménu. Vzhledem k tomu, že testy kosedimentace u cytozolické izoformy Hsp90_MT v dřívější studii neprokázaly ovlivnění vazby proteinu k MT v závislosti na přídatku ATP ani geldanamycinu do reakce (Krtková *et al.*, 2012), jsem předpokládala, že tento úsek s ATP-vazebnou doménou by se neměl k tubulinu vázat. Na druhou stranu bychom však měli brát v úvahu, že bylo prokázáno, že jedna z izoform živočišného Hsp90 je schopná nahrazovat ATP za GTP během své autofosforylace (Csermely a Kahn, 1991), a že v přítomnosti Ca^{2+} v živočišné buňce je aktivita ATPázy vážící se do ATP-vazebného místa až třikrát účinnější v případě vazby GTP (Nardai *et al.*, 1996). Samotná vazba ATP k Hsp90 je navíc slabá, u živočišných izoform Hsp90 se uvádí, že její vazebná konstanta se rovná zhruba 250 μM (Prodromou *et al.*, 1997). Tyto výsledky naznačují, že Hsp90 a jeho vazebné schopnosti mohou být regulovány také za pomoci GTP, které se mimo jiné nacházejí na MT. Tyto GTP by tak mohly zajišťovat buď přímou asociaci Hsp90 s MT, či nepřímou asociaci, například

prostřednictvím změny konformačního stavu proteinu. Dále lze spekulovat o tom, že na plus koncích MT se vyskytuje ochranná „čepička“ tvořená GTP, která tento konec stabilizuje (Mitchison a Kirschner, 1984). Jak vyplývá ze studie autorů Krtková *et al.* (2012), Hsp90_MT se váže výrazněji na MT vystavené chladovému stresu. Můžeme předpokládat, že v takto zasažené buňce je třeba rychle reagovat na daný stres prostřednictvím spuštění různých signálních drah či tvorbou proteinových komplexů, například také s pomocí různých chaperonů, včetně Hsp90 (Wang *et al.*, 2004). Proč by tedy nemohla být rychlá asociace Hsp90_MT s MT a následný signalizační přenos zajištěn vazbou GTP z β tubulinové podjednotky plus konce MT do ATP-vazebného místa Hsp90?

Ve svých pokusech jsem však nechtěla zanedbat ani tu možnost, že by za vazbou Hsp90_MT k MT stál C-terminální konec obsahující pro cytozolické formy Hsp90 charakteristický motiv MEEVD. C-koncový úsek Hsp90 je zodpovědný za asociaci proteinu s mnoha různými kochaperony. Vzhledem k tomu, že nelze nalézt jeden kochaperon či jednu skupinu kochaperonů, která by se vyskytovala v asociaci s Hsp90 shodně ve všech organizmech a druzích (Johnson a Brown, 2009), lze poukázat na velkou variabilitu proteinů vážících se k tomuto konci a tedy i možnost, že daný konec je schopný vázat tubulin.

Během experimentů jsem musela také počítat s možností, že kosedimentační reakce neprokáží vazbu u jednotlivých kandidátních úseků Hsp90_MT k tubulinu ani v jednom případě. Pokud by tato varianta nastala, mohlo by se buď jednat o chybu v postupu práce, s větší pravděpodobností by však šlo o možnost, že za samotnou vazbu je zodpovědné větší množství domén, které spolu během asociace proteinu s MT spolupracují a jejichž odstranění vede k neschopnosti Hsp90 vázat se k MT. K podobnému závěru došli například autoři Johnson *et al.* (2000), kteří se s pomocí fúzních proteinů obsahujících různé domény Hsp90 snažili zjistit, která z nich je zodpovědná za schopnost živočišného Hsp90 sbalovat klientní proteiny, konkrétně luciferázu a citrát syntázu. Výsledky jejich studie ukázaly, že k této aktivitě je nutná spolupráce více domén uvnitř proteinu a tedy práce celé molukuly Hsp90.

5.3. Navržení kandidátních úseků Hsp90_MT pro vazbu na MT a tvorba overexpresních vektorů

Počátečním úkolem mé práce bylo navržení a tvorba kandidátních úseků molekuly Hsp90_MT, které by mohly být zodpovědné za vazbu k MT. Při navrhování

jednotlivých úseků jsem dbala především na vztah každého úseku ke KE-bohaté oblasti vyskytující se uvnitř molekuly Hsp90_{MT}, protože jak jsem již zmínila, právě tato oblast by dle našeho předpokladu mohla stát za vazbou Hsp90_{MT} k MT. Vytvořila jsem proto šest možných kandidátů, z nichž tři obsahovaly KE-bohatou sekvenci a zbylé tři nikoliv.

Jako templát pro následující pokusy jsem použila celou sekvenci (full length) tabákové izoformy Hsp90_{MT}, jejíž schopnost přímé asociace s MT byla již prokázána (Krtková *et al.*, 2012). Pro všech šest kandidátních úseků jsem navrhla specifické primery ohraničené sekvencí rozeznávanou restrikcí enzymy. Tato restrikcí místa byla důležitá vzhledem k následným ligacím DNA do overexpresního vektoru pET28.

Klonování všech šesti úseků do vektoru pDrive bylo úspěšné, nicméně následné vnesení do overexpresního vektoru pET28 se i přes opakované pokusy a modifikace postupu nepodařilo u šestého úseku, tedy C-koncové části Hsp90_{MT}. Vzhledem k této skutečnosti jsem dále s tímto úsekem nepracovala. Jako jednu z hlavních příčin neúspěšné ligace tohoto úseku do vektoru pET28 vidím malou velikost samotného fragmentu (198 pb).

5.4. Purifikace proteinů, testy kosedimentace s analýzami denzit

Před samotnou purifikací proteinů z bakterií jsem u každého úseku dělala nejprve kontrolní OE, aby bylo patrné, zda je daný úsek po indukci pomocí IPTG správně exprimován. Všechny úseky byly úspěšně exprimované v bakteriích. Schopnost produkce proteinu overexpresními bakteriemi se lišila u každého z úseků, nejslabší byla v tomto ohledu u úseku pátého, u kterého musela být transformace a testovací OE několikrát opakována. Zřejmě to mohl být také důvod selhání pokusů o purifikaci daného proteinu.

Kosedimentační reakce proběhly se čtyřmi kandidátními úseky Hsp90_{MT}. Pro zopakování uvedu, že se jednalo o první úsek zahrnující ATP-vazebnou doménu, druhý úsek zahrnující jak tuto doménu, tak KE-bohatou doménu, třetí úsek sestávající pouze z KE-bohaté domény a čtvrtý úsek zahrnující začínající KE-doménou a pokračující k C-terminálnímu konci proteinu. U variant úseků dva až čtyři se vyskytoval daný úsek nejen v peletu spolu s tubulinem, ale také u kontroly, kam tubulin přidáván nebyl. Tato kontrola měla prokázat, že samotný protein bez přítomnosti tubulinu nesedimentuje a tudíž potvrdit, že protein se skutečně váže na MT specificky. To se však podařilo ukázat pouze u třetího úseku Hsp90_{MT}. Jednou z možností, proč se všechny úseky

nacházely v peletu i bez přítomnosti tubulinu, by mohl být sacharózový polštář, který mohl být více propustný, nicméně vzhledem k předchozím pokusům s celou molekulou Hsp90_MT provedeným v naší laboratoři je tato varianta méně pravděpodobná. Další možností může být vysoká srážlivost daného úseku proteinu, tato sraženina by se mohla po následných kosedimentacích a detekcích na SDS gelu jevit jako falešný pelet. Částečným řešením problému by v tomto případě byla zřejmě centrifugace samotného proteinu před inkubací s polymerovaným tubulinem v podmínkách, ve kterých bude probíhat kosedimentace. Přítomnost daného úseku v peletu bez přítomnosti tubulinu však může být dána i jeho agregací v průběhu inkubace s tubulinem či následujících kroků, proto je vždy nutné porovnávat množství proteinu v peletu za přítomnosti či absence tubulinu.

V případě všech provedených kosedimentačních reakcí zůstával v supernatantu u první varianty přítomný nezpolymerovaný tubulin. Jak vyplývá z výsledků experimentů prováděných s tabákovou izoformou Hsp90_MT, dokáže se tento protein vázat i na dimerní tubulin (Krtková *et al.*, 2012). Je proto možné, že tento nepolymerovaný tubulin částečně brání vazbě proteinu k polymerovaným MT a část ho tak zůstává v supernatantu. Na druhou stranu však neznáme preferenci Hsp90_MT k dimernímu či naopak polymerovanému tubulinu, a nemůžeme tedy kvantifikovat, jaké skutečné množství proteinu se v supernatantu k dimernímu tubulinu skutečně vázalo a o kolik by ho mohlo být proporcionálně méně v případě úplné polymerace tubulinu.

V rámci prvního, třetího a čtvrtého úseku se shodně vyskytoval kontrolní BSA také v peletu, kam se správně vázat neměl, a to jak u varianty s tubulinem, tak ve variantě bez tubulinu. Zde proto vyvstává otázka, zda by také za ideálních experimentálních podmínek, kdy by BSA zůstával v supernatantu, tyto úseky sedimentovaly spolu s MT do peletu nebo zda by zůstávaly nenavázané v supernatantu. U úseků, kde byl kontrolní BSA detekován také v peletu, je tedy nutné brát jejich sedimentaci do peletu částečně s rezervou. Pro přesnější zhodnocení bude proto potřebná optimalizace kosedimentační analýzy.

Analýzy denzit proteinů na SDS gelech ukázaly, že schopnost vazby k MT má zřejmě pouze třetí úsek Hsp90_MT sestávající pouze z KE-bohaté domény. Ostatní úseky se sice v peletu spolu s MT vyskytovaly také, ale v menší míře, a analýzy denzit u nich neprokázaly schopnost vazby k MT. To je zvláštní vzhledem k faktu, že jak druhý úsek Hsp90_MT, tak čtvrtý úsek Hsp90_MT obsahují také KE-bohatou doménu. Oba úseky ale kromě KE-domény obsahují i další část molekuly Hsp90_MT. Je možné, že zbylá část molekuly testovaného úseku ve vazbě na MT brání, a proto u druhého

a čtvrtého úseku nebyla vazba na MT prominentní. Na druhou stranu pro čtvrtý úsek Hsp90_MT je nutné při posuzování výsledků brát v potaz několik nepříznivých skutečností. Jednak pouze částečně zpolymerovaný tubulin v průběhu inkubace obou proteinů, jednak špatnou detekci kosedimentovaného úseku vzhledem k jeho pro dělení na jednorozměrné SDS PAGE nevhodné velikosti.

Moje výsledky i přes přítomnost všech úseků v peletu s tubulinem neprokázaly zodpovědnost za vazbu Hsp90_MT k MT u vícero z nich, ale vezmeme-li v potaz některé problémy, které se během práce vyskytovaly, mohly by dodatečné budoucí experimenty například prokázat vazbu k MT také u ostatních úseků, než pouze u třetího úseku Hsp90_MT. Tehdy bychom mohli začít předpokládat, že se Hsp90 váže k MT jako celá molekula, či že spolu jednotlivé domény při vazbě k MT spolupracují. Tento předpoklad by se shodoval například s výsledky autorů Smertenko *et al.* (2004). Tito autoři pracovali s MAP65-1 u *Arabidopsis thaliana* a snažili se určit konkrétní aminokyselinu, která je zodpovědná za vazbu tohoto MAP k MT. Již z dřívějších výsledků věděli, že MT vazebné místo se nachází poblíž C-konce a vazba je závislá na dvou alaninech (Ala420, Ala409) uvnitř dvou úseků, z nichž jeden je konzervovaný v rámci eukaryot a druhý naopak variabilní. Rozhodli se proto vytvořit dva úseky, každý obsahující jeden z alaninů a tento v úseku mutovat. Výsledky ukázaly, že oba úseky s mutovaným alaninem výrazně ztrácí schopnost vazby k MT a tedy že pro vazbu MAP65-1 k MT je zřejmě potřeba více kontaktních míst zajišťovaných zřejmě specifickou terciární strukturou proteinu. V případě potvrzení vazby více úseků k MT by se tedy dala předpokládat důležitost terciární struktury proteinu na jeho schopnost vázat MT.

Vzhledem k neznalosti krystalické struktury cytozolické izoformy Hsp90_MT nyní nemůžeme zavrhnout ani tu možnost, že se molekula váže k MT také na základě svého povrchového náboje či různých hydrofobních interakcí, či že tyto interakce výrazně napomáhají MT-vazebné aktivitě proteinu Hsp90_MT, jako bylo zjištěno u vazby EB1 k plus koncům MT (Hayashi a Ikura, 2003). K potvrzení této teorie by přispěly úspěšné purifikace a kosedimentace zbylých dvou úseků, které neobsahovaly KE-bohatou doménu, a prokazovaly by přesto vazbu k MT.

5.5. Doplnující experimenty

Mé výsledky a závěry by bylo vhodné doplnit dalšími experimenty, které by je vyvrátily či potvrdily. Pokud by bylo možné modifikovat samotný postup, pak

by bylo vhodné upravit především kosedimentační reakce. Jednalo by se jednak o centrifugaci samotného kandidátního úseku Hsp90_MT, která by předcházela kosedimentaci s tubulinem a zabránila by tak možnosti vzniku „falešného peletu“. Dále by bylo vhodné zajistit přítomnost pouze zpolymerovaného tubulinu v reakcích. Toho by šlo docílit přidáním jednoho centrifugačního kroku před samotnou inkubací proteinu s polymerovaným tubulinem, během něhož by zůstal dimerní tubulin v supernatantu, a pro inkubaci s proteinem by byl použit pouze polymerovaný tubulin ze sedimentu a my tak měli jistotu, že reakce probíhá pouze s MT. Tento postup byl úspěšně vyzkoušen autory Krtková *et al.* (2012) během testování, zda se izoforma Hsp90_MT váže k MT. Po přidání této centrifugace se opravdu zmenšilo množství nezpolymerovaného tubulinu v supernatantu a naopak zvětšilo množství vázaného Hsp90_MT v peletu.

Jako další doplňující experimenty lze například provést koimunoprecipitace rekombinantních úseků a tubulinu pomocí proteinu G za využití anti-His protilátky s následnými imunodetekcemi tubulinu pomocí protilátky proti tubulinu. Jinou možností, která by však byla časově náročnější, je například tvorba tabákových linií stabilně exprimujících fúzní GFP konstrukty jednotlivých úseků a následně *in vivo* pozorovat jejich lokalizaci v buňce. Následovat by mohlo pozorování kolokalizace těchto fúzních konstruktů s MT pomocí imunofluorescenčně značených MT. Nicméně v tomto případě by se nejednalo o potvrzení přímé vazby daného úseku k MT, ale pouze o sledování překrývající se lokalizace Hsp90 a MT, tedy o zjištění nepřímé vazby rekombinantního proteinu s MT.

5.6. Význam znalosti MT-vazebné domény Hsp90_MT

Obsah a výsledky mé práce se snaží přispět k lepšímu pochopení molekulární podstaty interakce Hsp90 s MT. Nalezení sekvence zodpovědné za vazbu k MT by umožnilo jemnou regulaci aktivity Hsp90 související s cytoskeletem. Například inhibice MT vazebné domény by mohla ukázat další nové funkce proteinu, které nelze detekovat po přidání celkového inhibitoru Hsp90, například geldanamycinu. Právě působení inhibitorů na celkovou aktivitu Hsp90 bylo například také jedním z kamenů úrazu při testování léků obsahujících inhibitory, které měly zabránit množení rakovinných buněk, v podobě závažných vedlejších účinků (Růčková *et al.*, 2011). Dalším využitím zjištění molekulární podstaty interakce Hsp90 s MT by mohlo být následné využívání tohoto MT-vazebného motivu jako reportérového genu

pro vizualizaci MT v rostlinných buňkách, jako je tomu například v případě fúzního proteinu GFP-MBD. Tento protein se skládá ze zeleného fluorescenčního proteinu (GFP) a MT-vazebné domény (MBD) izolované z MAP4 a poprvé byl využit pro značení kortikálních MT v epidermálních buňkách listů fazole, které tento protein tranzientně exprimovaly (Marc *et al.*, 1998).

Mé výsledky ukazující na značný podíl KE-domény na vazbě Hsp90_MT k MT naznačují, že by se tento molekulární chaperon mohl řadit mezi další MAP s KE-MT- vazebným motivem a že by také mohl rozšířit řady proteinů s objevenou MT-vazebnou doménou.

6. Závěr

S pomocí předkládané diplomové práce jsem se pokusila navázat na předchozí výsledky publikované o proteinu Hsp90_MT a objasnit MT-vazebnou aktivitu této specifické cytozolické izoformy.

- Vytvořila jsem šest kandidátních úseků molekuly Hsp90_MT, u nichž jsem dbala především na přítomnost KE-bohaté domény, jakožto hlavního kandidátního úseku pro schopnost vazby Hsp90_MT k MT.
- Všechny kandidátní úseky jsem klonovala do vektoru pDrive, pět z nich jsem následně úspěšně vnesla do overexpresního vektoru pET28.
- Všech pět kandidátních úseků Hsp90_MT jsem úspěšně testovala na schopnost exprimace v bakteriích, čtyři úseky jsem následně purifikovala.
- Kosedimentační analýzy proběhly se čtyřmi úseky Hsp90_MT, analýzy denzit pomohly orientačně určit MT-vazebnou doménu proteinu Hsp90_MT.
- Z výsledků analýz denzit vyplývá, že největší podíl na vazbě Hsp90_MT k MT má třetí kandidátní úsek Hsp90_MT obsahující KE-bohatou doménu. Tento výsledek potvrzuje naši úvodní hypotézu, nicméně k přesnějšímu určení budou třeba dodatečné experimenty.

7. Seznam použité literatury

Al-Bassam, J., Kim, H., Brouhard, G., van Oijen, A., Harrison, S. C. and Chang, F. (2010). CLASP Promotes Microtubule Rescue by Recruiting Tubulin Dimers to the Microtubule. *Developmental Cell* **19**, 245-258.

Ambrose, J. C., Li, W. X., Marcus, A., Ma, H. and Cyr, R. (2005). A minus-end-directed kinesin with plus-end tracking protein activity is involved in spindle morphogenesis. *Molecular Biology of the Cell* **16**, 1584-1592.

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**, 2763-2775.

Bensadoun, A. and Weinstein, D. (1976). ASSAY OF PROTEINS IN PRESENCE OF INTERFERING MATERIALS. *Analytical Biochemistry* **70**, 241-250.

Bisgrove, S. R., Hable, W. E. and Kropf, D. L. (2004). +TIPs and microtubule regulation. The beginning of the plus end in plants. *Plant Physiology* **136**, 3855-3863.

Bisgrove, S. R., Lee, Y. R. J., Liu, B., Peters, N. T. and Kropf, D. L. (2008). The microtubule plus-end binding protein EB1 functions in root responses to touch and gravity signals in Arabidopsis. *Plant Cell* **20**, 396-410.

Boter, M., Amigues, B., Peart, J., Breuer, C., Kadota, Y., Casais, C., Moore, G., Kleanthous, C., Ochsenbein, F., Shirasu, K. et al. (2007). Structural and functional analysis of SGT1 reveals that its interaction with HSP90 is required for the accumulation of Rx, an R protein involved in plant immunity. *Plant Cell* **19**, 3791-3804.

Bradford, M. M. (1976). RAPID AND SENSITIVE METHOD FOR QUANTITATION OF MICROGRAM QUANTITIES OF PROTEIN UTILIZING PRINCIPLE OF PROTEIN-DYE BINDING. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.

Breviario, D. and Nick, P. (2000). Plant tubulins: A melting pot for basic questions and promising applications. *Transgenic Research* **9**, 383-393.

Buschmann, H., Fabri, C. O., Hauptmann, M., Hutzler, P., Laux, T., Lloyd, C. W. and Schaffner, A. R. (2004). Helical growth of the Arabidopsis mutant *tortifolia1* reveals a plant-specific microtubule-associated protein. *Current Biology* **14**, 1515-1521.

Cadepond, F., Jibard, N., Binart, N., Schweizergroyer, G., Segardmaurel, I. and Baulieu, E. E. (1994). SELECTIVE DELETIONS IN THE 90 KDA HEAT-SHOCK PROTEIN (HSP90) IMPEDE HETEROOLIGOMERIC COMPLEX-FORMATION WITH THE GLUCOCORTICOSTEROID RECEPTOR (GR) OR HORMONE-BINDING BY GR. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **48**, 361-367.

Cassimeris, L. and Spittle, C. (2001). Regulation of microtubule-associated proteins. *International Review of Cytology - a Survey of Cell Biology, Vol 210* **210**, 163-226.

Chan, J., Calder, G. M., Doonan, J. H. and Lloyd, C. W. (2003). EB1 reveals mobile microtubule nucleation sites in Arabidopsis. *Nature Cell Biology* **5**, 967-971.

Chen, B., Piel, W. H., Gui, L. M., Bruford, E. and Monteiro, A. (2005). The HSP90 family of genes in the human genome: Insights into their divergence and evolution. *Genomics* **86**, 627-637.

Csermely, P. and Kahn, C. R. (1991). THE 90-KDA HEAT-SHOCK PROTEIN (HSP-90) POSSESSES AN ATP BINDING-SITE AND AUTOPHOSPHORYLATING ACTIVITY. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 4943-4950.

Csermely, P., Schnaider, T., Soti, C., Prohaszka, Z. and Nardai, G. (1998). The 90-kDa molecular chaperone family: Structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacology & Therapeutics* **79**, 129-168.

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.

Dechert, U., Weber, P., Konig, B., Ortwein, C., Nilson, I., Linxweiler, W., Wollny, E. and Gassen, H. G. (1994). A PROTEIN-KINASE ISOLATED FROM PORCINE BRAIN MICROVESSELS IS SIMILAR TO A CLASS OF HEAT-SHOCK PROTEINS. *European Journal of Biochemistry* **225**, 805-809.

Deeks, M. J., Fendrych, M., Smertenko, A., Bell, K. S., Oparka, K., Cvrckova, F., Zarsky, V. and Hussey, P. J. (2010). The plant formin AtFH4 interacts with both actin and microtubules, and contains a newly identified microtubule-binding domain. *Journal of Cell Science* **123**, 1209-1215.

Dhonukshe, P., Gadella, T. W. J. Jr. (2003). Alteration of microtubule dynamic instability during preprophase band formation revealed by yellow fluorescent protein-CLIP170 microtubule plus-end labeling. *The Plant Cell* **15**, 597-611.

Dimitrov, A., Quesnoit, M., Moutel, S., Cantaloube, I., Pous, C. and Perez, F. (2008). Detection of GTP-Tubulin Conformation in Vivo Reveals a Role for GTP Remnants in Microtubule Rescues. *Science* **322**, 1353-1356.

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

Fache, V., Gaillard, J., Van Damme, D., Geelen, D., Neumann, E., Stoppin-Mellet, V. and Vantard, M. (2010). Arabidopsis Kinetochore Fiber-Associated MAP65-4 Cross-Links Microtubules and Promotes Microtubule Bundle Elongation. *Plant Cell* **22**, 3804-3815.

Felts, S. J., Owen, B. A. L., Nguyen, P., Trepel, J., Donner, D. B. and Toft, D. O. (2000). The hsp90-related protein TRAP1 is a mitochondrial protein with distinct functional properties. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 3305-3312.

Flores-Perez, U. and Jarvis, P. (2013). Molecular chaperone involvement in chloroplast protein import. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* **1833**, 332-340.

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.

Frey, N., Klotz, J. and Nick, P. (2009). Dynamic BridgesA Calponin-Domain Kinesin From Rice Links Actin Filaments and Microtubules in Both Cycling and Non-Cycling Cells. *Plant and Cell Physiology* **50**, 1493-1506.

Gaillard, J., Neumann, E., Van Damme, D., Stoppin-Mellet, V., Ebel, C., Barbier, E., Geelen, D. and Vantard, M. (2008). Two Microtubule-associated Proteins of Arabidopsis MAP65s Promote Antiparallel Microtubule Bundling. *Molecular Biology of the Cell* **19**, 4534-4544.

Galjart, N. (2005). Clips and clasps and cellular dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6**, 487-498.

Galjart, N. (2010). Plus-End-Tracking Proteins and Their Review Interactions at Microtubule Ends. *Current Biology* **20**, R528-R537.

Gardiner, J. and Marc, J. (2003). Putative microtubule-associated proteins from the Arabidopsis genome. *Protoplasma* **222**, 61-74.

Gardiner, J. C., Harper, J. D. I., Weerakoon, N. D., Collings, D. A., Ritchie, S., Gilroy, S., Cyr, R. J. and Marc, J. (2001). A 90-kD phospholipase D from tobacco binds to microtubules and the plasma membrane. *Plant Cell* **13**, 2143-2158.

Glover, D. M. (2005). Polo kinase and progression through M phase in Drosophila: a perspective from the spindle poles. *Oncogene* **24**, 230-237.

Goddard, R. H., Wick, S. M., Silflow, C. D. and Snustad, D. P. (1994). MICROTUBULE COMPONENTS OF THE PLANT-CELL CYTOSKELETON. *Plant Physiology* **104**, 1-6.

Gungabissoon, R. A., Khan, S., Hussey, P. J. and Maciver, S. K. (2001). Interaction of elongation factor 1 alpha from Zea mays (ZmEF-1 alpha) with F-actin

and interplay with the maize actin severing protein, ZmADF3. *Cell Motility and the Cytoskeleton* **49**, 104-111.

Hamada, T. (2007). Microtubule-associated proteins in higher plants. *Journal of Plant Research* **120**, 79-98.

Harrell, J. M., Kurek, I., Breiman, A., Radanyi, C., Renoir, J. M., Pratt, W. B. and Galigniana, M. D. (2002). All of the protein interactions that link steroid receptor center dot hsp90 center dot immunophilin heterocomplexes to cytoplasmic dynein are common to plant and animal cells. *Biochemistry* **41**, 5581-5587.

Hayashi, I. and Ikura, M. (2003). Crystal structure of the amino-terminal microtubule-binding domain of end-binding protein 1 (EB1). *Journal of Biological Chemistry* **278**, 36430-36434.

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.

Ho, C. M. K., Lee, Y. R. J., Kiyama, L. D., Dinesh-Kumar, S. P. and Liu, B. (2012). Arabidopsis Microtubule-Associated Protein MAP65-3 Cross-Links Antiparallel Microtubules toward Their Plus Ends in the Phragmoplast via Its Distinct C-Terminal Microtubule Binding Domain. *Plant Cell* **24**, 2071-2085.

Howard, J. and Hyman, A. A. (2003). Dynamics and mechanics of the microtubule plus end. *Nature* **422**, 753-758.

Huang, S. L., Jin, L. F., Du, J. Z., Li, H., Zha, Q., Ou, G. S., Ao, G. M. and Yuan, M. (2007). SB401, a pollen-specific protein from *Solanum berthaultii*, binds to and bundles microtubules and F-actin. *Plant Journal* **51**, 406-418.

Hussey, P. J., Hawkins, T. J., Igarashi, H., Kaloriti, D. and Smertenko, A. (2002). The plant cytoskeleton: recent advances in the study of the plant microtubule-associated proteins MAP-65, MAP-190 and the *Xenopus* MAP215-like protein, MOR1. *Plant Molecular Biology* **50**, 915-924.

Igarashi, H., Orii, H., Mori, H., Shimmen, T. and Sonobe, S. (2000). Isolation of a novel 190 kDa protein from tobacco BY-2 cells: Possible involvement in the interaction between actin filaments and microtubules. *Plant and Cell Physiology* **41**, 920-931.

Johnson, B. D., Chadli, A., Felts, S. J., Bouhouche, I., Catelli, M. G. and Toft, D. O. (2000). Hsp90 chaperone activity requires the full-length protein and interaction among its multiple domains. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 32499-32507.

- Johnson, J. L. and Brown, C.** (2009). Plasticity of the Hsp90 chaperone machine in divergent eukaryotic organisms. *Cell Stress & Chaperones* **14**, 83-94.
- Kaloriti, D., Galva, C., Parupalli, C., Khalifa, N., Galvin, M. and Sedbrook, J. C.** (2007). Microtubule associated proteins in plants and the processes they manage. *Journal of Integrative Plant Biology* **49**, 1164-1173.
- Kirik, V., Herrmann, U., Parupalli, C., Sedbrook, J. C., Ehrhardt, D. W. and Hulskamp, 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**, 4416-4425.
- Korolev, A. V., Buschmann, H., Doonan, J. H. and Lloyd, C. W.** (2007). AtMAP70-5, a divergent member of the MAP70 family of microtubule-associated proteins, is required for anisotropic cell growth in Arabidopsis. *Journal of Cell Science* **120**, 2241-2247.
- Krishna, P. and Gloor, G.** (2001). The Hsp90 family of proteins in Arabidopsis thaliana. *Cell Stress & Chaperones* **6**, 238-246.
- Krtkova, J., Zimmermann, A., Schwarzerova, K. and Nick, P.** (2012). Hsp90 binds microtubules and is involved in the reorganization of the microtubular network in angiosperms. *Journal of Plant Physiology* **169**, 1329-1339.
- Kumagai, H. and Sakai, H.** (1983). A PORCINE BRAIN PROTEIN (35K-PROTEIN) WHICH BUNDLES MICROTUBULES AND ITS IDENTIFICATION AS GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE. *Journal of Biochemistry* **93**, 1259-1269.
- Laemmlı, U. K.** (1970). CLEAVAGE OF STRUCTURAL PROTEINS DURING ASSEMBLY OF HEAD OF BACTERIOPHAGE-T4. *Nature* **227**, 680-&.
- 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.
- Lansbergen, G. and Akhmanova, A.** (2006). Microtubule plus end: A hub of cellular activities. *Traffic* **7**, 499-507.
- Li, H., Zeng, X., Liu, Z. Q., Meng, Q. T., Yuan, M. and Mao, T. L.** (2009). Arabidopsis microtubule-associated protein AtMAP65-2 acts as a microtubule stabilizer. *Plant Molecular Biology* **69**, 313-324.
- Li, Y. H., Shen, Y. A., Cai, C., Zhong, C. C., Zhu, L., Yuan, M. and Ren, H. Y.** (2010). The Type II Arabidopsis Formin14 Interacts with Microtubules and Microfilaments to Regulate Cell Division. *Plant Cell* **22**, 2710-2726.

Lloyd, C. and Chan, J. (2004). Microtubules and the shape of plants to come. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **5**, 13-22.

Manna, T., Honnappa, S., Steinmetz, M. O. and Wilson, L. (2008). Suppression of microtubule dynamic instability by the plus TIP protein EB1 and its modulation by the CAP-Gly domain of p150(Glued). *Biochemistry* **47**, 779-786.

Mao, G. J., Chan, J., Calder, G., Doonan, J. H. and Lloyd, C. W. (2005). Modulated targeting of GFP-AtMAP65-1 to central spindle microtubules during division. *Plant Journal* **43**, 469-478.

Marc, J., Granger, C. L., Brincat, J., Fisher, D. D., Kao, T. H., McCubbin, A. G. and Cyr, R. J. (1998). A GFP-MAP4 reporter gene for visualizing cortical microtubule rearrangements in living epidermal cells. *Plant Cell* **10**, 1927-1939.

Miki, H., Okada, Y. and Hirokawa, N. (2005). Analysis of the kinesin superfamily: insights into structure and function. *Trends in Cell Biology* **15**, 467-476.

Mimori-Kiyosue, Y., Grigoriev, I., Lansbergen, G., Sasaki, H., Matsui, C., Severin, F., Galjart, N., Grosveld, F., Vorobjev, I., Tsukita, S. et al. (2005). CLASP1 and CLASP2 bind to EB1 and regulate microtubule plus-end dynamics at the cell cortex. *Journal of Cell Biology* **168**, 141-153.

Mitchison, T. and Kirschner, M. (1984). DYNAMIC INSTABILITY OF MICROTUBULE GROWTH. *Nature* **312**, 237-242.

Moore, R. C., Durso, N. A. and Cyr, R. J. (1998). Elongation factor-1 alpha stabilizes microtubules in a calcium/calmodulin-dependent manner. *Cell Motility and the Cytoskeleton* **41**, 168-180.

Moritz, M., Braunfeld, M. B., Fung, J. C., Sedat, J. W., Alberts, B. M. and Agard, D. A. (1995). 3-DIMENSIONAL STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF CENTROSOMES FROM EARLY DROSOPHILA EMBRYOS. *Journal of Cell Biology* **130**, 1149-1159.

Morrison, E. E., Wardleworth, B. N., Askham, J. M., Markham, A. F. and Meredith, D. M. (1998). EB1, a protein which interacts with the APC tumour suppressor, is associated with the microtubule cytoskeleton throughout the cell cycle. *Oncogene* **17**, 3471-3477.

Muller, S., Smertenko, A., Wagner, V., Heinrich, M., Hussey, P. J. and Hauser, M. T. (2004). The plant microtubule-associated protein AtMAP65-3/PLE is essential for cytokinetic phragmoplast function. *Current Biology* **14**, 412-417.

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-U52.

Nardai, G., Schnaider, T., Soti, C., Ryan, M. T., Hoj, P. B., Somogyi, J. and Csermely, P. (1996). Characterization of the 90 kDa heat shock protein (HSP90)-associated ATP/GTPase. *Journal of Biosciences* **21**, 179-190.

Nick, P., Lambert, A. M. and Vantard, M. (1995). A microtubule-associated protein in maize is expressed during phytochrome-induced cell elongation. *Plant Journal* **8**, 835-844.

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.

Pearl, L. H. and Prodromou, C. (2000). Structure and in vivo function of Hsp90. *Current Opinion in Structural Biology* **10**, 46-51.

Pearl, L. H., Prodromou, C. and Workman, P. (2008). The Hsp90 molecular chaperone: an open and shut case for treatment. *Biochemical Journal* **410**, 439-453.

Perrin, R. M., Wang, Y., Yuen, C. Y. L., Will, J. and Masson, P. H. (2007). WVD2 is a novel microtubule-associated protein in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **49**, 961-971.

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.

Pratt, W. B., Krishna, P. and Olsen, L. J. (2001). Hsp90-binding immunophilins in plants: the protein movers. *Trends in Plant Science* **6**, 54-58.

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.

Prodromou, C., Roe, S. M., O'Brien, R., Ladbury, J. E., Piper, P. W. and Pearl, L. H. (1997). Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. *Cell* **90**, 65-75.

Realini, C., Rogers, S. W. and Rechsteiner, M. (1994). KEKE MOTIFS - PROPOSED ROLES IN PROTEIN-PROTEIN ASSOCIATION AND PRESENTATION OF PEPTIDES BY MHC CLASS-I RECEPTORS. *Febs Letters* **348**, 109-113.

- Richardson, D. N., Simmons, M. P. and Reddy, A. S. N.** (2006). Comprehensive comparative analysis of kinesins in photosynthetic eukaryotes. *Bmc Genomics* **7**.
- Růčková, E., Müller, P., Vojtěšek, B.** (2011). Hsp90 – cíl protinádorové terapie. *Klinická Onkologie* **24(5)**, 329-337.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T.** (1989). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sambrook, J., & Russell, D. W.** (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sedbrook, J. C.** (2004). MAPs in plant cells: delineating microtubule growth dynamics and organization. *Current Opinion in Plant Biology* **7**, 632-640.
- Shoji, T., Narita, N. N., Hayashi, K., Asada, J., Hamada, T., Sonobe, S., Nakajima, K. and Hashimoto, T.** (2004). Plant-specific microtubule-associated protein SPIRAL2 is required for anisotropic growth in arabidopsis. *Plant Physiology* **136**, 3933-3944.
- Sirover, M. A.** (1999). New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology* **1432**, 159-184.
- Smertenko, A., Blume, Y., Viklicky, V., Opatrny, Z. and Draber, P.** (1997). Post-translational modifications and multiple tubulin isoforms in *Nicotiana tabacum* L cells. *Planta* **201**, 349-358.
- Smertenko, A., Saleh, N., Igarashi, H., Mori, H., Hauser-Hahn, I., Jiang, C. J., Sonobe, S., Lloyd, C. W. and Hussey, P. J.** (2000). A new class of microtubule-associated proteins in plants. *Nature Cell Biology* **2**, 750-753.
- Smertenko, A. P., Chang, H. Y., Wagner, V., Kaloriti, D., Fenyk, S., Sonobe, S., Lloyd, C., Hauser, M. T. and Hussey, P. J.** (2004). The Arabidopsis microtubule-associated protein AtMAP65-1: Molecular analysis of its microtubule bundling activity. *Plant Cell* **16**, 2035-2047.
- Smertenko, A. P., Kaloriti, D., Chang, H. Y., Fiserova, J., Opatrny, Z. and Hussey, P. J.** (2008). The C-Terminal Variable Region Specifies the Dynamic Properties of Arabidopsis Microtubule-Associated Protein MAP65 Isoforms. *Plant Cell* **20**, 3346-3358.

Stebbins, C. E., Russo, A. A., Schneider, C., Rosen, N., Hartl, F. U. and Pavletich, N. P. (1997). Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: Targeting of a protein chaperone by an antitumor agent. *Cell* **89**, 239-250.

Tisdale, E. J., Azizi, F. and Artalejo, C. R. (2009). Rab2 Utilizes Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase and Protein Kinase C iota to Associate with Microtubules and to Recruit Dynein. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 5876-5884.

Van Damme, D., Van Poucke, K., Boutant, E., Ritzenthaler, C., Inze, D. and Geelen, D. (2004). In vivo dynamics and differential microtubule-binding activities of MAP65 proteins. *Plant Physiology* **136**, 3956-3967.

Volker, K. W. and Knull, H. R. (1997). A glycolytic enzyme binding domain on tubulin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **338**, 237-243.

Vosolsobě, S. (2010). Charakterisace membránového proteinu DREPP. Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Praha.

Walsh, J. L., Keith, T. J. and Knull, H. R. (1989). GLYCOLYTIC ENZYME INTERACTIONS WITH TUBULIN AND MICROTUBULES. *Biochimica Et Biophysica Acta* **999**, 64-70.

Wang, W. X., Vinocur, B., Shoseyov, O. and Altman, A. (2004). Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science* **9**, 244-252.

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.

Wang, X. M. (2002). Phospholipase D in hormonal and stress signaling. *Current Opinion in Plant Biology* **5**, 408-414.

Wasteneys, G. O. (2004). Progress in understanding the role of microtubules in plant cells. *Current Opinion in Plant Biology* **7**, 651-660.

Wegele, H., Muller, L. and Buchner, J. (2004). Hsp70 and Hsp90 - a relay team for protein folding. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* **151**, 1-44.

Weis, F., Moullintraffort, L., Heichette, C., Chretien, D. and Garnier, C. (2010). The 90-kDa Heat Shock Protein Hsp90 Protects Tubulin against Thermal Denaturation. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 9525-9534.

Williams, N. E. and Nelsen, E. M. (1997). HSP70 and HSP90 homologs are associated with tubulin in hetero-oligomeric complexes, cilia and the cortex of *Tetrahymena*. *Journal of Cell Science* **110**, 1665-1672.

Winkler, A. A., Bobok, A., Zonneveld, B. J. M., Steensma, H. Y. and Hooykaas, P. J. J. (1998). The lysine-rich C-terminal repeats of the centromere-binding factor 5 (Cbf5) of *Kluyveromyces lactis* are not essential for function. *Yeast* **14**, 37-48.

Yao, M., Wakamatsu, Y., Itoh, T. J., Shoji, T. and Hashimoto, T. (2008). Arabidopsis SPIRAL2 promotes uninterrupted microtubule growth by suppressing the pause state of microtubule dynamics. *Journal of Cell Science* **121**, 2372-2381.

Ye, R. Q., Wang, W., Iki, T., Liu, C., Wu, Y., Ishikawa, M., Zhou, X. P. and Qi, Y. J. (2012). Cytoplasmic Assembly and Selective Nuclear Import of Arabidopsis ARGONAUTE4/siRNA Complexes. *Molecular Cell* **46**, 859-870.

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.

8. Přílohy

8.1. Příloha 1

Porovnání NtHsp90_MT s AtHsp90, vyznačena je ATP-vazebná doména, KE-bohatá doména a C-terminální doména

		—————	ATP doména	
NtHsp90	1	MAEAE T FAFQAEINQLLSLIINTFYSNKEIFLRE L ISNSSDALDKIRFESLTDKSKLDAQ	60	
AtHsp90	6	MA+AETFAFQAEINQLLSLIINTFYSNKEIFLRE L ISNSSDALDKIRFESLTDKSKLDQ	65	
		—————		
NtHsp90	61	PELFIHIIPDKTNNSLTIIDSGIGMTKADLVNNLGTIARSGTKEFMEALAGADVSMIGQ	120	
AtHsp90	66	PELFI ++PDK+N +L+IIDSGIGMTKADLVNNLGTIARSGTKEFMEAL AGADVSMIGQ	125	
		—————		
NtHsp90	121	FGVGFYSAYLVAEKVIVTTKHNDDEQYVWESQAGGSFTVTRDTSGENLGRGK I TFLKE	180	
AtHsp90	126	FGVGFYSAYLVAEKVVVTTKHNDDEQYVWESQAGGSFTVTRD V DGEPLGRGK I TFLK D	185	
		—————	KE-bohatá doména	
NtHsp90	181	DQLEYLEERRLKDLIKKHSEFISYPI S LWVEKTIEKEISDDEEEEEKDEEGKVEEVDEE	240	
AtHsp90	186	DQLEYLEERRLKDL+KKHSEFISYPI LW EKT EKEISDDE+E+E K E E +E	245	

NtHsp90	241	KEMEEKKKKKVKE-VSNEWSLVNKQKPIWMRKPEITKEEYAAFYKSLTNDWEEHMAVKH	299
AtHsp90	246	++ ++ KKKK + VS+EW L+NKQKPIW+RKP+ETKKEEYAAFYKSLTNDWE+H+AVKH EKEKDGGKKKKIKEVSHWELINKQKPIWLRKPEEITKEEYAAFYKSLTNDWEDHLAVKH	305
NtHsp90	300	FSVEGQLEFKAILFVPKRAPFDLFDTRKKPNNIKLYVRRVFIMDNCEELIPEYLSFVKGI	359
AtHsp90	306	FSVEGQLEFKAILFVPKRAPFDLFDTRKKLNNIKLYVRRVFIMDNCEELIPEYLSFVKGV	365
NtHsp90	360	VDSEDLPLNISREMLQQNKILKVIKRNLVKKCVLELFFEIAENKEDYNKFYEAFSKNLKLG	419
AtHsp90	366	VDS+DLPLNISRE LQQNKILKVIKRNLVKKC+E+F EIAENKEDY KFYEAFSKNLKLG VSDDLPLNISRETLQQNKILKVIKRNLVKKCIEMFNEIAENKEDYTKFYEAFSKNLKLG	425
NtHsp90	420	IHEDSQNRSKFAELRLRYHSTKSGDEMTSLKDYVTRMKEGQNDIYYITGESKKAVENTSPFL	479
AtHsp90	426	IHEDSQNR K A+LLRYHSTKSGDEMTS KDYVTRMKEGQ DI+YITGESKKAVENTSPFL IHEDSQNRGKIADLLRYHSTKSGDEMTSFKDYVTRMKEGQKIDIFYITGESKKAVENTSPFL	485
NtHsp90	480	EKLKKGYEVLVYMDAIDEYSIGQLKEFEGKLVSATKEGL-KLDESEDEKKKQEELKEK	538
AtHsp90	486	E+LKK+GYEVLYMVDAIDEY++GQLKE++GKLVSATKEGL DE+E+EKKK+EE K+ ERLKKRGYEVLVYMDAIDEYAVGQLKEYDGGKLVSATKEGLKLEDETEEEKKKREKKKS	545
NtHsp90	539	FEGLCKVIKDLVLDGKVEKVVSDRVVDSPPCLVTGEYGTANMERIMKAQALRDSSMAGY	598
AtHsp90	546	FE LCK IK++LGDKVEKVVSDRVVDSPPCLVTGEYGTANMERIMKAQALRDSSM+GY FENLCKTIKEILGDKVEKVVSDRVVDSPPCLVTGEYGTANMERIMKAQALRDSSMSGY	605
		_____ terminální doména	
NtHsp90	599	MSSKKTMEINPENAIMHEELRKRADADKNDKSVKDLVLLLFETALLTSGFSLPEPNTFGNR	658
AtHsp90	606	MSSKKTMEINP+N IMEELRKRA+ADKNDKSVKDLV+LL+ETALLTSGFSL+EPNTF R MSSKKTMEINPDNGIMEELRKRRAEADKNDKSVKDLVMLLYETALLTSGFSLPEPNTFAAR	665
NtHsp90	659	IHRMLKLGLSIDDDSG-DADVDMPALEDPEADAEGSKMEEVD	699
AtHsp90	666	IHRMLKLGLSID+D + D DMP LE E AE SKMEEVD IHRMLKLGLSIDEDENVEEDGDMPELE--EDAAEESKMEEVD	705

8.2. Příloha 2

Sekvence šesti kandidátních úseků NtHsp90_MT, vyznačená zeleně, na předloze kompletní sekvence NtHsp90_MT

1. úsek

ATGGCGGAGGCAGAGACGTTTGCATTCCAAGCTGAGATCAATCAGCTTCTCAGTCTTATTATCAACACTTCTACAGCAACAAGGAGATCTTTTCCCGTGAACCTCATTAGCAATTCGTCGATGCTCGACAAAGATCCGTTTGTGAGAGCTTGACTGACAAGAGCAAGCTAGATGCTCAACCTGAGCTCTTATCCATATATTTCCAGACAAAACCAACAATTCAGTACTATCATTGATAGTGGTATTGGCATGACAAAGGCTGATCTGGTGAACAACCTGGGTACAATTTGCGAGGTCAGGAACCAAGGAATTCATGGAAGCTTTCGAGCTGGTGTGCTGATGTTAGCATGATTGGGCAATTTGGTGGTGGTTTCTACTCTGCTTACTTGGTAGCTGAGAAGGTTATCGTGACCACAAAGCACAATGATGATGAACAATATGTTCTGGGAATCTCAAGCTGGTGGTCTTCTACTGTTTACCAGGGACACATCTGGTGAGAACCTTGGTAGGGGTACAAAAATAACCCCTCTTCCTCAAGGAGGATCAACTTGAATACCTTGAAGAAGCTAGGCTCAAGGACCTGATTAAGAAGCCTTGAGTTTCACTAGCTACCCAACTCTTTTGTGGGTTGAGAAGACCATAGAAAAGGAAATCTCTGATGATGAGGAGGAAGAGGAGAAGAAAGACGAGGAAGGTAAAGGTAGAGGAGGTTGACGAAGAAAAGGAGATGGAAGAAAAGAAAAGAAGAAGGTTAAAGAAGTTTCTAATGAGTGGTCAATGGTGAACAAGCAGAAAGCCATTTGGATGAGGAAGCCTGACGAAATCACGAAGGAAGAGTATGCCGCTTTCTATAAGAGCTTGACTAATGACTGGGAGGAGCATATGGCTGTGAAGCATTCTCTGTTGAGGGCAATTGGAGTTCAGGCCATTTCTTTTGTTCAAAAAGGGCTCCTTTTGTATCTCTTCGACACAAGGAAGAAGCCCAATAATCAAGCTGTATGTGCGCCGTGTGTTTATGAGCAACTGTGAGGAGTTGATTCCTGAATATTTGAGCTTTGTGAAGGTTATTTGGATTCCGAGGACCTTCTCTTAAACATCTCCAGAGAGATGTTGAGCAGACAAGATCCTGAAGTTATTTCGCAAGAATTTGGTGAAGAAGTGTGTGAGCTTTCTTTCGAAATTTGCTGAGAATAAGGAAGACTATAACAAGTTTATGAGGCTTTCTCAAGAACCTCAAGCTTGGCATCCACGAGGATCCCAAAATAGGTTAAGTTTGGTGAAGTCTGCGGTTACCATTCACCAAGAGCGGTGATGAGATGACCAGTTTAAAGGACTATGTGACCAGAAATGAAGGAAGGCCAGAATGATATTTACTACATTACTGGTGAGAGCAAGAAGGCTGTTGAGAACTACCCCTTCTTTCGAGAACTGAAGAAGAAGGGCTATGAGGTTCTTTACATGGTTGATGCCATTGATGAGTATTCAATTTGGTCAGTGAAGGAATTTGAGGGCAAAAAGCTTGTCTTCTGCTACCAAGGAAGGTTCTCAAGCTTGTGATGAGAGTGAAGATGAGAAGAAAAGCAGGAAGAATTTGAAGGAGAAGTTTGAAGGACTGTGCAAGGTCATCAAGGATGTTCTAGGAGACAAGGTTGAGAAGGTGGTTGTCTGACCGTGTGTGGACTCTCCCTGCTGCTTAGTCACTGGGGAGTATGGCTGGACTGTAATATGGAGAGAATCATGAAGGCAACAAGCACTTAGGACTCTAGCATGGCTGGATACATGTCTAGCAAGAAGACCATGGAGATCAACCAGAGAATGCTATTATGGAAGAGCTGAGGAAGAGGGCTGATGCAGACAAGAATGACAAGTCTGTGAAGGACTTGGTTCTTCTGCTGTTTGTGACTGCCTCTCACCTCAG

GTTTCAGCCTTGAGGAACCTAACACCTTTGGCAACAGAATTACAGGATGCTGAAGCTTGGGCTGAGCATTGATGATGACTCTGGAGA
TGCAGATGTTGACATGCCGGCTTTGGAGGATCCTGAAGCTGATGCTGAGGGTAGCAAGATGGAGGAAGTTGACTAA

2. úsek

ATGGCGGAGGCAGAGACGTTTGCATTCCAAGCTGAGATCAATCAGCTTCTCAGTCTTATTATCAACACTTTCTACAGCAACAAGGAGA
TCTTTCTCCGTGAACTCATTAGCAATTCGTCCGATGCTCTGGACAAGATCCGTTTTGAGAGCTTGACTGACAAGAGCAAGCTAGATGC
TCAACCTGAGCTCTTCATCCATATATTCCAGACAAAACCAACAATTCAGTACTATCATTGATAGTGGTATTGGCATGACAAAGGCT
GATCTGGTGAACAACCTGGGTACAATTGCGAGGTCAGGAACCAAGGAATTCATGGAAGCTCTTGCAGCTGGTGTGATGTTAGCATGA
TTGGGCAATTTGGTGTGGTTTCTACTCTGCTTACTTGGTAGCTGAGAAGGTTATCGTGACCACAAAGCACAATGATGATGAACAATA
TGCTGGGAATCTCAAGCTGGTGGTTCTTCTACTGTTACCAGGGACACATCTGGTGAGAACCTTGGTAGGGGTACAAAAATAACCTC
TTCTCAAGGAGGATCAACTTGAATACCTTGAAGAACGTAGGCTCAAGGACCTGATTAAGAAGCACTCTGAGTTTATCAGCTACCCAA
TCTCTTTTGGGTTGAGAAGCCATAGAAAAGGAAATCTCTGATGATGAGGAGGAAGAGGAGAAGAAAGACGAGGAAGGTAAGGTAGA
GGAGGTTGACGAAGAAAAGGAGATGGAAGAAAAGAAAAGAAGGTTAAAGAAGTTTCTAATGAGTGGTCATTGGTGAACAAGCAG
AAGCCATTTGGATGAGGAAGCCTGACGAAATCAGGAAGGAGATGCGCTTTCTATAAGAGCTTGACTAATGACTGGGAGGAGC
ATATGGCTGTGAAGCACTTCTCTGTTGAGGGCCAATTGGAGTTCAGGCCATTCTTTTTGTTCCAAAAGGGCTCCTTTTGATCTCTT
CGACACAAGGAAGAAGCCCAATAATCAAGCTGTATGTGCGCCGTGTGTTTATTATGGACAACCTGTGAGGAGTTGATTCTGAATAT
TTAGCTTTGTGAAGGTTATTGTGGATCCGAGGACCTTCTCTTAACATCTCCAGAGAGATGTTGCAGCAGAACAAGATCCTGAAGG
TTATTCGCAAGAATTTGGTGAAGAAGTGTGTTGAGCTTTCTTTCGAAATGCTGAGAATAAGGAAGACTATAACAAGTTTTATGAGGC
CTTCTCAAGAACCTCAAGCTTGGCATCCACGAGGATCCCAAAATAGGTCTAAGTTTGTGAACTGCTGCGGTACCATTCCACCAAG
AGCGGTGATGAGATGACCAAGTTTAAAGGACTATGTGACCAGAATGAAGGAAGGCCAGAATGATAATTTACTACATTACTGGTGAGAGCA
AGAAGGCTGTTGAGAACTCACCTTCTTGGAAACTGAAGAAGAAGGGCTATGAGGTTCTTTACATGGTTGATGCCATTGATGAGTA
TTCAATTTGGTCACTGAAAGAAATTTGAGGGCAAAAAGCTTGTCTGCTACCAAGGAAGTCTCAAGCTTGATGAGAGTGAAGATGAG
AAGAAAAAGCAGGAAGAATTTGAAGGAGAAGTTTGAAGGACTGTGCAAGGTCATCAAGGATGTTCTAGGAGACAAGGTTGAGAAGGTGG
TTGTCTTGACCGTGTGTTGGACTCTCCCTGCTGCTTAGTCACTGGGGAGTATGGCTGGACTGCTAATATGGAGAGAATCATGAAGGC
ACAAGCACTTAGGACTCTAGCATGGCTGGATACATGTCTAGCAAGAAGACCATGGAGATCAACCCAGAGAATGCTATTATGGAAGAG
CTGAGGAAGAGGGCTGATGACAGACAAGAATGACAAGTCTGTGAAGGACTTGGTTCTCTTGTGTTGAGACTGCCCTCCTCACCTCAG
GTTTCAGCCTTGAGGAACCTAACACCTTTGGCAACAGAATTACAGGATGCTGAAGCTTGGGCTGAGCATTGATGATGACTCTGGAGA
TGCAGATGTTGACATGCCGGCTTTGGAGGATCCTGAAGCTGATGCTGAGGGTAGCAAGATGGAGGAAGTTGACTAA

3. úsek

ATGGCGGAGGCAGAGACGTTTGCATTCCAAGCTGAGATCAATCAGCTTCTCAGTCTTATTATCAACACTTTCTACAGCAACAAGGAGA
TCTTTCTCCGTGAACTCATTAGCAATTCGTCCGATGCTCTGGACAAGATCCGTTTTGAGAGCTTGACTGACAAGAGCAAGCTAGATGC
TCAACCTGAGCTCTTCATCCATATATTCCAGACAAAACCAACAATTCAGTACTATCATTGATAGTGGTATTGGCATGACAAAGGCT
GATCTGGTGAACAACCTGGGTACAATTGCGAGGTCAGGAACCAAGGAATTCATGGAAGCTCTTGCAGCTGGTGTGATGTTAGCATGA
TTGGGCAATTTGGTGTGGTTTCTACTCTGCTTACTTGGTAGCTGAGAAGGTTATCGTGACCACAAAGCACAATGATGATGAACAATA
TGCTGGGAATCTCAAGCTGGTGGTTCTTCTACTGTTACCAGGGACACATCTGGTGAGAACCTTGGTAGGGGTACAAAAATAACCTC
TTCTCAAGGAGGATCAACTTGAATACCTTGAAGAACGTAGGCTCAAGGACCTGATTAAGAAGCACTCTGAGTTTATCAGCTACCCAA
TCTCTTTTGGGTTGAGAAGCCATAGAAAAGGAAATCTCTGATGATGAGGAGGAAGAGGAGAAGAAAGACGAGGAAGGTAAGGTAGA
GGAGGTTGACGAAGAAAAGGAGATGGAAGAAAAGAAAAGAAGGTTAAAGAAGTTTCTAATGAGTGGTCATTGGTGAACAAGCAG
AAGCCATTTGGATGAGGAAGCCTGACGAAATCAGGAAGGAGATGCGCTTTCTATAAGAGCTTGACTAATGACTGGGAGGAGC
ATATGGCTGTGAAGCACTTCTCTGTTGAGGGCCAATTGGAGTTCAGGCCATTCTTTTTGTTCCAAAAGGGCTCCTTTTGATCTCTT
CGACACAAGGAAGAAGCCCAATAATCAAGCTGTATGTGCGCCGTGTGTTTATTATGGACAACCTGTGAGGAGTTGATTCTGAATAT
TTAGCTTTGTGAAGGTTATTGTGGATCCGAGGACCTTCTCTTAACATCTCCAGAGAGATGTTGCAGCAGAACAAGATCCTGAAGG
TTATTCGCAAGAATTTGGTGAAGAAGTGTGTTGAGCTTTCTTTCGAAATGCTGAGAATAAGGAAGACTATAACAAGTTTTATGAGGC
CTTCTCAAGAACCTCAAGCTTGGCATCCACGAGGATCCCAAAATAGGTCTAAGTTTGTGAACTGCTGCGGTACCATTCCACCAAG
AGCGGTGATGAGATGACCAAGTTTAAAGGACTATGTGACCAGAATGAAGGAAGGCCAGAATGATAATTTACTACATTACTGGTGAGAGCA
AGAAGGCTGTTGAGAACTCACCTTCTTGGAAACTGAAGAAGAAGGGCTATGAGGTTCTTTACATGGTTGATGCCATTGATGAGTA
TTCAATTTGGTCACTGAAAGAAATTTGAGGGCAAAAAGCTTGTCTGCTACCAAGGAAGTCTCAAGCTTGATGAGAGTGAAGATGAG
AAGAAAAAGCAGGAAGAATTTGAAGGAGAAGTTTGAAGGACTGTGCAAGGTCATCAAGGATGTTCTAGGAGACAAGGTTGAGAAGGTGG
TTGTCTTGACCGTGTGTTGGACTCTCCCTGCTGCTTAGTCACTGGGGAGTATGGCTGGACTGCTAATATGGAGAGAATCATGAAGGC
ACAAGCACTTAGGACTCTAGCATGGCTGGATACATGTCTAGCAAGAAGACCATGGAGATCAACCCAGAGAATGCTATTATGGAAGAG
CTGAGGAAGAGGGCTGATGACAGACAAGAATGACAAGTCTGTGAAGGACTTGGTTCTCTTGTGTTGAGACTGCCCTCCTCACCTCAG
GTTTCAGCCTTGAGGAACCTAACACCTTTGGCAACAGAATTACAGGATGCTGAAGCTTGGGCTGAGCATTGATGATGACTCTGGAGA
TGCAGATGTTGACATGCCGGCTTTGGAGGATCCTGAAGCTGATGCTGAGGGTAGCAAGATGGAGGAAGTTGACTAA

4. úsek

ATGGCGGAGGCAGAGACGTTTGCATTCCAAGCTGAGATCAATCAGCTTCTCAGTCTTATTATCAACACTTTCTACAGCAACAAGGAGA
TCTTTCTCCGTGAACTCATTAGCAATTCGTCCGATGCTCTGGACAAGATCCGTTTTGAGAGCTTGACTGACAAGAGCAAGCTAGATGC
TCAACCTGAGCTCTTCATCCATATATTCCAGACAAAACCAACAATTCAGTACTATCATTGATAGTGGTATTGGCATGACAAAGGCT
GATCTGGTGAACAACCTGGGTACAATTGCGAGGTCAGGAACCAAGGAATTCATGGAAGCTCTTGCAGCTGGTGTGATGTTAGCATGA
TTGGGCAATTTGGTGTGGTTTCTACTCTGCTTACTTGGTAGCTGAGAAGGTTATCGTGACCACAAAGCACAATGATGATGAACAATA
TGCTGGGAATCTCAAGCTGGTGGTTCTTCTACTGTTACCAGGGACACATCTGGTGAGAACCTTGGTAGGGGTACAAAAATAACCTC
TTCTCAAGGAGGATCAACTTGAATACCTTGAAGAACGTAGGCTCAAGGACCTGATTAAGAAGCACTCTGAGTTTATCAGCTACCCAA
TCTCTTTTGGGTTGAGAAGCCATAGAAAAGGAAATCTCTGATGATGAGGAGGAAGAGGAGAAGAAAGACGAGGAAGGTAAGGTAGA

GGAGGTTGACGAAGAAAAGGAGATGGAAGAAAAGAAAAGAAGAAGGTTAAAGAAGTTTCTAATGAGTGGTCATTGGTGAACAAGCAG
AAGCCATTGGATGAGGAAGCCTGACGAAATCAGGAAGAGATGCGCCGTTTCTATAAGAGCTTGACTAATGACTGGGAGGAGC
ATATGGCTGTGAAGCATTCTCTGTTGAGGGCCAATTGGAGTTCAAGGCCATTCTTTTTGTTCCAAAAGGGCTCCTTTTGATCTCTT
CGACACAAGGAAGAAGCCCAATAATCAAGCTGTATGTCGCGCTGTGTTTCAATATGGACAACCTGTGAGGAGTTGATCCTGAATAT
TTGAGCTTTGTGAAGGGTATTGTGGATTCCGAGGACCTTCTCTTAACATCTCCAGAGAGATGTTGCAGCAGAACAAGATCCTGAAGG
TTATTCGCAAGAATTTGGTGAAGAAGTGTGTTGAGCTTTTCTTCGAAATTTGCTGAGAATAAGGAAGACTATAACAAGTTTTATGAGGC
CTTCTCAAAGAACCTCAAGCTTGGCATCCACGAGGATCCCAAATAGGTCTAAGTTTGTGTAAGTGTGCGGTACCATTCCACCAAG
AGCGGTGATGAGATGACCAAGTTTAAAGGACTATGTGACCAGAATGAAGGAAGGCCAGAATGATATTTACTACATTACTGGTGAGAGCA
AGAAGGCTGTTGAGAACTCACCTTCTTGAGAACTGAAGAAGAAGGGCTATGAGGTTCTTTACATGGTTGATGCCATTGATGAGTA
TTCAATTTGGTCAGCTGAAGGAATTTGAGGGCAAAAAGCTTGTCTGCTACCAAGGAAGGTCTCAAGCTTGTGAGAGTGAAGATGAG
AAGAAAAAGCAGGAAGAATTTGAAGGAGAAGTTTGAAGGACTGTGCAAGGTCATCAAGGATGTTCTAGGAGACAAGGTTGAGAAGGTGG
TTGTCTGACCGTGTGTTGGACTCTCCCTGCTTACTGCTTAGTCACTGGGGAGTATGGCTGGACTGTAATATGGAGAGAATCATGAAGGC
ACAAGCACTTAGGACTCTAGCATGGCTGGATACATGTCTAGCAAGAAGACCATGGAGATCAACCAGAGAATGCTATTATGGAAGAG
CTGAGGAAGAGGGCTGATGCAGACAAGAATGACAAGTCTGTGAAGGACTTGGTTCTTGTGCTGTTGAGACTGCCCTCCTCACCTCAG
GTTTCAGCTTGAAGAACCTAACACCTTTGGCAACAGAATTCACAGGATGCTGAAGCTTGGGCTGAGCATTGATGATGACTCTGGAGA
TGCAGATGTTGACATGCCGGCTTTGGAGGATCCTGAAGCTGATGCTGAGGGTAGCAAGATGGAGGAAGTTGACTAA

5. úsek

ATGGCGGAGGCAGAGACGTTTGCATTCCAAGCTGAGATCAATCAGCTTCTCAGTCTTATTATCAACACTTTCTACAGCAACAAGGAGA
TCTTTCTCCGTGAACCTCATTAGCAATTCGTCCGATGCTCTGACAAAGATCCGTTTTGAGAGCTTGACTGACAAGAGCAAGCTAGATGC
TCAACCTGAGCTCTTACATCATATATTCCAGACAAAACCAACAATTCAGTACTATCATGATAGTGGTATTGGCATGACAAAGGCT
GATCTGGTGAACAACCTGGGTACAATTCGAGGTCAGGAACCAAGGAATTCATGGAAGCTCTTGACAGCTGGTGTGATGTTAGCATGA
TTGGGCAATTTGGTGTGTTTCTACTCTGCTTACTTGGTAGCTGAGAAGGTTATCGTGACCACAAAGCACAATGATGATGAACAATA
TGCTGGAATCTCAAGCTGGTGGTTCTTCTACTGTTACCAGGGACACATCTGGTGAGAACCTTGGTAGGGGTACAAAATAACCTC
TTCTCAAGGAGGATCAACTTGAATACCTTGAAGAAGCTAGGCTCAAGGACCTGATTAAGAAGCACTCTGAGTTTCTCAGCTACCCAA
TCTCTTTGTGGGTTGAGAAGACCATAGAAAAGGAAATCTCTGATGATGAGGAGGAAGAGGAGAAGAAAGCAGGAAGGTAAGGTAGA
GGAGGTTGACGAAGAAAAGGAGATGGAAGAAAAGAAAAGAAGAAGGTTAAAGAAGTTTCTAATGAGTGGTCATTGGTGAACAAGCAG
AAGCCATTGGATGAGGAAGCCTGACGAAATCAGGAAGAGATGCGCCGTTTCTATAAGAGCTTGACTAATGACTGGGAGGAGC
ATATGGCTGTGAAGCATTCTCTGTTGAGGGCCAATTGGAGTTCAAGGCCATTCTTTTTGTTCCAAAAGGGCTCCTTTTGATCTCTT
CGACACAAGGAAGAAGCCCAATAATCAAGCTGTATGTGCGCCGTGTGTTTCAATATGGACAACCTGTGAGGAGTTGATTCTCGAATAT
TTGAGCTTTGTGAAGGGTATTGTGGATTCCGAGGACCTTCTCTTAACATCTCCAGAGAGATGTTGCAGCAGAACAAGATCCTGAAGG
TTATTCGCAAGAATTTGGTGAAGAAGTGTGTTGAGCTTTTCTTCGAAATTTGCTGAGAATAAGGAAGACTATAACAAGTTTTATGAGGC
TTATTCGCAAGAATTTGGTGAAGAAGTGTGTTGAGCTTTTCTTCGAAATTTGCTGAGAATAAGGAAGACTATAACAAGTTTTATGAGGC
CTTCTCAAAGAACCTCAAGCTTGGCATCCACGAGGATCCCAAATAGGTCTAAGTTTGTGTAAGTGTGCGGTACCATTCCACCAAG
AGCGGTGATGAGATGACCAAGTTTAAAGGACTATGTGACCAGAATGAAGGAAGGCCAGAATGATATTTACTACATTACTGGTGAGAGCA
AGAAGGCTGTTGAGAACTCACCTTCTTGAGAACTGAAGAAGAAGGGCTATGAGGTTCTTTACATGGTTGATGCCATTGATGAGTA
TTCAATTTGGTCAGCTGAAGGAATTTGAGGGCAAAAAGCTTGTCTGCTACCAAGGAAGGTCTCAAGCTTGTGAGAGTGAAGATGAG
AAGAAAAAGCAGGAAGAATTTGAAGGAGAAGTTTGAAGGACTGTGCAAGGTCATCAAGGATGTTCTAGGAGACAAGGTTGAGAAGGTGG
TTGTCTGACCGTGTGTTGGACTCTCCCTGCTGCTTAGTCACTGGGGAGTATGGCTGGACTGTAATATGGAGAGAATCATGAAGGC
ACAAGCACTTAGGACTCTAGCATGGCTGGATACATGTCTAGCAAGAAGACCATGGAGATCAACCAGAGAATGCTATTATGGAAGAG
CTGAGGAAGAGGGCTGATGCAGACAAGAATGACAAGTCTGTGAAGGACTTGGTTCTTGTGCTGTTGAGACTGCCCTCCTCACCTCAG
GTTTCAGCTTGAAGAACCTAACACCTTTGGCAACAGAATTCACAGGATGCTGAAGCTTGGGCTGAGCATTGATGATGACTCTGGAGA
TGCAGATGTTGACATGCCGGCTTTGGAGGATCCTGAAGCTGATGCTGAGGGTAGCAAGATGGAGGAAGTTGACTAA

6. úsek

ATGGCGGAGGCAGAGACGTTTGCATTCCAAGCTGAGATCAATCAGCTTCTCAGTCTTATTATCAACACTTTCTACAGCAACAAGGAGA
TCTTTCTCCGTGAACCTCATTAGCAATTCGTCCGATGCTCTGACAAAGATCCGTTTTGAGAGCTTGACTGACAAGAGCAAGCTAGATGC
TCAACCTGAGCTCTTACATCATATATTCCAGACAAAACCAACAATTCAGTACTATCATGATAGTGGTATTGGCATGACAAAGGCT
GATCTGGTGAACAACCTGGGTACAATTCGAGGTCAGGAACCAAGGAATTCATGGAAGCTCTTGACAGCTGGTGTGATGTTAGCATGA
TTGGGCAATTTGGTGTGTTTCTACTCTGCTTACTTGGTAGCTGAGAAGGTTATCGTGACCACAAAGCACAATGATGATGAACAATA
TGCTGGAATCTCAAGCTGGTGGTTCTTCTACTGTTACCAGGGACACATCTGGTGAGAACCTTGGTAGGGGTACAAAATAACCTC
TTCTCAAGGAGGATCAACTTGAATACCTTGAAGAAGCTAGGCTCAAGGACCTGATTAAGAAGCACTCTGAGTTTCTCAGCTACCCAA
TCTCTTTGTGGGTTGAGAAGACCATAGAAAAGGAAATCTCTGATGATGAGGAGGAAGAGGAGAAGAAAGCAGGAAGGTAAGGTAGA
GGAGGTTGACGAAGAAAAGGAGATGGAAGAAAAGAAAAGAAGAAGGTTAAAGAAGTTTCTAATGAGTGGTCATTGGTGAACAAGCAG
AAGCCATTGGATGAGGAAGCCTGACGAAATCAGGAAGAGATGCGCCGTTTCTATAAGAGCTTGACTAATGACTGGGAGGAGC
ATATGGCTGTGAAGCATTCTCTGTTGAGGGCCAATTGGAGTTCAAGGCCATTCTTTTTGTTCCAAAAGGGCTCCTTTTGATCTCTT
CGACACAAGGAAGAAGCCCAATAATCAAGCTGTATGTGCGCCGTGTGTTTCAATATGGACAACCTGTGAGGAGTTGATTCTCGAATAT
TTGAGCTTTGTGAAGGGTATTGTGGATTCCGAGGACCTTCTCTTAACATCTCCAGAGAGATGTTGCAGCAGAACAAGATCCTGAAGG
TTATTCGCAAGAATTTGGTGAAGAAGTGTGTTGAGCTTTTCTTCGAAATTTGCTGAGAATAAGGAAGACTATAACAAGTTTTATGAGGC
CTTCTCAAAGAACCTCAAGCTTGGCATCCACGAGGATCCCAAATAGGTCTAAGTTTGTGTAAGTGTGCGGTACCATTCCACCAAG
AGCGGTGATGAGATGACCAAGTTTAAAGGACTATGTGACCAGAATGAAGGAAGGCCAGAATGATATTTACTACATTACTGGTGAGAGCA
AGAAGGCTGTTGAGAACTCACCTTCTTGAGAACTGAAGAAGAAGGGCTATGAGGTTCTTTACATGGTTGATGCCATTGATGAGTA

TTCAATTGGTCAGCTGAAGGAATTTGAGGGCAAAAAGCTTGTTTCTGCTACCAAGGAAGGTCTCAAGCTTGATGAGAGTGAAGATGAG
AAGAAAAAGCAGGAAGAATTGAAGGAGAAGTTTGAGGGACTGTGCAAGGTCATCAAGGATGTTCTAGGAGACAAGGTTGAGAAGGTGG
TTGTCTCTGACCGTGTGTGGACTCTCCCTGCTGCTTAGTCACTGGGGAGTATGGCTGGACTGCTAATATGGAGAGAATCATGAAGGC
ACAAGCACTTAGGGACTCTAGCATGGCTGGATACATGTCTAGCAAGAAGACCATGGAGATCAACCCAGAGAATGCTATTATGGAAGAG
CTGAGGAAGAGGGCTGATGCAGACAAGAATGACAAGTCTGTGAAGGACTTGGTTCTCTTGCTGTTTGAGACTGCCCTCCTCACCTCAG
GTTTCAGCCTTGAGGAACCTAACACCTTTGGCAACAGAATTCACAGGATGCTGAAGCTTGGGCTGAGCATTGATGATGACTCTGGAGA
TGCAGATGTTGACATGCCGGCTTTGGAGGATCCTGAAGCTGATGCTGAGGGTAGCAAGATGGAGGAAGTTGACTAA