

**STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST**

**TARGETING PROTEIN FOR XKLP2 (AT TPX2 PROTEIN)  
A JEHO LOKALIZACE U MODELOVÉ ROSTLINY *ARABIDOPSIS*  
*THALIANA***

**Anna Soldánová**

**Olomouc 2012**

# STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor SOČ: 04 Biologie

*Targeting protein for Xklp2 (AtTPX2 protein) a jeho lokalizace  
u modelové rostliny Arabidopsis thaliana*

*Targeting protein for Xklp2 (AtTPX2 protein) and its localization in the  
model plant Arabidopsis thaliana*

**Autor:** Anna Soldánová

**Škola:** Gymnázium, Olomouc, Čajkovského 9

**Konzultant:** RNDr. Věra Cenklová, Ph.D.



Ústav experimentální  
botaniky AV ČR, v. v. i.

Olomouc 2012

## **Prohlášení**

*Prohlašuji, že jsem svou práci vypracovala samostatně pod vedením konzultantky a lektorky paní RNDr. Věry Cenklové, Ph.D. pouze za použití literatury uvedené v seznamu a postup při zpracování a dalším nakládání s prací je v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) v platném znění.*

V Olomouci dne .....

podpis:.....

## **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat v první řadě své konzultantce a lektorce paní RNDr. Věře Cenklové, Ph.D. za velké množství času, které mi věnovala, a za velkou trpělivost a ochotnou pomoc nejen při tvorbě této práce, ale i v průběhu celého projektu Otevřená věda II, v jehož rámci práce postupně vznikala a díky kterému jsem měla možnost naučit se něco nového, vyzkoušet si některé vědecké metody v praxi a pracovat na tak důležité problematice s podporou projektu pracoviště (GAČR 204/07/1169). Dále patří mé díky i celému pracovišti Ústavu experimentální botaniky AV ČR, v. v. i., Sokolovská 6, Olomouc.

Děkuji také všem těm, kteří mi během vzniku této práce pomáhali, svému třídnímu profesorovi panu RNDr. Karlu Pudilovi za podporu v mé zálibě k biologii a paní učitelce Mgr. Naděždě Čmelové, která tuto zálibu ve mně probudila.

Rovněž děkuji celé své rodině a všem svým přátelům za poskytnutí opory a neutuchající důvěry v mé schopnosti, zvláště pak babičce Jarmile Soldánové za vytrvalou podporu a porozumění.

Tuto práci bych chtěla věnovat památce dědečka Ervina Soldána.

## ANOTACE

V dnešní době rychlého vědeckého pokroku víme každým dnem víc a víc o dějích v základních stavebních jednotkách živých organismů, v buňkách. Jedním z nejdůležitějších dějů je buněčný cyklus, jehož výsledkem je rozdělení buňky mateřské na dvě buňky dceřiné a kterého se účastní řada různých proteinů a proteinových struktur. Jedním z důležitých proteinů zastávajících klíčovou roli v buněčném cyklu je i TPX2 protein. U živočichů byl TPX2 protein již poměrně dobře popsán, naopak u rostlin se o něm ví méně. Jednou z funkcí TPX2 proteinu je aktivace a transport některých Aurora kináz, což jsou proteiny nezbytné pro tvorbu dělicího vřeténka. Na tomto procesu se rovněž částečně podílejí malé RanGTPázy (RanGTP, RanBP1 a RCC1).

Cílem práce byla příprava transformované buněčné kultury exprimující AtTPX2-GFP a lokalizace AtTPX2 proteinu v průběhu buněčného cyklu, srovnání s distribucí mikrotubulů,  $\gamma$ -tubulinu, AtAurora1 kinázy, RanGTP, RanBP1 a RCC1 v buněčné kultuře pocházející z modelové rostliny huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) a kolokalizační analýza AtTPX2 proteinu s AtAurora1 kinázou. Práce byla prováděna v Laboratoři buněčného cyklu a cytoskeletu rostlin, Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i. v Olomouci, v rámci projektu Otevřená věda II (CZ.1.07/2.3.00/09.0034) a s podporou projektu GAČR 204/07/1169.

Nejprve byla pomocí kokultivace s agrobakterií natransformována a odvozena stabilní buněčná kultura. Následně byla hodnocena exprese AtTPX2-GFP proteinu, prováděna imunodetekce pomocí protilátek a analyzována lokalizace proteinů u živých a fixovaných buněk.

Získané výsledky mohou sloužit k pochopení funkce TPX2 proteinu v buněčném cyklu vyšších rostlin a ke zjištění vzájemných vztahů TPX2 proteinu a dalších vybraných proteinů buněčného cyklu.

Klíčová slova: AtTPX2; *Arabidopsis thaliana*; buněčný cyklus; cytoskelet; mikrotubuly;  $\gamma$ -tubulin; AtAurora1 kináza; RanGTP; RanBP1; RCC1.

## ANNOTATION

Nowadays, in the period of fast scientific progress, we know more and more about processes in the basic structural units of living organisms, cells. One of the most important processes is the cell cycle whose result is the division of mother cell into two daughter cells and in which many different proteins and protein structures are involved. TPX2 protein is one of the important proteins that play a key role in the cell cycle. TPX2 protein has already been described quite well in animals contrary to plants where it is less known. Some of the functions of TPX2 protein are the activation and targeting of Aurora kinases, proteins essential for mitotic spindle assembly. Small RanGTPases (Ran, RanBP1 and RCC1) also partially participate in this process.

The aim of this study was: 1) to prepare transformed cell culture with AtTPX2-GFP expression and localize AtTPX2 protein throughout the cell cycle, 2) to compare the distribution of AtTPX2 protein with microtubules,  $\gamma$ -tubulin, AtAurora1 kinase, RanGTP, RanBP1 and RCC1 in the cell culture derived from *Arabidopsis thaliana* model plant and 3) to investigate colocalization of AtTPX2 protein with AtAurora1 kinase.

The investigation was carried out in the Laboratory of Plant Cytoskeleton and Cell Cycle, Institute of Experimental Botany AS CR, v. v. i. in Olomouc within the frame of the project Otevřená věda II (CZ.1.07/2.3.00/09.0034) and was supported by the GAČR 204/07/1169 project.

At first, we prepared stable cell culture by cocultivation with *Agrobacterium* followed by AtTPX2 protein analysis using immunodetection with antibodies and assessment of proteins' localization *in vivo* and in fixed cells.

The results can be further used to understanding of the function of TPX2 protein in the cell cycle of higher plants and to identifying the mutual relations between TPX2 protein and other proteins involved in the cell cycle.

Key words: AtTPX2; *Arabidopsis thaliana* cell cycle; cytoskeleton; microtubules;  $\gamma$ -tubulin; AtAurora1 kinase; RanGTP; RanBP1; RCC1.

# Obsah

<b>1 Úvod</b> .....	8
<b>2 Současný stav řešené problematiky</b> .....	8
2.1 Cytoskelet.....	8
2.2 Buněčný cyklus .....	11
2.3 Vybrané proteiny důležité pro buněčný cyklus.....	14
<b>3 Cíle práce</b> .....	20
<b>4 Metodika</b> .....	20
4.1 Rostlinný materiál .....	20
4.2 Příprava transformované buněčné kultury .....	21
4.3 Imunodetekce .....	22
4.4 Mikroskopická pozorování a obrazová analýza.....	23
4.5 Kolokalizační analýza .....	24
<b>5 Výsledky</b> .....	24
5.1 Lokalizace AtTPX2 proteinu v živých a fixovaných buňkách <i>Arabidopsis thaliana</i> . .....	24
5.2 Kolokalizace proteinů AtTPX2 a AtAurora1 kinázy v buněčných kulturách <i>Arabidopsis thaliana</i> exprimujících současně AtTPX2-GFP a AtAurora1-RFP.....	26
5.3 Srovnání distribuce AtTPX2 proteinu s lokalizací mikrotubulů a $\gamma$ -tubulinu ve fixovaných buňkách buněčné kultury <i>Arabidopsis thaliana</i> pomocí nepřímé imunodetekce. ....	27
5.4 Srovnání lokalizace AtTPX2 proteinu a malých RanGTPáz (RanGTP, RanBP1 a RCC1) pomocí nepřímé imunodetekce ve fixovaných buňkách buněčné kultury <i>Arabidopsis thaliana</i> . ....	30
5.5 Nadprodukce TPX2-GFP proteinu.....	33
<b>6 Diskuze</b> .....	34
<b>7 Shrnutí</b> .....	35
<b>8 Závěr</b> .....	36
<b>9 Použitá literatura</b> .....	37
<b>10 Seznam obrázků</b> .....	39

## ***Seznam zkratek***

AtAurora1	Aurora1 kináza u <i>Arabidopsis thaliana</i>
AtTPX2	TPX2 protein u <i>Arabidopsis thaliana</i>
BSA	Bowin serum albumin (hovězí sérový albumin)
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindole (barvivo vázající se na DNA)
DIC	Differential interference contrast (diferenciální interferenční kontrast – technika využívající polarizované světlo pro pořizování mikroskopických snímků)
GDP	Guanosine diphosphate (guanosindifosfát)
GEF	Guanine-nucleotide exchange factor (faktor pro výměnu nukleotidu guaninu)
GFP	Green fluorescence protein (zelený fluorescenční protein)
GTP	Guanosine triphosphate (guanosintrifosfát)
MAP	Microtubule associated protein (protein vázající se na mikrotubuly)
MS	Murashige Skoog (médium na kultivaci rostlinných buněk)
MTOC	Microtubule organizing center (centrum organizující mikrotubuly)
MTSB	Microtubule stabilizing buffer (pufr stabilizující mikrotubuly)
OD	Optical density (optická hustota)
PBS	Phosphate buffered saline (pufr z fosfátových solí)
PFA	Paraformaldehyde (paraformaldehyd)
Ran	Ras-related nuclear protein (jaderný protein patřící do skupiny Ras proteinů)
RanBP1	Ran binding protein 1 (Ran vazebný protein 1)
RanGAP1	Ran GTPase activating protein (protein aktivující Ran GTPázy)
Ras proteiny	Related proteins (skupina proteinů schopná přenášet signály uvnitř buněk)
RCC1	Regulator of chromosome condensation 1 (regulátor kondenzace chromozomů 1)
RFP	Red fluorescence protein (červený fluorescenční protein)
TPX2	Targeting protein for Xklp2 (vazebný protein pro Xklp2)
Xklp2	<i>Xenopus</i> plus end-directed kinesin-like protein 2 (k plus konci směřující protein kinesinového typu 2, popsáný u žáby <i>Xenopus laevis</i> – drápatky vodní)
YEB	Yeast extract beef (médium na bakterie obsahující kvasničný a hovězí extrakt)



# 1 Úvod

Targeting protein for Xklp2 (TPX2 protein) úzce souvisí s buněčným cyklem (O'Brien a Wiese, 2006; Vos *et al.*, 2008), což je proces nezbytný pro život organismů. U vyšších rostlin jsou TPX2 protein a jeho funkce charakterizovány jen omezeně (Vos *et al.*, 2008; Evrard *et al.*, 2009). Rozhodli jsme se TPX2 (AtTPX2) protein zkoumat u modelové rostliny huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*). Zaměřili jsme se na lokalizaci AtTPX2 proteinu a její srovnání s lokalizací několika dalších proteinů buněčného cyklu, jako jsou mikrotubuly,  $\gamma$ -tubulin, AtAurora1 kináza a proteiny RanGTPázové dráhy (RanGTP, RanBP1 a RCC1).

## 2 Současný stav řešené problematiky

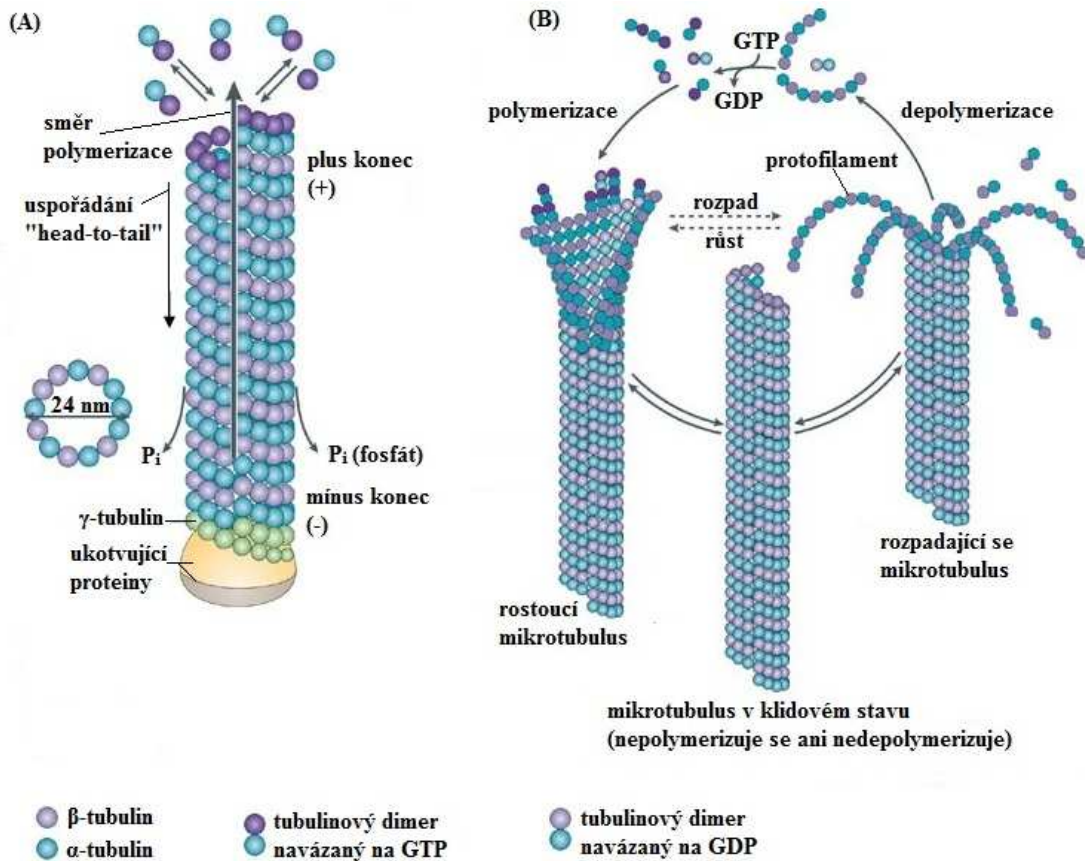
### 2.1 Cytoskelet

Cytoskelet tvoří pevnou a dynamickou oporu buňky. Pomáhá udržovat její tvar, upevňuje jednotlivé orgány na svém místě a v neposlední řadě hraje roli i v transportu makromolekul a dalších struktur v buňce, což je důležité v průběhu celého buněčného cyklu. Cytoskelet tvoří tři základní typy vláken – mikrotubuly, mikrofilamenta a intermediární filamenta, jejichž zastoupení je u živočichů a rostlin různé. Funkci cytoskeletu doplňuje také značné množství dalších proteinů (Alberts *et al.*, 2008).

#### 2.1.1 Mikrotubuly

Mikrotubuly představují dutá vlákna tvořená jednotlivými heterodimery, složenými vždy z jednoho polypeptidu  $\alpha$ -tubulinu a jednoho polypeptidu  $\beta$ -tubulinu a spojenými nekovalentními vazbami.  $\alpha$ - i  $\beta$ -tubulin obsahují vazebné místo pro jednu molekulu GTP, ale jenom na polypeptidu  $\beta$ -tubulinu může docházet k jeho hydrolýze na GDP, což je důležitý faktor hrající roli v uspořádání mikrotubulů (Alberts *et al.*, 2008).

Tubulinové heterodimery se skládají do protofilament. Třináct těchto protofilament utvoří mikrotubulus. Vlákna mikrotubulů jsou orientována od plus (+) k mínus (-) konci (Obrázek 1A). Mínus (-) konec je stabilnější než plus (+) konec. Tato polarita je dána „head-to-tail“ uspořádáním heterodimerů v protofilamentu, jejich orientací stále v jednom směru (Goddard *et al.*, 1994), což určuje směr polymerizace a depolymerizace mikrotubulu (Obrázek 1).



**Obrázek 1:**

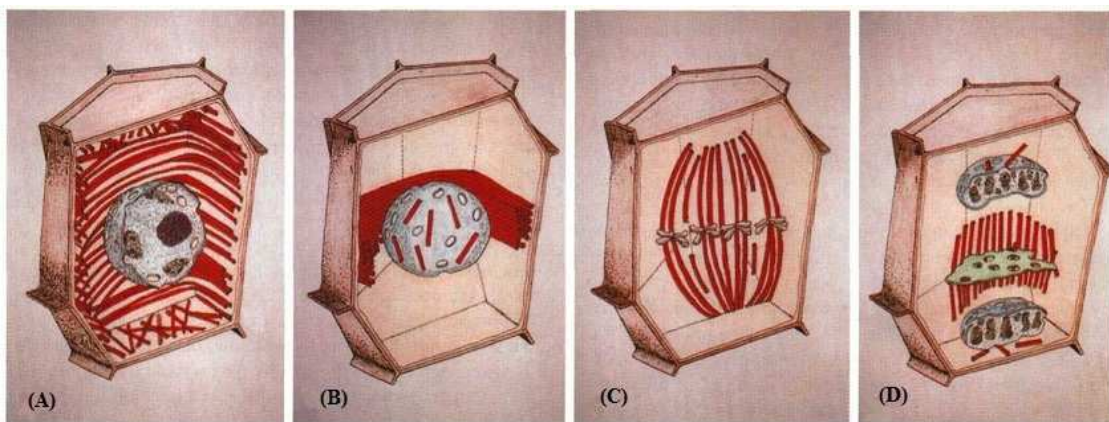
### Uspořádání a dynamika mikrotubulů.

(A) model struktury mikrotubulu – „head-to-tail“ uspořádání heterodimerů v protofilamentu od plus k mínus konci, ukotvení mikrotubulu pomocí  $\gamma$ -tubulinu k proteinu na mikrotubuly organizujícím centru (MTOC); (B) model růstu a rozpadu mikrotubulů – proces polymerizace a depolymerizace mikrotubulů se střídá se stavem klidu, na volných heterodimerech dochází k fosforylaci GDP na GTP.

(upraveno podle Conde and Cáceres, 2009)

Pro mikrotubuly je typická dynamická nestabilita, kdy mikrotubulus rychle přechází z fáze růstu do fáze depolymerizace a rozpadu a naopak (Obrázek 1B). Daný jev je ovlivněn hydrolyzou GTP na GDP na podjednotce  $\beta$ -tubulinu. Pokud konec mikrotubulu tvoří heterodimery s GTP na  $\beta$ -tubulinu, vzniká GTP čepička, která podporuje přidávání dalších dimerů, a tak mikrotubulus roste. Naopak, jestliže je GTP hydrolyzováno na GDP, mikrotubulus se depolymerizuje a rozpadá (Alberts *et al.*, 2008).

Mikrotubuly mají význam pro udržování vnitřní morfologie buňky a pro zachování vnějšího tvaru buňky (Goddard *et al.*, 1994). Uspořádání mikrotubulů se dynamicky mění v průběhu celého buněčného cyklu. Mikrotubuly u rostlin tvoří kortikální mikrotubuly v průběhu interfáze (Obrázek 2A), během profáze se tvoří předprofázní svazek mikrotubulů a perinukleární mikrotubuly v těsné blízkosti chromatinu (Obrázek 2B), v průběhu metafáze a anafáze mikrotubuly organizují dělicí vřetenko (Obrázek 2C) a v telofázi formují fragmoplast podílející se na tvorbě nové buněčné přepážky (Obrázek 2D) – (Goddard *et al.*, 1994).



■ mikrotubuly; □ jádro, chromatin; □ nově vznikající buněčná přepážka

**Obrázek 2:**

**Schematické znázornění organizace mikrotubulů v průběhu buněčného cyklu rostlinné buňky.**

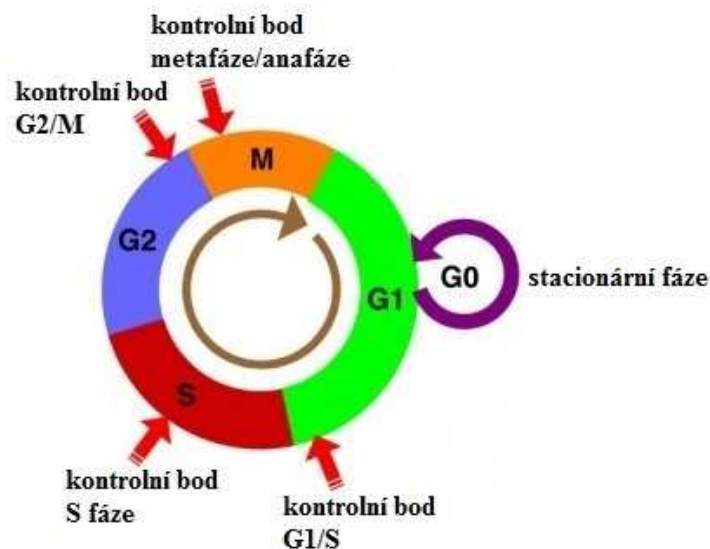
(A) interfáze – kortikální mikrotubuly; (B) profáze – předprofázní svazek mikrotubulů a perinukleární mikrotubuly; (C) metafáze – mikrotubuly dělicího vřetenka, chromozomy seřazené v ekvatoriální rovině; (D) telofáze – mikrotubuly fragmoplastu podílející se na vzniku buněčné přepážky, nově vznikající jádra budoucích dceřiných buněk.

(upraveno podle Goddard *et al.*, 1994)

## 2.2 Buněčný cyklus

Buněčný cyklus je proces, který slouží k rozdělení mateřské buňky na dvě buňky dceřiné se shodnou genetickou informací. Tento proces provází všechny živé buňky. Dělením se počet buněk exponenciálně zvyšuje až do doby, kdy buňky dostanou signál k diferenciaci, přestanou se dělit a z G1 fáze přejdou do stacionární G0 fáze buněčného cyklu (Obrázek 3). Diferencují se a dokončují vývoj rostlinných pletiv a orgánů. V této dormantní G0 fázi setrvává většina buněk po zbytek života organismu, ale v případě potřeby (např. při patologickém či fyziologickém poškození, či dalším vývoji organismu) se mohou některé buňky vrátit zpět do aktivního buněčného cyklu a začít se znovu dělit, tj. přejít znovu z G0 do G1 fáze buněčného cyklu. Tato vlastnost, regenerace a růst, jsou základní podmínky existence všech živých organismů.

Buněčný cyklus se dělí na část interfázni (G1, S a G2 fáze buněčného cyklu), mitotickou (mitózu a cytokinezi) a postmitotickou (G0 stacionární fázi buněčného cyklu) – (Obrázek 3).



**Obrázek 3:**

### **Schéma průběhu buněčného cyklu.**

Časové znázornění jednotlivých fází buněčného cyklu, časový poměr G1, G0, S, G2 fází a M (mitotické) fáze, včetně přibližného umístění kontrolních bodů buněčného cyklu (červené šipky).

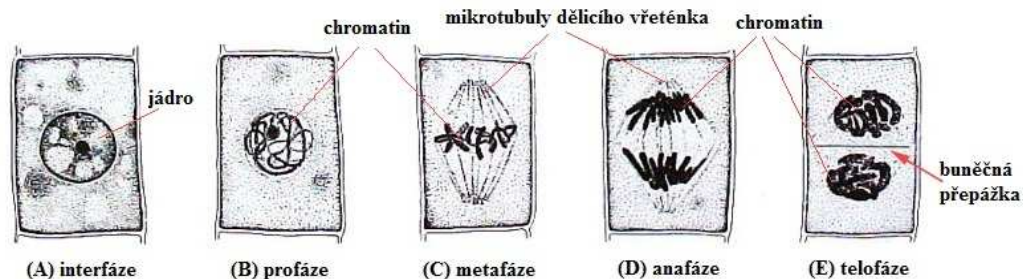
(upraveno podle <http://homepage.mac.com/enognog/checkpoint.htm>)

V G1 fázi buňka roste a zvětšuje svůj objem, dochází ke kontrole a opravám DNA, zvýšené biosyntéze, buňka se zvětšuje a připravuje se na vstup do S fáze tvorbou nových nukleotidů. Název G1 pochází s anglického gap (= mezera, pauza) nebo také growth (= růst). Poté buňka přechází do S (syntetické) fáze, ve které se replikuje jaderná DNA, dochází ke zdvojení chromozomů tvořených sesterskými chromatidami a syntetizují se specifické proteiny asociující s DNA (histony). Následná G2 fáze, kdy buňka opět roste, předchází samotné mitóze. V G2 fázi buněčného cyklu je syntetizováno velké množství proteinů, které jsou potřebné pro mitózu. Zdvojnásobuje se počet organel a nukleují se další mikrotubuly. V závěru této fáze se formuje předprofázní svazek mikrotubulů (Morgan, 2007; Alberts *et al.*, 2008).

Buněčný cyklus je komplexně regulován mnoha mechanismy. V jeho průběhu buňka prochází několika kontrolními body (Obrázek 3), které kontrolují správný průběh procesů před vstupem do další fáze buněčného cyklu. Zakládají se na různých signalizačních proteinových drahách, ale mnohé z těchto procesů nejsou dosud objasněny. Jedním z kontrolních bodů je G1 před vstupem do S fáze, další pozorujeme po replikaci DNA v S fázi, následuje kontrolní bod v G2 fázi před vstupem do mitózy a další významný kontrolní bod je při přechodu z metafáze do anafáze (Morgan, 2007; Alberts *et al.*, 2008).

### 2.2.1 Mitotická fáze (M fáze)

Mitóza se dělí na několik fází – profázi, metafázi, anafázi a telofázi a nakonec dochází k cytokinezi, kdy se mateřská buňka kompletně rozdělí (Obrázek 4).



**Obrázek 4:**

#### **Schéma jednotlivých fází mitózy.**

(A) interfáze – jádro; (B) profáze – z kondenzovaný chromatin; (C) metafáze – chromozomy seřazené v ekvatoriální rovině a napojené na mikrotubuly dělicího vřeténka; (D) anafáze – mikrotubuly dělicího vřeténka, chromatin tažený dělicím vřeténkem k opačným pólům buňky; (E) telofáze – dekonduující se chromatin u opačných pólů buňky formující nová jádra budoucích dceřiných buněk a nově vznikající buněčná přepážka.

(upraveno podle <http://waynesword.palomar.edu/lmexer2.htm>)

V profázi dochází ke kondenzaci chromatinu do chromozomů a rozpadu jaderné membrány (Obrázek 4B). Dokončuje se tvorba předprofázního svazku mikrotubulů, který značí rovinu budoucího buněčného dělení, a začíná vznikat základ pro budoucí dělicí vřeténko (Obrázek 2B). V závěru profáze předprofázní svazek zaniká. V metafázi je chromatin plně z kondenzován do chromozomů tvořených dvěma sesterskými chromatidami, které jsou uspořádány v ekvatoriální rovině buňky (Obrázek 2C, 4C), dělicí vřeténko je již plně vytvořeno, jeho kinetochorové mikrotubuly jsou napojeny na kinetochory (proteinový komplex na centromere chromozomu) jednotlivých chromatid. U vyšších rostlin je dělicí vřeténko na rozdíl od živočichů acentrozomální. V oblasti jeho pólů se nacházejí disperzní MTOC (centra pro organizaci mikrotubulů), jejichž součástí je protein  $\gamma$ -tubulin, který se zde podílí na nukleaci mikrotubulů dělicího

vřeténka (Binarová *et al.*, 2006). Kinetochorové mikrotubuly táhnou jednotlivé chromatidy k opačným pólům buňky a interpolární mikrotubuly spojují oba póly buňky. V anafázi se kinetochorové mikrotubuly zkracují, naopak interpolární mikrotubuly se prodlužují, tím dochází ke zvětšování dělicího vřeténka a přesunu sesterských chromatid k opačným pólům buňky (Obrázek 4D). Během telofáze se chromatin dekondenzuje, dělicí vřeténko zaniká, formují se nová buněčná jádra a v oblasti ekvatoriální roviny buňky se začíná formovat mikrotubulární struktura typická pro rostliny – fragmoplast (Obrázek 2D). Fragmoplast slouží k transportu váčků a dalšího materiálu potřebného pro tvorbu buněčné přepážky, centrifugálně se rozšiřuje souběžně s vytvářením buněčné přepážky, která od sebe oddělí obě buňky dceřiné, dochází k cytokinezi (Obrázek 2D, 4E) – (Morgan, 2007; Alberts *et al.*, 2008).

## 2.3 Vybrané proteiny důležité pro buněčný cyklus

Buněčný cyklus je komplexní proces, kterého se účastní i řada dalších proteinů. Zaměřili jsme se na studium následujících z nich:

### 2.3.1 $\gamma$ -Tubulin

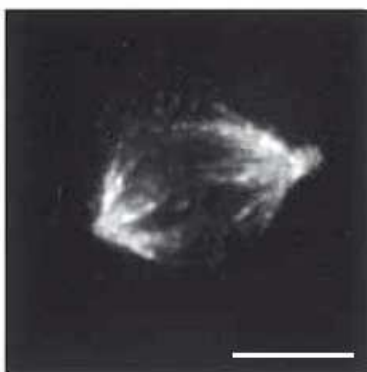
$\gamma$ -Tubulin je protein charakteristický pro živočišná centra organizace mikrotubulů (MTOC), je nezbytný pro nukleaci mikrotubulů, v rostlinných buňkách je lokalizován podél všech mikrotubulů, kde interaguje s  $\alpha$ - a  $\beta$ - podjednotkami tubulinu (heterodimery).  $\gamma$ -Tubulin tvoří velké  $\gamma$ -tubulinové komplexy podobné živočišným  $\gamma$ -tubulin ring komplexům, které se váží s membránami (Dibbayawan *et al.*, 2001; Dryková *et al.* 2003; Binarová *et al.*, 2006).



### 2.3.2 TPX2

TPX2 protein (Targeting protein for Xenopus plus end-directed kinesin-like protein 2) byl poprvé popsán jako transportér proteinu Xklp2 k mínus koncům mikrotubulů dělicího vřeténka (Wittmann *et al.*, 1998). V neaktivní formě je součástí komplexu s importinem  $\alpha$  a  $\beta$ , odkud je uvolněn a aktivován pomocí RanGTP (Gruss and Vernos, 2004). V současné době je na rozdíl od rostlin TPX2 protein dobře prostudován v živočišné říši.

Důležitými funkcemi TPX2 u živočichů jsou jeho účast na nukleaci mikrotubulů okolo chromozomů a u kinetochorů v závislosti na koncentraci RanGTP (Wittmann *et al.*, 2000; Gruss *et al.*, 2001) a aktivace Aurora A kinázy a její přenos k mikrotubulům dělicího vřeténka. Zároveň je protein TPX2 Aurorou A fosforylován (Kufer *et al.*, 2002; Bayliss *et al.*, 2003). V interfázi TPX2 lokalizuje v jádře a během mitózy se váže k mikrotubulům dělicího vřeténka (Obrázek 5), ne však k mikrotubulům astrálním (Karsenti and Vernos, 2001; Gruss and Vernos, 2004). Ke konci anafáze se přesouvá do ekvatoriální roviny, kde je rychle odbourán (Stewart and Fang, 2005). TPX2 byl dříve také považován za důležitý protein účastnící se na znovu vystavění jaderné membrány v závěru mitózy (O'Brien and Wiese, 2006).



**Obrázek 5:**

**Lokalizace TPX2 proteinu u živočichů.**

Lokalizace TPX2 proteinu na mikrotubulech anafázního dělicího vřeténka u HeLa buněk značená specifickou protilátkou. Měřítka = 10  $\mu$ m.

(upraveno podle Kufer *et al.*, 2002)

Na základě studia genomů v genomových databázích bylo zjištěno, že homologa k TPX2 proteinu postrádají skupiny hub, hmyzu a červců. Tyto organismy pravděpodobně vůbec nemají gen pro produkci TPX2 proteinu (Vos *et al.*, 2008).



V rostlinných buňkách TPX2 protein interaguje s Aurora kinázami 1 a 2, ne však s Aurora3 (Evrard *et al.*, 2009). Během mitózy je TPX2 protein lokalizován s mikrotubuly vřeténka, je potřebný pro jejich nukleaci a pro nukleaci perinukleárních mikrotubulů. V průběhu anafáze příliš neinteraguje s mikrotubuly ve střední části vřeténka a nachází se převážně na zkracujících se kinetochorových mikrotubulech (Vos *et al.* 2008). Protože v pozdní anafázi až rané telofázi TPX2 protein mizí, předpokládá se, že nesouvisí s tvorbou fragmoplastu ani opětovným vystavěním jaderné membrány, či s uspořádáním kortikálních mikrotubulů (Vos *et al.*, 2008), což částečně vyvrací předchozí předpoklady O'Brien a Wiese (2006).

### 2.3.3 Aurora kinázy

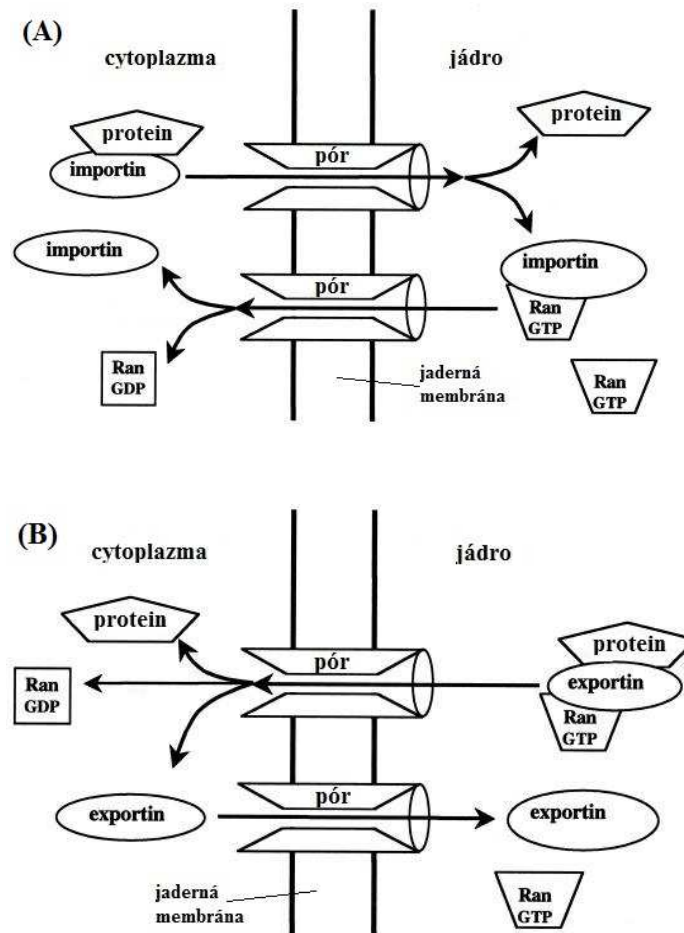
Aurora kinázy patří do rodiny serin-threoninových proteinových kináz. U živočichů byly popsány tři typy – AuroraA, B a C. Jejich výskyt se však liší mezi jednotlivými druhy. AuroraA je onkogenní kináza nezbytná pro uspořádání mitotického vřeténka. Částečně se účastní dozrávání centrozomů (Glover *et al.*, 1995). Je aktivována proteinem TPX2, který ji transportuje k pólům vřeténka. AuroraA fosforyluje TPX2 a zabraňuje jeho zpětné defosforylaci (Bayliss *et al.*, 2003) a aktivuje tak nukleaci mikrotubulů z centrozomů (Ducat and Zhang, 2004). Funkce proteinu AuroraB spočívá především v regulaci uspořádání dělicího vřeténka a interakci mezi kinetochory a mikrotubuly. AuroraB kináza je lokalizována na vnitřních centriolách a v oblasti kinetochorů až do anafáze, nachází se i na ramenech chromozomů (Wang *et al.*, 2011). AuroraB kináza není aktivována TPX2 (Bayliss *et al.*, 2003). AuroraC je naopak omezena na buňky dělící se meioticky – spermatocyty (Tang *et al.*, 2006) a oocyty (Yang *et al.*, 2010), kde je lokalizována na centromerách a později ve střední části dělicího vřeténka (Tang *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2010).

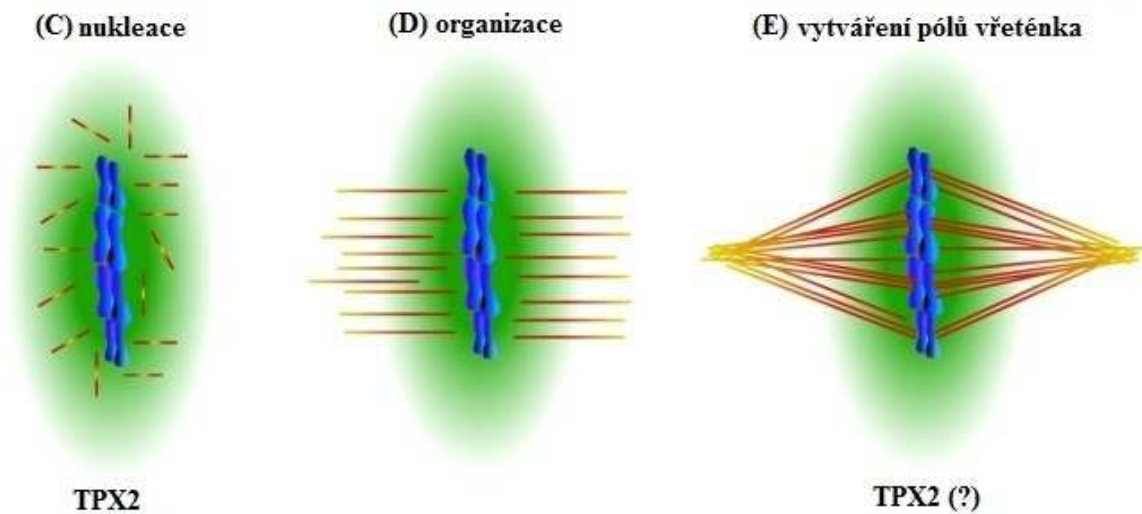
U rostlin jsou známy tři Aurora kinázy – Aurora1, 2 a 3. Aurora1 a 2 se během interfáze nacházejí v jádře, především na jaderné membráně, v profázi slabě dekorují předprofázní svazek a perinukleární mikrotubuly. V metafázi jsou rostlinné Aurora kinázy 1 a 2 lokalizovány na mikrotubulech dělicího vřeténka a později v anafázi okolo chromatinu. V telofázi Aurora1 vykazuje především signál na vznikající buněčné přepážce (Kawabe *et al.*, 2005). Protein Aurora2 kináza vznikl pravděpodobně genovou duplikací Aurora1, sekvence jejich aminokyselin je z 95% identická (Kawabe *et al.*, 2005), což potvrzuje obdobná lokalizace a funkce obou proteinů v průběhu buněčného

cyklu. Oba proteiny Aurora1 i 2 interagují s TPX2 (Evrard *et al.*, 2009). Aurora3 je v interfázi v cytoplazmě okolo jádra a během mitózy kolokalizuje s chromozomy (Kawabe *et al.*, 2005). Na rozdíl od Aurora1 a 2, Aurora3 kináza neinteraguje s TPX2 (Evrard *et al.*, 2009).

### 2.3.4 RanGTPázy

Malé RanGTPázy jsou proteiny, které patří do rodiny Ras proteinů (proteinů schopných přenášet signály uvnitř buněk). Malé RanGTPázy jsou známy především v souvislosti s transportem mezi jádrem a cytoplazmou (Obrázek 6A – B) – (Macara, 2001; Joseph, 2006), ale hrají důležitou roli také při nukleaci a organizaci mikrotubulů, tvorbě dělicího vřeténka a organizaci jeho regulačních faktorů (Obrázek 6C – D) – (Clarke and Zhang, 2008) a formování nové jaderné membrány (Joseph, 2006). Patří sem například tyto proteiny: Ran, RanBP1, RCC1 a RanGAP1.





■ gradient RanGTP od vysoké koncentrace RanGTP okolo chromatinu ■, po nízkou koncentraci RanGTP a vysokou koncentraci RanGDP □ v oblasti cytoplazmy; ■ mikrotubuly

Obrázek 6:

**Schéma funkce RanGTP gradientu při transportu proteinů mezi jádrem a cytoplazmou, při nukleaci a organizaci mikrotubulů a při formování dělicího vřeténka v blízkosti chromatinu za spoluúčasti TPX2 proteinu.**

(A) jaderný import – komplex importinů a přenášeného proteinu putuje jaderným pórem do jádra, kde se pod vlivem RanGTP rozpadá a uvolňuje přenášený protein; (B) jaderný export – exportinový komplex s přenášeným proteinem a RanGTP prochází přes jaderný pór do cytoplazmy, defosforylací RanGTP se uvolní přenášený protein; (C) nukleace mikrotubulů okolo chromatinu probíhá za přítomnosti TPX2 proteinu v blízkosti chromatinu, kde převažuje RanGTP; (D) organizace mikrotubulů dělicího vřeténka nastává v blízkosti chromatinu, v oblasti zvýšené koncentrace RanGTP; (E) formování dělicího vřeténka bez MTOC pomocí zaostřování pólů probíhá ve spolupráci s RanGTP/GDP gradientem a podílí se na něm pravděpodobně i TPX2 protein.

(upraveno podle Macara, 2001; Gruss and Vernos, 2004)

Transport mezi jádrem a cytoplazmou (Obrázek 6A) probíhá díky gradientu RanGTP/GDP, kdy Ran (Ras-related nuclear protein) protein v cytoplazmě převažuje v defosforylované formě RanGDP a v jádře jako fosforylovaný RanGTP. K defosforylaci RanGTP v cytoplazmě dochází za spolupůsobení proteinů RanGAP1

(protein aktivující RanGTPázy) a RanBP1 (Ran binding protein 1), čímž se Ran uvolňuje z importinu  $\beta$ , a tak importin  $\beta$  aktivuje k vytváření importinového komplexu tvořeného hlavně importiny  $\alpha$  a  $\beta$  a přenášeným proteinem. Dojde k zahájení přenosu proteinu přes jadernou membránu, importu proteinu jaderným pórem dovnitř jádra. V jádře se na importin  $\beta$  naváže RanGTP, čímž se celý importinový komplex s přenášeným proteinem stane nestabilním a rozpadne se na jednotlivé složky, a tak dojde k uvolnění přenášeného proteinu (Bischoff *et al.*, 1995; Macara, 2001; Yudin and Fainzilber, 2009).

Obdobně probíhá export proteinů z jádra do cytoplazmy (Obrázek 6B). K fosforylaci RanGDP v jádře dochází v blízkosti chromatinu pomocí RCC1 proteinu (Regulator of chromosome condensation 1), který slouží jako GEF (Guanine-nucleotide exchange factor) pro Ran a váže se na chromatin. Transportovaný protein se uvnitř jádra naváže na exportinový komplex, který je stabilizován RanGTP. Celý komplex prochází přes jaderný pór do cytoplazmy. V cytoplazmě dochází k defosforylaci RanGTP na RanGDP, komplex se tak destabilizuje a rozpadne se na jednotlivé složky, čímž se přenášený protein uvolní do cytoplazmy (Yudin and Fainzilber, 2009, Gruss and Vernoss, 2004).

Tvorba dělicího vřeténka, nukleace a organizace mikrotubulů využívá podobného principu regulace na základě fosforylací a defosforylací Ran proteinu. Na některých z těchto procesů se podílí i TPX2 protein (Obrázek 6C – 6E), který se váže na mikrotubuly (Vos *et al.* 2008) a napomáhá tvorbě svazků mikrotubulů (Schatz *et al.*, 2003).

Živočišný TPX2 protein je nezbytný pro buněčný cyklus, aktivuje Aurora kinázy a z oblasti studia živočichů je známý podobnou lokalizací jako mikrotubulární proteiny a  $\gamma$ -tubulin, proto jsme se rozhodli studovat tento u rostlin málo známý protein v buněčné kultuře *Arabidopsis*.

### 3 Cíle práce

Předmětem studia této práce byl aktivátor Aurora kináz AtTPX2 protein. Cílem práce bylo natransformovat buněčnou kulturu pocházející z modelové rostliny huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*), připravit GFP fúzi AtTPX2 proteinu, sledovat expresi tohoto proteinu v průběhu buněčného cyklu u živých buněk a ověřit lokalizaci AtTPX2 proteinu u fixovaných buněk s využitím specifických antiGFP protilátek poskytnutých školitelským pracovištěm. Dalším cílem bylo srovnat distribuci AtTPX2 proteinu s lokalizací několika dalších proteinů buněčného cyklu jako s mikrotubuly,  $\gamma$ -tubulinem, AtAurora1 kinázou a s proteiny RanGTPázové dráhy (RanGTP, RanBP1 a RCC1) a provést srovnání lokalizace AtTPX2 proteinu s AtAurora1 kinázou pomocí kolokalizační analýzy. Pro získání výsledků byly použity techniky buněčné a molekulární biologie a imunodetekce. Na školitelském pracovišti byly poskytnuty některé vhodné transformované buněčné kultury a protilátky a veškeré chemikálie a vybavení nezbytné pro dosažení těchto cílů.

Práce byla prováděna v Laboratoři buněčného cyklu a cytoskeletu rostlin na Ústavu experimentální botaniky AV ČR, v. v. i. v Olomouci a byla podporována projekty: Otevřená Věda II (CZ.1.07/2.3.00/09.0034) a grantem (GAČR 204/07/1169). Veškeré potřebné chemikálie a zařízení mi byly poskytnuty na školitelském pracovišti.

### 4 Metodika

#### 4.1 Rostlinný materiál

Použili jsme transformované buněčné kultury huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) kultivované při teplotě 23 ° – 25 °C se světelným režimem 10 h světlo, 14 h tma. Buněčné kultury *Arabidopsis* (ekotyp *Columbia*) a transformované buněčné kultury s příslušnou jednoduchou či dvojitou expresí GFP/RFP vybraných proteinů se udržovaly pravidelnou pasáží jedenkrát týdně v klasickém živném médiu MS (Murashige and Skoog, 1962), případně s přidanými selektivními antibiotiky kanamycinem (50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), hygromycinem (50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ).

## 4.2 Příprava transformované buněčné kultury

Připravili jsme stabilní expresi AtTPX2-GFP v buněčné kultuře *Arabidopsis thaliana* ekotypu *Columbia* podle protokolu Mathur *et al.* (1998). Použili jsme N-koncovou GFP-fúzi Gateway binárního vektoru pK7WGF2,0 pro AtTPX2 protein (Karimi *et al.*, 2002) zaklonovanou do bakterie *Agrobacterium tumefaciens*, která byla připravena na školitelském pracovišti a skladována ve formě „konzervy“ (bakterií dlouhodobě uchovávaných v glycerolu v -80 °C).

Nejprve jsme připravili „malý objem“ pro prvotní aktivaci agrobakterií. Do 4 ml média YEB (0,05% (w/v) MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O, 0,5% (w/v) hovězí extrakt, 0,5% (w/v) pepton, 0,5% (w/v) sacharóza, 0,1% (w/v) kvasinkový autolyzát, pH 7,2) bylo přidáno 25 µl bakteriální kultury z „konzervy“ a selekční antibiotika (rifampicin, 25 µg.ml<sup>-1</sup>; gentamycin, 50 µg.ml<sup>-1</sup>; spectinomycin, 100 µg.ml<sup>-1</sup>). Takto připravenou kulturu jsme nechali kultivovat na třepače přes noc (16h) při 28 °C/225 rpm.

Následně byl připraven „velký objem“, který slouží pro vlastní přípravu bakterií pro transformace buněčné kultury. Do 20 ml média YEB byla přidána selektivní antibiotika: (rifampicin 25 µg.ml<sup>-1</sup>, gentamycin 50 µg.ml<sup>-1</sup> spectinomycin 100 µg.ml<sup>-1</sup>) a 150 µl bakteriální kultury z malého objemu. Bakteriální kultura se nechala růst několik hodin na třepače ve tmě při 28 °C/225 rpm. Pravidelně byly sledovány hodnoty OD na spektrometru, a když OD velkého objemu dosáhlo hodnot mezi 0,6 až 0,8, stočením (10 min 4500 rpm/20 °C) jsme získali pelet bakterií, který byl roztřepán a ponechán 1 h stacionárně v 0,5 ml média na buněčné kultury při pokojové teplotě. Bakteriální kulturu jsme poté přidali do 10 ml připravené buněčné kultury *Arabidopsis (Columbia)* a přidali jsme 100 µM acetosyringonu, který narušuje buněčné stěny rostlinných buněk a umožňuje agrobakteriím snadněji napadnout rostlinné buňky.

Z malého objemu byly rovněž připraveny Petriho misky s kulturami agrobakterií kultivovanými na pevném médiu, které byly použity na transformaci podle metody Koroleva *et al.* (2005).

Z malého objemu jsme odebrali 150 µl bakteriální kultury, kterou jsme rozetřeli na Petriho misky s pevným YEB médiem (YEB medium s přídávkem 1,5% (w/v) agaru), a ve 28 °C jsme přes noc (16 h) nechali narůst kolonie agrobakterií. Do baňky s rostlinnou buněčnou kulturou připravenou pro transformaci (7 ml) jsme přidali několik

kolonií agrobakterií z kultury na Petriho misce a 100  $\mu\text{M}$  acetosyringonu. Buněčná kultura byla poté kultivována 72 h ve 24 °C ve tmě.

Kokultivace agrobakterií a rostlinných buněk vedla k zakalení, což bylo první známkou možné pozitivní transformace. Zakalená buněčná kultura s agrobakteriemi byla nejprve zkontrolována pod mikroskopem, zda se buňky dobře dělí, jsou stále životaschopné a hlavně, zda se objevily aspoň některé buňky s AtTPX2-GFP signálem. Zakalenou suspenzi jsme zbavili většiny agrobakterií pomocí opakovaného promývání buněčné kultury kultivačním médiem. Buňky jsme nechali usadit ve zkumavce ve 25 ml kultivačního média a médium jsme odsáli. Tento proces jsme opakovali během jednoho promývání celkem 3x. Promývání suspenzí bylo prováděno každý druhý až třetí den, podle množství agrobakterií, což jsme vždy kontrolovali na odebraném vzorku pod mikroskopem. Pokud se v buněčné kultuře objevilo větší množství buněk s AtTPX2-GFP signálem, po promytí jsme do kultivačního media začali přidávat claforan (100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), který eliminoval množství agrobakterií v suspenzi, a antibiotikum kanamycin (50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), které bránilo dělení buněk, u nichž transformace neproběhla. Po několika cyklech promývání jsme přešli na pravidelnou pasáž této suspenze, ale doplněnou přídatkem claforanu a kanamycinu stejné koncentrace jako při promývání. Jakmile se v transformované buněčné kultuře přestala vyskytovat agrobakteria a převážily buňky s AtTPX2-GFP signálem, do kultivačního media se přestal přidávat claforan a takto odvozená stabilní transformovaná buněčná kultura byla nadále udržována pouze klasickou pasáží s přídatkem selekčního antibiotika kanamycinu (50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) za běžného světelného režimu pro buněčné kultury.

Pro pozorování a srovnání AtTPX2 proteinu s AtAurora1 kinázou byly použity dvojité transformované buněčné kultury exprimující současně AtTPX2-GFP a AtAurora1-RFP nebo AtTPX2-RFP a AtAurora1-GFP v buňkách *Arabidopsis thaliana* připravené na školitelském pracovišti ÚEB AV ČR, v. v. i. v Olomouci.

### 4.3 Imunodetekce

Pro fluorescenční značení konkrétních proteinů pomocí protilátek byla použita metoda nepřímé imunodetekce upravená podle Dryková *et al.* (2003): buňky byly fixovány

45 minut ve 3,7% paraformaldehydu (PFA) v MTSB pufru s 0,4 M manitolem při pokojové teplotě. Po promytí v pufru MTSB byly buňky opracovány enzymem (0,5% celulóza, 1% driseláza a 0,025% pectolyáza v MTSB) 20 minut při 32°C, po promytí se buňky přenesly na předem připravená podložní skla pokrytá poly-L-lysinem. Buňky jsme nechali přisednout na skla 25 minut ve vlhké komůrce za pokojové teploty a postfixovali jsme je 10 minut 100% methanolem při -20 °C. Po oplachu v pufru PBS byly buňky promývány 5 minut ve 100 mM roztoku chloridu amonného v PBS pufru za pokojové teploty. Po 10 minutovém blokování 3% BSA v MTSB jsme na vzorky aplikovali primární protilátky – anti GFP (myší, 1:1000 – Roche), anti GFP (králičí, 1:3000 – Abcam), anti  $\alpha$ -tubulin (1:500 – Sigma-Aldrich), anti  $\gamma$ -tubulin (AthTU, 1:1000 – Drykova *et al.*, 2003), anti TU32 (1:10 – ExBio), anti RanGTP (1:1000), anti RanBP1 (1:1000) a anti RCC1 (1:500 – Transduction Laboratories). Skla s buňkami zůstala přes noc ve vlhké komůrce ve 4 °C, následně se podpořilo navázání protilátek zahřátím při 32 °C po dobu 60 minut. Buňky byly promyty puftrem PBS a blokovány 3% BSA v MTSB 15 minut za pokojové teploty. Na skla byly aplikovány sekundární protilátky: FITC (1:50), Cy3 (1:400), DyLight 488 (1:250) a DyLight 549 (1:250) – (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Po 1 hodině ve vlhké komůrce při 32 °C jsme buňky promyli v PBS, obarvili jsme chromatin pomocí DAPI (0,01  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), znovu promyli PBS puftrem a skla jsme uzavřeli do uzavíracího média Mowiol.

#### 4.4 Mikroskopická pozorování a obrazová analýza

Materiál byl zkoumán a vyhodnocován mikroskopem firmy Olympus (model IX81, motorizovaný invertovaný výzkumný mikroskop) s použitím specifických filtrů pro příslušné fluorochromy, digitální monochromatické kamery CCD (CCD-ORCA/ER) a Micro Image Olympus optického softwaru. Získané snímky byly poté zpracovány a upraveny v programech CellR, CellD a Adobe Photoshop 7.0 CE.



## 4.5 Kolokalizační analýza

Kolokalizace proteinů, která byla hodnocena pomocí Pearsonova koeficientu, byla provedena v programu NIH Image J doplněném o části nezbytné pro kolokalizace – Colocalization Finders (<http://rsbweb.nih.gov/ij/plugins>, Nakamura *et al.*, 2007).

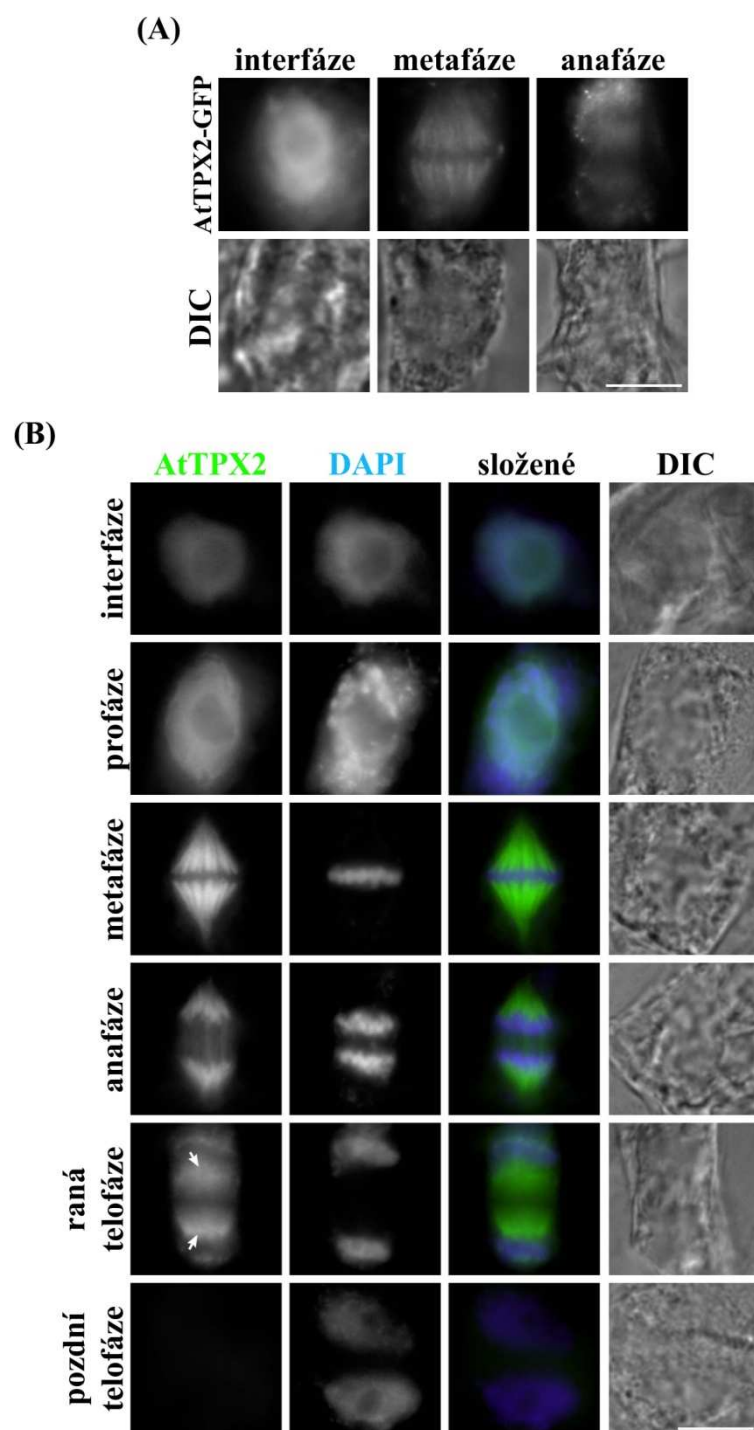
Pearsonův koeficient vyjadřuje korelaci dvou proteinů. Jeho hodnota se pohybuje od -1 do 1, přičemž čím je číslo bližší 1, tím více proteiny spolu korelují a tím je stupeň kolokalizace vyšší.

## 5 Výsledky

### 5.1 Lokalizace AtTPX2 proteinu v živých a fixovaných buňkách *Arabidopsis thaliana*.

AtTPX2 protein byl lokalizován v živých buňkách buněčné kultury *Arabidopsis thaliana* exprimujících AtTPX2-GFP v průběhu buněčného cyklu (Obrázek 7A). AtTPX2 protein byl v interfázi v jádře (Obrázek 7A). V profázi po rozpadu jaderné membrány se AtTPX2 protein nacházel v oblasti chromatinu. Od metafáze po anafázi dekoroval AtTPX2 protein mikrotubuly mitotického vřeténka (Obrázek 7A), v pozdní anafázi se AtTPX2 protein začal vytrácet a během telofáze zcela vymizel.

Podobně byl AtTPX2 protein lokalizován v průběhu buněčného cyklu u fixovaných buněk buněčných kultur *Arabidopsis thaliana* (Obrázek 7B). Během interfáze byl AtTPX2 protein soustředěn v jádře (Obrázek 7B), po rozpadu jaderné membrány v profázi zůstal v oblasti chromatinu (Obrázek 7B). AtTPX2 byl lokalizován na mikrotubulech metafázního a anafázního dělicího vřeténka až do pozdní anafáze (Obrázek 7B). V rané telofázi byl AtTPX2 protein pozorovatelný na distální části fragmoplastu (Obrázek 7B, šipky) a v těsné blízkosti chromatinu a v průběhu pozdní telofáze AtTPX2 zcela degradoval (Obrázek 7B).



Obrázek 7:

**Lokalizace AtTPX2 proteinu v živých a fixovaných buňkách buněčné kultury *Arabidopsis thaliana*.**

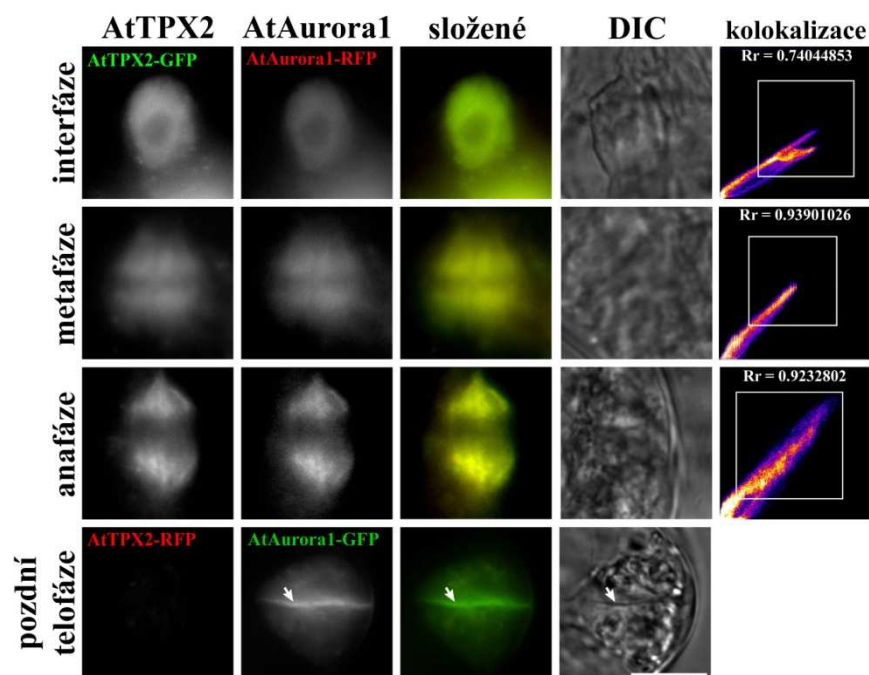
(A) interfáze – AtTPX2 v jádře; metafáze – AtTPX2 na kinetochorových mikrotubulech dělicího vřeténka, anafáze – AtTPX2 na mikrotubulech dělicího vřeténka v blízkosti chromatinu; (B) interfáze – AtTPX2 protein v jádře; profáze – AtTPX2 v oblasti

kondenzujícího se chromatinu; metafáze – AtTPX2 na kinetochorových mikrotubulech dělicího vřeténka, chromozomy jsou uspořádány v ekvatoriální rovině; anafáze – AtTPX2 na kinetochorových mikrotubulech dělicího vřeténka, které táhnou jednotlivé chromatidy k opačným pólům buňky, a na interpolárních mikrotubulech; raná telofáze – AtTPX2 se přesunul do oblasti distální části fragmoplastu a do těsné blízkosti chromatinu, chromatin se dekonduzuje; pozdní telofáze – AtTPX2 je zcela degradován, dokončuje se formování nových jader. Měřítko = 10  $\mu$ m.

## 5.2 Kolokalizace proteinů AtTPX2 a AtAurora1 kinázy v buněčných kulturách *Arabidopsis thaliana* exprimujících současně AtTPX2-GFP a AtAurora1-RFP.

Studovali jsme možnou společnou lokalizaci AtTPX2 a AtAurora1 kinázy v průběhu buněčného cyklu. V interfázi byly oba proteiny v jádře (Obrázek 8). Po zformování dělicího aparátu buněk AtAurora1 kináza i AtTPX2 protein byly pozorovatelné na mikrotubulech dělicího vřeténka od metafáze až po anafázi (Obrázek 8). V pozdní telofázi AtTPX2 protein zcela vymizel, zatímco AtAurora1 kináza přešla do ekvatoriální roviny a značila nově vznikající buněčnou přepážku (Obrázek 8, šipka).

Kolokalizaci proteinů jsme potvrdili analýzou pomocí Pearsonova korelačního koeficientu ( $R_r$ ), jehož hodnoty blízké jedné ukázaly vysokou míru kolokalizace od interfáze po anafázi (Obrázek 8), v interfázi byla hodnota  $R_r = 0,74$ , v metafázi  $R_r = 0,94$  a v anafázi  $R_r = 0,92$ .



**Obrázek 8:**

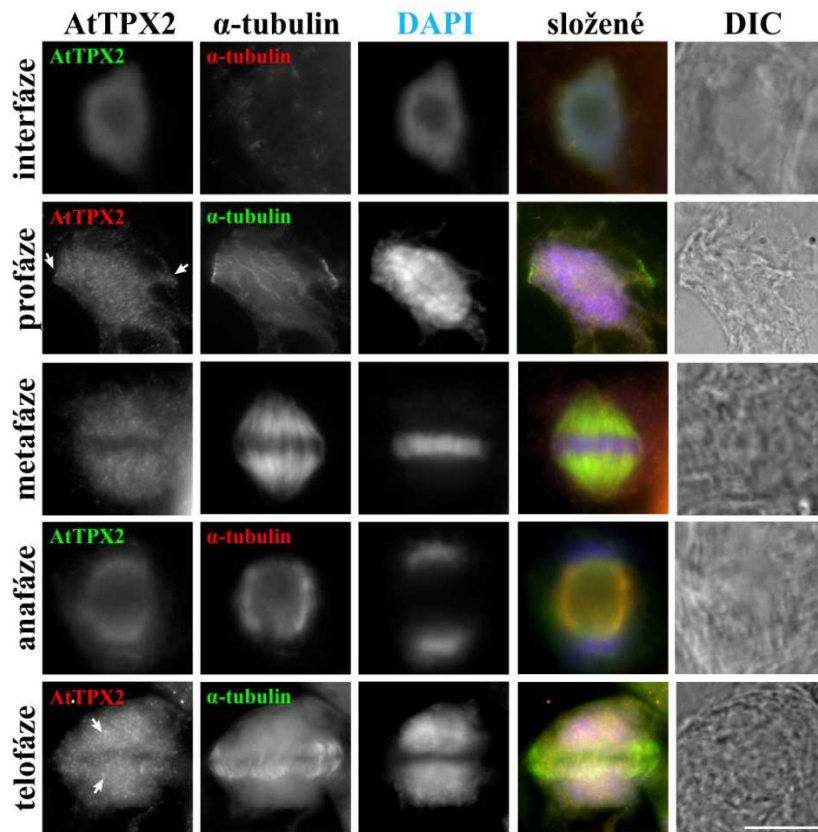
**Kolokalizace proteinů AtTPX2 a AtAurora1 kinázy v buněčných kulturách *Arabidopsis thaliana* exprimujících současně AtTPX2-GFP (-RFP) a AtAurora1-RFP (-GFP).**

Interfáze – AtTPX2 protein a AtAurora1 v jádře; metafáze a anafáze – AtTPX2 a AtAurora1 na mikrotubulech dělicího vřeténka, pozdní telofáze – AtAurora 1 kináza relokovaná do oblasti buněčné přepážky (šipka), zatímco AtTPX2 protein je již zcela degradován. Měřítko = 10  $\mu\text{m}$ . Kolokalizace – vyjádřená graficky a číselně hodnotou  $Rr$  = Pearsonův kolokalizační koeficient, hodnoty blízké 1 (0,74 – 0,94) ukazují na vysokou míru kolokalizace pro interfázi, metafázi a anafázi, zatímco v telofázi proteiny vůbec nekolokalizují.

5.3 Srovnání distribuce AtTPX2 proteinu s lokalizací mikrotubulů a  $\gamma$ -tubulinu ve fixovaných buňkách buněčné kultury *Arabidopsis thaliana* pomocí nepřímé imunodetekce.

Porovnávali jsme lokalizaci AtTPX2 proteinu s distribucí mikrotubulů a  $\gamma$ -tubulinu v buňce. V interfázi byl AtTPX2 v jádře (Obrázek 9), zatímco mikrotubuly tvořily kortikální síť a s AtTPX2 proteinem pravděpodobně nebyly v přímém kontaktu. V profázi AtTPX2 lokalizoval v oblasti chromatinu a předprofázního svazku

(Obrázek 9, šipky). Od metafáze do anafáze se AtTPX2 se nacházel na mikrotubulech dělicího vřeténka (Obrázek 9). V anafázi AtTPX2 dekoroval dělicí vřeténko a přesouval se do těsné blízkosti chromatinu (Obrázek 9). V rané telofázi byl AtTPX2 slabě v oblasti distální části fragmoplastu (Obrázek 9, šipky) a v pozdní telofázi byl AtTPX2 zcela degradován.

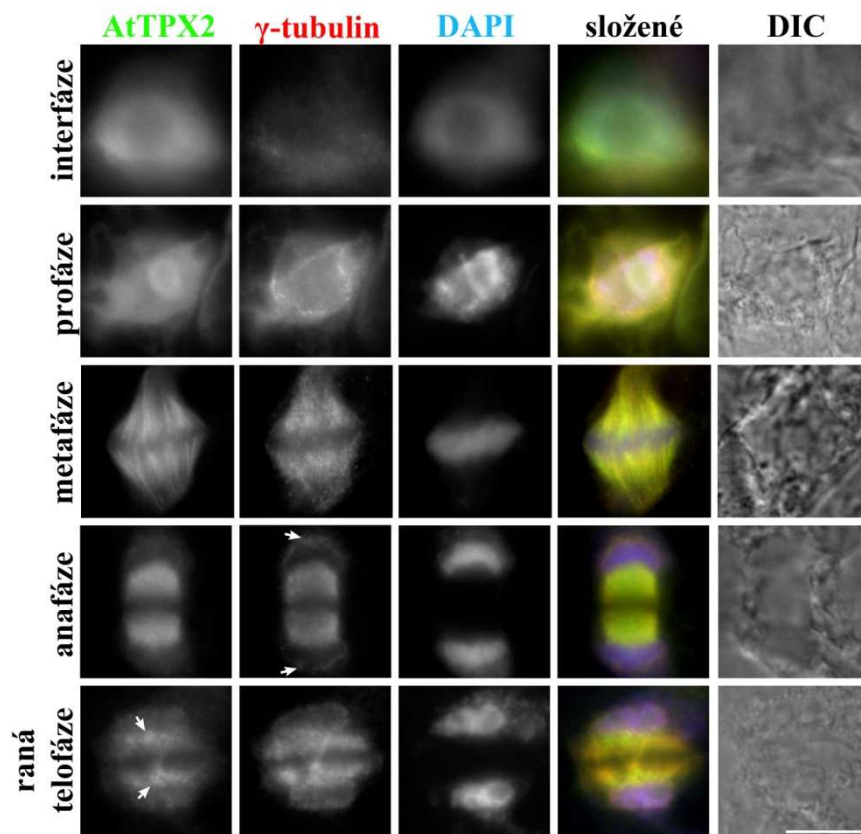


**Obrázek 9:**

**Srovnání distribuce AtTPX2 proteinu s lokalizací mikrotubulů ve fixovaných buňkách buněčné kultury *Arabidopsis thaliana* pomocí nepřímé imunodetekce.**

Interfáze – AtTPX2 protein v jádře, fragmenty kortikálních mikrotubulů; profáze – AtTPX2 v oblasti chromatinu a na mikrotubulech předprofázního svazku (šipky), mikrotubuly předprofázního svazku; metafáze – AtTPX2 na mikrotubulech dělicího vřeténka, chromozomy seřazeny v ekvatoriální rovině; anafáze – AtTPX2 na mikrotubulech dělicího vřeténka, chromatin se přesouvá k pólům buňky; telofáze – AtTPX2 v oblasti distální části fragmoplastu (šipky), mikrotubuly tvořící fragmoplast, nově se vytvářející jádra. Měřítko = 10  $\mu$ m.

AtTPX2 v interfázi byl lokalizován v jádře, zatímco  $\gamma$ -tubulin zde nevykazoval žádný signál (Obrázek 10). V profázi po rozpadu jaderné membrány AtTPX2 zůstal v oblasti chromatinu a  $\gamma$ -tubulin se soustředil okolo chromatinu (Obrázek 10). Oba proteiny společně lokalizovaly na kinetochorových mikrotubulech metafázního dělicího vřeténka (Obrázek 10). V průběhu anafáze AtTPX2 spolu s  $\gamma$ -tubulinem dekoroval dělicí vřeténko,  $\gamma$ -tubulin navíc výrazně obklopoval i chromatin (Obrázek 10, šipky). V průběhu celé telofáze  $\gamma$ -tubulin dekoroval mikrotubuly fragmoplastu a vyskytoval se v těsné blízkosti chromatinu, zatímco AtTPX2 protein v rané telofázi dekoroval distální část fragmoplastu (Obrázek 10, šipky). Výsledky ukazují společnou lokalizaci AtTPX2 proteinu s mikrotubuly a s  $\gamma$ -tubulinem na dělicím vřeténku v průběhu metafáze a rané anafáze (Obrázek 9, 10).



**Obrázek 10:**

**Srovnání distribuce AtTPX2 proteinu s lokalizací  $\gamma$ -tubulinu ve fixovaných buňkách buněčné kultury *Arabidopsis thaliana* pomocí nepřímé imunodetekce.**

Interfáze – AtTPX2 v jádře, zatímco  $\gamma$ -tubulin se v blízkosti jádra neprokázal; profáze – AtTPX2 v oblasti kondenzujícího se chromatinu, perinukleární lokalizace  $\gamma$ -tubulinu;

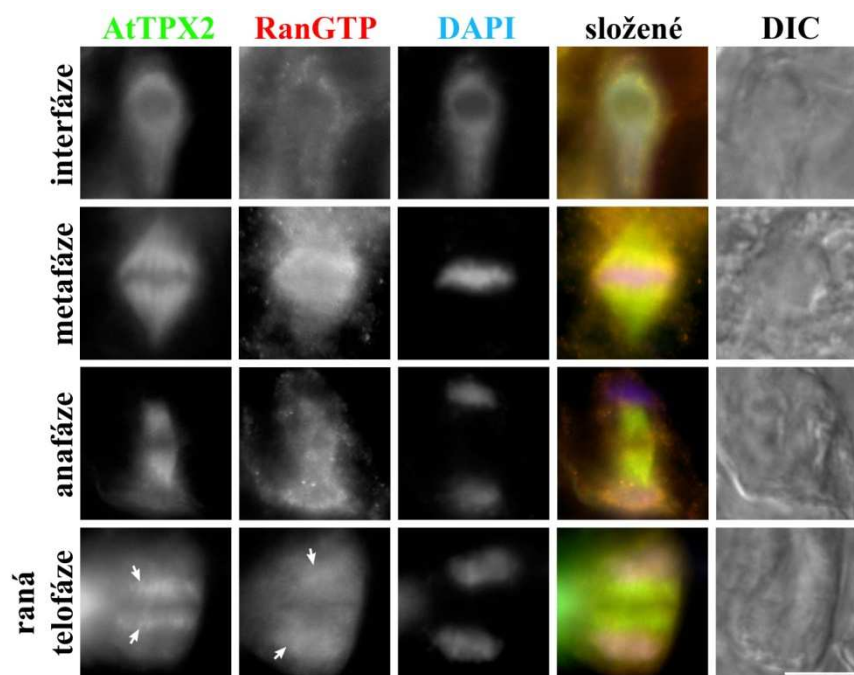
metafáze – AtTPX2 a  $\gamma$ -tubulin dekorují převážně kinetochorové mikrotubuly dělicího vřeténka, zkondenzovaný chromatin v ekvatoriální rovině; anafáze – AtTPX2 a  $\gamma$ -tubulin se nacházejí na dělicím vřeténku,  $\gamma$ -tubulin navíc obklopuje chromatin i v oblasti pólů vřeténka (šipky), chromatin tažen k pólům buňky; raná telofáze – AtTPX2 převažuje v distální části fragmoplastu (šipky),  $\gamma$ -tubulin dekoruje celý fragmoplast, chromatin formuje nová jádra. Měřítko = 10  $\mu$ m.

#### 5.4 Srovnání lokalizace AtTPX2 proteinu a malých RanGTPáz (RanGTP, RanBP1 a RCC1) pomocí nepřímé imunodetekce ve fixovaných buňkách buněčné kultury *Arabidopsis thaliana*.

Srovnávali jsme AtTPX2 protein s malými RanGTPázami – RanGTP, RanBP1 a RCC1, které v buněčném cyklu hrají důležitou roli. Nebyla prokázána výrazná společná lokalizace mezi AtTPX2 proteinem a malými RanGTPázami – RanGTP, RanBP1 a RCC1. Lokalizace RanGTP, RanBP1 i RCC1 byla většinou cytoplazmatická, signál byl disperzní a slabě zrnitý (Obrázek 11 – 13).

RanGTP protein se v interfázi vyskytoval v cytoplazmě a slabě v okolí jádra (Obrázek 11), na rozdíl od AtTPX2 proteinu nacházejícím se přímo v jádře. V metafázi podobně jako v anafázi, kde byl AtTPX2 lokalizovaný na dělicím vřeténku, byl RanGTP lokalizovaný v oblasti dělicího vřeténka, v metafázi především v jeho centrální části a v anafázi i nepatrně v celé cytoplazmě (Obrázek 11), v průběhu rané telofáze v době, kdy AtTPX2 byl ještě v oblasti distální části fragmoplastu (Obrázek 11, šipky), RanGTP se vyskytoval v oblasti chromatinu (Obrázek 11, šipky) a nepatrně v celé cytoplazmě.





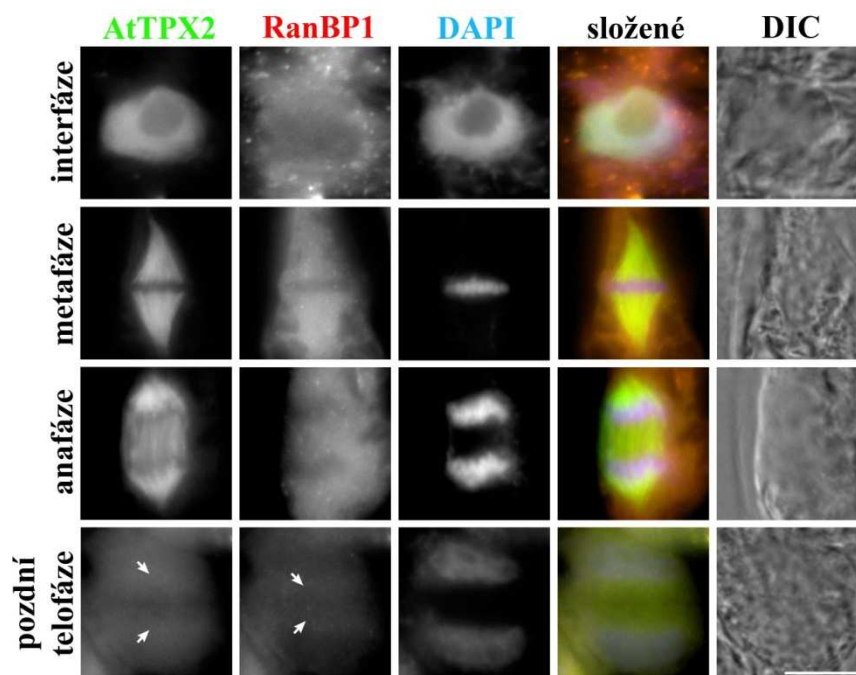
**Obrázek 11:**

**Srovnání lokalizace AtTPX2 proteinu a RanGTP pomocí nepřímé imunodetekce ve fixovaných buňkách buněčné kultury *Arabidopsis thaliana*.**

Interfáze – AtTPX2 protein v jádře, RanGTP protein v cytoplasmě a těsném okolí jádra; metafáze – AtTPX2 na kinetochorových mikrotubulech dělicího vřeténka napojených na chromozomy v ekvatoriální rovině, RanGTP v oblasti dělicího vřeténka; anafáze – AtTPX2 na mikrotubulech dělicího vřeténka, RanGTP v oblasti dělicího vřeténka a slabě v celé cytoplasmě, chromatin přesouván k opačným pólům buňky; raná telofáze – AtTPX2 v oblasti distální části fragmoplastu (šipky), RanGTP v oblasti chromatinu (šipky) a slabě v cytoplasmě, chromatin formuje nová jádra. Měřítka = 10  $\mu\text{m}$ .

RanBP1 protein byl v interfázi pozorován slabě v celé cytoplasmě a v okolí jádra, uvnitř kterého byl lokalizován AtTPX2 (Obrázek 12). V průběhu metafáze a anafáze na rozdíl od AtTPX2 proteinu, který přímo dekoroval mikrotubuly, byl RanBP1 protein lokalizovaný v oblasti dělicího vřeténka jen velmi slabě a difúzně a nepatrně se nacházel také v celé cytoplasmě (Obrázek 12). V době, kdy AtTPX2 degradoval v průběhu telofáze a byl v pozdní telofázi pozorován jen velmi nepatrně částečně na distální části fragmoplastu (Obrázek 12, šipky), RanBP1 protein se vyskytoval již jen slabě jako disperzní a granulovaný signál v oblasti fragmoplastu (Obrázek 12, šipky) a slabě i v celé cytoplasmě.



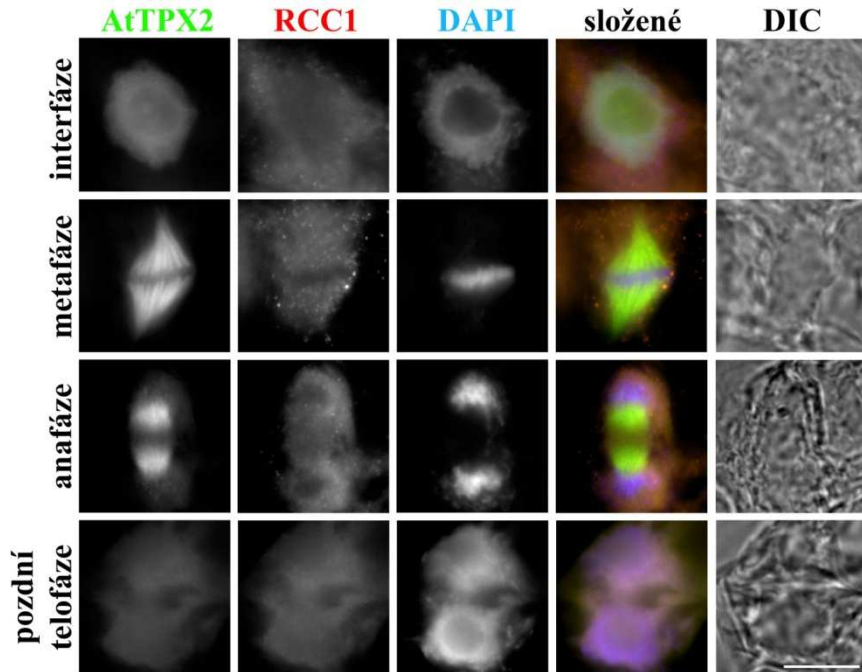


**Obrázek 12:**

**Srovnání lokalizace AtTPX2 proteinu a RanBP1 pomocí nepřímé imunodetekce ve fixovaných buňkách buněčné kultury *Arabidopsis thaliana*.**

Interfáze – AtTPX2 protein v jádře, RanBP1 protein v okolí jádra a v celé cytoplazmě; metafáze – AtTPX2 na kinetochorových mikrotubulech dělicího vřeténka, RanBP1 v oblasti dělicího vřeténka a slabě v cytoplazmě, chromozomy uspořádané v ekvatoriální rovině; anafáze – AtTPX2 na mikrotubulech dělicího vřeténka, RanBP1 v oblasti dělicího vřeténka a slabě v cytoplazmě, chromatin se přesouvá k pólům buňky; pozdní telofáze – poslední nedegradované zbytky AtTPX2 v distální části fragmoplastu (šipky), RanBP1 slabě v celé cytoplazmě s nevýraznou lokalizací v oblasti fragmoplastu (šipky), dekonduzující se chromatin formující nová jádra. Měřítka = 10  $\mu$ m.

RCC1 protein se podobně jako předchozí dvě RanGTPázy nacházel v průběhu interfáze slabě v celé cytoplazmě a také okolo jádra (Obrázek 13), uvnitř kterého byl AtTPX2. AtTPX2 v metafázi přešel na kinetochorové mikrotubuly dělicího vřeténka a dekoroval dělicí vřeténko také v anafázi, zatímco RCC1 se během těchto fází buněčného cyklu nacházel nepatrně v celé cytoplazmě a rovněž disperzně v oblasti celého dělicího vřeténka (Obrázek 13). V průběhu pozdní telofáze, kdy AtTPX2 již zcela degradoval, byl RCC1 protein lokalizován už jen velmi slabě v celé cytoplazmě (Obrázek 13).



**Obrázek 13:**

**Srovnání lokalizace AtTPX2 proteinu a RCC1 pomocí nepřímé imunodetekce ve fixovaných buňkách buněčné kultury *Arabidopsis thaliana*.**

Interfáze – AtTPX2 protein v jádře, RCC1 okolo jádra a v cytoplazmě; metafáze – AtTPX2 na kinetochorových mikrotubulech dělicího vřeténka, RCC1 v oblasti dělicího vřeténka, chromozomy uspořádané v ekvatoriální rovině; anafáze – AtTPX2 na mikrotubulech dělicího vřeténka, RCC1 v oblasti dělicího vřeténka a v celé cytoplazmě, chromatin směřující k pólům buňky; pozdní telofáze – AtTPX2 zde již zcela degradoval, RCC1 velmi slabě v celé cytoplazmě, chromatin v nově se vytvářejících jádrech. Měřítka = 10  $\mu$ m.

### 5.5 Nadprodukce TPX2-GFP proteinu

V živých buněčných kulturách *Arabidopsis thaliana* exprimujících AtTPX2-GFP jsme pozorovali těsně po transformaci nadprodukcí a s ní spojenou specifickou lokalizací AtTPX2-GFP na různých místech v buňce. Tento jev byl pouze dočasný, po několika dnech, maximálně jednom týdnu, se exprese proteinu a jeho lokalizace v buňkách ustálila. Daný jev by mohl objasnit další funkce AtTPX2 proteinu v buněčném cyklu a bude předmětem dalších výzkumů.

## 6 Diskuze

Protein TPX2 byl již dříve zkoumán u rostlin – *Nicotiana benthamiana* (tabák) a *Tradescantia Virginiana* (poděnká virginská) – (Vos *et al.*, 2008), *Arabidopsis thaliana* (huseníček rolní), *Oryza sativa* (rýže setá) a *Vitis vinifera* (réva vinná) – (Evrard *et al.*, 2009). My jsme se zaměřili na studium lokalizace AtTPX2 proteinu v průběhu buněčného cyklu a jeho srovnání s distribucí dalších proteinů buněčného cyklu. Získané výsledky mohou napomoci k objasnění funkce TPX2 proteinu u vyšších rostlin.

Podobnou lokalizaci, jako uvádí Vos *et al.* (2008) u buněčné kultury tabáku (BY2) a buněk kořenových meristémů u *Arabidopsis*, jsme ukázali u buněčné kultury *Arabidopsis* (ekotyp *Columbia*). AtTPX2 protein během interfáze lokalizoval v jádře, v profázi se nacházel v oblasti chromatinu a od metafáze po anafázi dekoroval mikrotubuly dělicího vřeténka. V průběhu telofáze se AtTPX2 protein přesouval do oblasti distální části fragmoplastu a rychle degradoval až do kompletního odbourání, zatímco Stewart and Fang (2005) zaznamenali přesun TPX2 proteinu do centrální oblasti anafázního vřeténka u HeLa buněk a rychlé vymizení TPX2 proteinu již během pozdní anafáze, kdy dochází k rychlé reorganizaci dělicího vřeténka. TPX2 protein je jedním z hlavních regulátorů pro uspořádání dělicího vřeténka a jeho degradace při přechodu do cytokineze pravděpodobně pomáhá omezovat formování a aktivitu dělicího vřeténka pouze na mitózu (Gruss *et al.*, 2002).

Předpoklad, že by AtTPX2 mohl interagovat s Aurora kinázami u *Arabidopsis* (Vos *et al.* 2008), výrazně podporují i naše pozorování, prokázali jsme kolokalizaci AtAurora1 kinázy spolu s AtTPX2 proteinem v průběhu buněčného cyklu buněčné kultury *Arabidopsis* v metafázi a anafázi. Naše výsledky jsou také v souladu se závěry Vos *et al.* (2008), které tvrdí, že AtTPX2 spolu s Aurora kinázami hrají klíčovou úlohu při formování dělicího vřeténka, podobně jako je tomu u živočichů (Kufer *et al.*, 2002).

TPX2 protein iniciuje nukleaci mikrotubulů na kinetochorech a v blízkosti chromozomů u HeLa buněk a váže se k těmto mikrotubulům, chová se jako mikrotubuly asociovaný protein (MAP), který je lokalizovaný s mikrotubuly na dělicím vřeténku, ale mikrotubuly nestabilizuje podobně jako jiné MAPs. Hraje tak pravděpodobně ještě další dosud neznámou roli při nukleaci mikrotubulů u živočichů (Gruss *et al.*, 2002). Protože

u acentrozomálních buněk rostlin se na nukleaci mikrotubulů významně podílí  $\gamma$ -tubulin, který všechny rostlinné mikrotubuly dekoruje a funguje jako MTOC (Binarová *et al.*, 2003; Dryková *et al.*, 2006), srovnali jsme lokalizaci rostlinného AtTPX2 s lokalizací  $\gamma$ -tubulinu a mikrotubulů pomocí imunodetekce. Naše výsledky ukázaly, že AtTPX2 se nachází na mikrotubulech dělicího vřeténka od metafáze po pozdní anafázi a rovněž částečně společně lokalizuje s  $\gamma$ -tubulinem, což by mohlo naznačovat podobný význam AtTPX2 pro nukleaci mikrotubulů i u vyšších rostlin.

TPX2 v extraktech z vajíček žáby *Xenopus laevis* (drápatky vodní) hraje roli při zahájení nukleace mikrotubulů, která je regulována malou RanGTPázou RanGTP a dalšími proteiny RanGTPázové dráhy (Gruss *et al.*, 2001). Zkoumali jsme tedy, zda se AtTPX2 vyskytuje v buňkách buněčné kultury *Arabidopsis* spolu s některými vybranými proteiny ze skupiny malých RanGTPáz, jako RanGTP, RanBP1 a RCC1. Naše předběžné výsledky imunolokalizací s použitím specifických protilátek proti živočišným RanGTPázám (RanGTP, RanBP1 a RCC1), ukázaly přítomnost RanGTP jen slabě v oblasti dělicího vřeténka, kde jsme lokalizovali také AtTPX2 protein, což by mohlo být, přestože RanGTP a AtTPX2 spolu přímo nelokalizovaly, jedním z možných důkazů, že i rostlinný AtTPX2 protein by mohl být schopen vazby s RanGTP v průběhu organizace dělicího vřeténka, podobně, jak popisuje Gruss *et al.* (2001) pro TPX2 z extraktu vajíček *Xenopus*. Tyto předběžné výsledky budou předmětem dalšího studia.

Při studiu buněčné kultury *Arabidopsis* byla pozorována nadprodukce AtTPX2 proteinu podobně, jak se o tom zmiňují již dříve Stewart and Fang (2005).

## 7 Shrnutí

Připravili jsme transformovanou buněčnou kulturu *Arabidopsis thaliana* exprimující AtTPX2-GFP protein a zkoumali jsme lokalizaci AtTPX2 proteinu v průběhu buněčného cyklu u živých transformovaných buněk i u fixovaných buněk. AtTPX2 protein se během interfáze nacházel v jádře. Během mitózy byl v profázi v oblasti chromatinu a od metafáze po anafázi na mikrotubulech dělicího vřeténka. V telofázi byl AtTPX2 postupně odbourán. Podle předpokladu AtTPX2 protein kolokalizoval

s Aurora1 kinázou. AtTPX2 lokalizoval společně s mikrotubuly a  $\gamma$ -tubulinem na mitotickém vřeténku v průběhu metafáze a anafáze. Neprokládali jsme významnou společnou lokalizaci AtTPX2 proteinu a vybraných proteinů RanGTPázové dráhy (RanGTP, RanBP1, RCC1).

## 8 Závěr

Získané výsledky pomohly objasnit lokalizaci AtTPX2 proteinu v živých buňkách modelové rostliny huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) a jeho možnou společnou lokalizaci s některými dalšími proteiny důležitými pro buněčný cyklus (AtAurora1,  $\alpha$ -tubulin,  $\gamma$ -tubulin, RanGTP, RanBP1, RCC1) v průběhu buněčného cyklu. Tyto výsledky mohou vést k lepšímu pochopení pochodů v průběhu buněčného cyklu u acentrozomálních buněk vyšších rostlin. Další studie AtTPX2 proteinu mohou podrobněji objasnit další dosud neznámé funkce tohoto proteinu.

## 9 Použitá literatura

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P.** (2008). Molecular biology of the cell fifth edition. Garland Science, Taylor & Francis Group. ISBN 978-0-8153-4105-5.
- Bayliss, R., Sardon, T., Vernos, I., and Conti, E.** (2003). Structural basis of Aurora-A activation by TPX2 at the mitotic spindle. *Mol. Cell.* **12(4)**: 851 – 862.
- Binarová, P., Cenklová, V., Procházková, J., Doskočilová, A., Volc, J., Vrlík, M., and Börge, I.** (2006).  $\gamma$ -Tubulin is essential for acentrosomal microtubule nucleation and coordination of late mitotic events in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **18(5)**: 1199 – 1212.
- Binarová, P., Cenklová, V., Sulimenko, V., Dryková, D., Volc, J., and Dráber, P.** (2003). Distribution of gamma-tubulin in cellular compartments of higher plant cells. *Cell Biol. Int.* **27(3)**: 167 – 169.
- Bischoff, F.R., Krebber, H., Smirnova, E., Dong, W., and Ponstingl, H.** (1995). Co-activation of RanGTPase and inhibition of GTP dissociation by Ran-GTP binding protein RanBP1. *EMBO J* **14(4)**: 705 – 715.
- Clarke, P.R. and Zhang, C.** (2008). Spatial and temporal coordination of mitosis by RanGTPase. *Nature Reviews. Mol. Cell Biol.* **9(6)**: 464 – 477.
- Conde, C., and Cáceres, A.** (2009). Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat. Rev. Neurosci.* **10(5)**: 319 – 332.
- Dibbayawan, T.P., Harper, J.D., and Marc, J.** (2001). A gamma-tubulin antibody against a plant peptide sequence localises to cell division-specific microtubule arrays and organelles in plants. *Micron.* **32(7)**: 671 – 678.
- Dryková, D., Cenklová, V., Sulimenko, V., Volc, J., Dráber, P., and Binarová, P.** (2003). Plant  $\gamma$ -tubulin interacts with  $\alpha\beta$ -tubulin dimers and forms membrane-associated complexes. *Plant Cell.* **15(2)**: 465 – 480.
- Ducat, D., and Zhang, Y.** (2004). Aurora kinases in spindle assembly and chromosome segregation. *Exp. Cell Res.* **301(1)**: 60 – 67.
- Evrard, J.-L., Pieuchot, L., Vos, J.W., Vernos, I., and Schmit, A.-C.** (2009). Plant TPX2 and related proteins. *Plant Signal. Behav.* **4(1)**: 69 – 72.
- Glover, D.M., Leibowitz, M.H., McLean, D.A., and Parry, H.** (1995). Mutations in Aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles. *Cell.* **81(1)**: 95 – 105.
- Goddard, R.H., Wick, S.M., Silflow, C.D., and Snustad, D.P.** (1994). Microtubule components of the plant cytoskeleton. *Plant Physiol.* **104(1)**: 1 – 6.
- Gruss, O.J., and Vernos, I.** (2004). The mechanism of spindle assembly: Functions of Ran and its target TPX2. *J. Cell Biol.* **166(7)**: 949 – 955.
- Gruss, O.J., Carazo-Salas, R.E., Schatz, C.A., Guarguaglini, G., Kast, J., Wilm, M., Le Bot, N., Vernos, I., Karsenti, E., and Mattaj, I.W.** (2001). Ran induces spindle assembly by reversing the inhibitory effect of importin alpha on TPX2 activity. *Cell.* **104(1)**: 83 – 93.
- Gruss, O.J., Wittmann, M., Yokoyama, H., Pepperkok, R., Kufer, T., Silljé, H., Karsenti, E., Mattaj, I.W., and Vernos, I.** (2002). Chromosome-induced microtubule assembly mediated by TPX2 is required for spindle formation in HeLa cells. *Nature Cell Biology.* **4(11)**: 871 – 879.
- Joseph, J.** (2006). Ran at a glance. *J. Cell Sci.* **119**: 3841 – 3844.
- Karimi, M., Inzé, D., and Depicker, A.** (2002). GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* **7(5)**: 193 – 195.

- Karsenti, E., and Vernos, I.** (2001). The mitotic spindle: a self-made machine. *Science*. **294(5542)**: 543 – 547.
- Kawabe, A., Matsunaga, S., Nakagawa, K., Kurihara, D., Yoneda, A., Hasezawa, S., Uchiyama, S., and Fukui, K.** (2005). Characterization of plant Aurora kinases during mitosis. *Plant Mol. Biol.* **58(1)**: 1 – 13.
- Koroleva, O.A., Tomlinson, M.L., Leader, D., Shaw, P., and Doonan, J.H.** (2005). High-throughput protein localizatin in *Arabidopsis* using *Agrobacterium*-mediated transient expression of GFP-ORF fusions. *Plant J.* **41(1)**: 162 – 174.
- Kufer, T.A., Silljé, H.H.W., Körner, R., Gruss, O.J., Meraldi, P., and Nigg, E.A.** (2002). Human TPX2 is required for targeting Aurora-A kinase to the spindle. *The J. Cell Biol.* **158(4)**: 617 – 623.
- Macara, I.G.** (2001). Transport into and out of the nucleus. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65(4)**: 570 – 594.
- Mathur, J., Szabados, L., Schaefer, S., Grunenberg, B., Lossow, A., Jonas-Straube, E., Schell J., Koncz, C., and Koncz-Kálmán, Z.** (1998). Gene identification with sequenced T-DNA tags generated by transformation of *Arabidopsis* cell suspension. *Plant J.* **13(5)**: 707 – 716.
- Meier, I., and Brkljacic, J.** (2009). Adding pieces to the puzzling plant nuclear envelope. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12(6)**: 752 – 759.
- Morgan, D.O.** (2007). *The cell cycle: Principles of control*. Oxford University Press. ISBN 0878935088.
- Murashige, T., and Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15(3)**: 473 – 497.
- Nakamura, K., Watakabe, A., Hioki, H., Fujiyama, F., Tanaka, Y., Yamamori, T., Kaneko, T.** (2007). Transiently increased colocalization of vesicular glutamate transporters 1 and 2 at single axon terminals during postnatal development of mouse neocortex: a quantitative analysis with correlation coefficient. *Eur. J. Neurosci.* **26(11)**: 3054 - 3067.
- O'Brien, L., and Wiese, Ch.** (2006). TPX2 is required for postmitotic nuclear assembly in cell-free *Xenopus laevis* egg extracts. *J. Cell Biol.* **173(5)**: 685 – 694.
- Schatz, C.A., Santarella, R., Hoenger, A., Karsenti, E., Mattaj, I.W., Gruss, O.J., and Carazo-Salas, R.E.** (2003). Importin alpha-regulated nucleation of microtubules by TPX2. *EMBO J.* **22(9)**: 2060 – 2070.
- Stewart, S., and Fang, G.** (2005). Anaphase-promoting complex/cyclosome controls the stability of TPX2 during mitotic exit. *Mol. Cell. Biol.* **25(23)**: 10516 – 10527.
- Tang, C.J., Lin, C.Y., and Tang, T.K.** (2006). Dynamic localization and functional implications of Aurora-C kinase during male mouse meiosis. *Dev. Biol.* **290(2)**: 398 – 410.
- Vos, J.W., Pieuchot, L., Evrard, J.-L., Janski, N., Bergdoll, M., de Ronde, D., Perez, L.H., Sardon, T., Vernos, I., and Schmit, A.-C.** (2008). The plant TPX2 protein regulates prospindle assembly before nuclear envelope breakdown. *Plant Cell.* **20(10)**: 2783 – 2797.
- Wang, E., Ballister, E.R., and Lampson, M.A.** (2011). Aurora B dynamics at centromeres create a diffusion-based phosphorylation gradient. *J. Cell Biol.* **194(4)**: 539 – 549.
- Witmann, T., Wilm, M., Karsenti, E., and Vernos, I.** (2000). A novel *Xenopus* MAP involved in spindle pole organization. *J. Cell Biol.* **149(7)**: 1405 – 1418.
- Wittmann, T., Boleti, H., Antony, C., Karsenti, E., and Vernos, I.** (1998). Localization of the kinesin-like protein Xklp2 to spindle poles requires a leucine zipper, a microtubule-associated protein, and dynein. *J. Cell Biol.* **143(3)**: 673 – 685.

- Yang, K.-T., Li, S.-K., Chang, C.-C., Tang, C.-J. C, Lin, Y.-N., Lee, S.-C., and Tang, T.K.** (2010). Aurora-C kinase deficiency causes cytokinesis failure in meiosis I and production polyploid oocytes in mice. *Mol. Biol. Cell.* **21(14)**: 2371 – 2383.
- Yudin, D., and Fainzilber, M.** (2009). Ran on tracks – cytoplasmic roles for a nuclear regulator. *J. Cell Sci.* **122(5)**: 587 – 593.

**Cell Division (Mitosis) In Eukaryotic Cells.** <http://waynesword.palomar.edu/lmexer2.htm>. Naposledy zkontrolováno dne: 8. 5. 2012.

**Plugins.** <http://rsbweb.nih.gov/ij/plugins/>. Naposledy zkontrolováno dne: 8. 5. 2012.

**The Cell Cycle and Checkpoint controls: Toward understanding of genome maintenance mechanisms.** <http://homepage.mac.com/enognog/checkpoint.htm>. Naposledy zkontrolováno dne: 8. 5. 2012.

## 10 Seznam obrázků

**Obrázek 1:** Uspořádání a dynamika mikrotubulů.

**Obrázek 2:** Schematické znázornění organizace mikrotubulů v průběhu buněčného cyklu rostlinné buňky.

**Obrázek 3:** Schéma průběhu buněčného cyklu.

**Obrázek 4:** Schéma jednotlivých fází mitózy.

**Obrázek 5:** Lokalizace TPX2 proteinu u živočichů.

**Obrázek 6:** Schéma funkce RanGTP gradientu při transportu proteinů mezi jádrem a cytoplazmou a při nukleaci a organizaci mikrotubulů a formování dělicího vřeténka v blízkosti chromatinu za spoluúčasti TPX2 proteinu.

**Obrázek 7:** Lokalizace AtTPX2 proteinu v živých a fixovaných buňkách buněčné kultury *Arabidopsis thaliana*.

**Obrázek 8:** Kolokalizace proteinů AtTPX2 a AtAurora1 kinázy v buněčných kulturách *Arabidopsis thaliana* exprimujících současně AtTPX2-GFP(-RFP) a AtAurora1-RFP(-GFP).

**Obrázek 9:** Srovnání distribuce AtTPX2 proteinu s lokalizací mikrotubulů ve fixovaných buňkách buněčné kultury *Arabidopsis thaliana* pomocí nepřímé imunodetekce.



**Obrázek 10:** Srovnání distribuce AtTPX2 proteinu s lokalizací  $\gamma$ -tubulinu ve fixovaných buňkách buněčné kultury *Arabidopsis thaliana* pomocí nepřímé imunodetekce.

**Obrázek 11:** Srovnání lokalizace AtTPX2 proteinu a RanGTP pomocí nepřímé imunodetekce ve fixovaných buňkách buněčné kultury *Arabidopsis thaliana*.

**Obrázek 12:** Srovnání lokalizace AtTPX2 proteinu a RanBP1 pomocí nepřímé imunodetekce ve fixovaných buňkách buněčné kultury *Arabidopsis thaliana*.

**Obrázek 13:** Srovnání lokalizace AtTPX2 proteinu a RCC1 pomocí nepřímé imunodetekce ve fixovaných buňkách buněčné kultury *Arabidopsis thaliana*.