

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Experimentální biologie rostlin



Bc. Kamila Dubenecká

Analýza dynamiky CESA komplexů v rostlinách s narušeným cytoskeletem
Analysis of CESA complexes dynamics in plant cytoskeletal mutants

Diplomová práce

Praha, 2018

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

Prohlášení

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

V Praze dne: 13. 8. 2018

Podpis:

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat především své školitelce Kateřině Schwarzerové za vedení mé diplomové práce, za spoustu rad, za pochopení a pomoc. Děkuji za všechno, co jsi mi ukázala a co jsem se mohla naučit. Všem členům naší laboratoře děkuji za to, že jste tak bezvadný kolektiv a nikdy jste neváhali pomoci, když jsem si s něčím nevěděla rady. Petrovi Jírovci patří můj dík za připravovaná média a sterilní materiál. Všem, kdo se podíleli, děkuji také za zalévání mých rostlinek. Mému příteli a rodině patří velký dík za podporu a snahu pochopit, co to vlastně dělám.

Seznam použitých zkratek

ABA – kyselina abscisová

AF – aktinová (mikro)filamenta

any1 – *anisotropy1* (mutace genu *CESA1*)

AP2 – adaptorový proteinový komplex 2

AP2M/ μ 2 – podjednotka komplexu AP2 v *Arabidopsis*

ARP2, ARP3 – podjednotky ARP2/3 komplexu příbuzné k aktinu (actin-related protein)

ARP2/3 – komplex aktinu příbuzných proteinů (actin-related protein)

ARPC1 – ARPC5 – podjednotky ARP2/3 komplexu nepřibuzné k aktinu (actin-related protein complex component)

AtCESA1-10 – geny pro celulózasyntázy v *Arabidopsis thaliana*

AtDRP1A – dynamin-like protein v *Arabidopsis thaliana*

AV ČR – Akademie věd České republiky

BC1 – BRITTLE CULM1 - COBRA –like protein v *Oryza sativa*

bc3 – *brittle culm3* (mutace *OsDRP2B*)

BS – buněčná stěna

CC1-4 – Companion of Cellulose Synthase 1-4

CESA – enzym celulózasyntáza (cellulose synthases A)

cevl – mutace *CESA3* - *constitutive expression of vegetative storage proteins1*

CFP-TUA1 – α -tubulin označen modrým fluorescenčním proteinem

CME – endocytóza závislá na klathrinu (clathrin-mediated endocytosis)

COB – COBRA

COBL – *COBRA*-like

crk – *crooked* - mutace *ARPC5*

CSC – komplex celulózasyntáz (cellulose synthase complex)

CSII – CESA interactive protein 1

CSI2, CSI3 – CSII-like proteiny

CSL – CESA-like proteiny

CSR – class specific region - třídivě specifická oblast proteinu CESA

CTL1/POM1 – Chitinase-like protein 1

CUM1-3 – Cellulose synthase-Microtubule Uncoupling 1-3

CW – Calcofluoru White
eli1 - ectopic lignification1 – mutace *CESA3*
ER – endoplazmatické retikulum
ERM – Ezrin/radixin/moesin rodina proteinů
F-aktin – polymerizované aktinové mikrofilamentum
FLIP – fluorescence loss in photobleaching
FM4-64 – marker pro endocytózu
GA – Golgiho aparát
GEF – guanine nucleotide exchange factor
GFP, YFP, RFP – fluorescenční proteiny: zelený, žlutý, červený
GPI – glykofosfatidylinositol
GT-2 – glykosyltransferáza 2
HSD – honestly significant difference (Tukeyho test)
HVR – hyper-variable region
IF – intermediární filamenta
irx – irregular xylem: *irx1* (mutace *CESA8*), *irx3* (mutace *CESA7*), *irx5* (mutace *CESA4*)
ixr – isoxaben-resistant: *ixr1* (mutace *CESA3*), *ixr2* (mutace *CESA6*)
KOB1 – KOBITO
KOR1 – KORRIGAN1
MAP1 a 2 – microtubule-associated protein 1, 2
MAPs – proteiny asociované s mikrotubuly
MS – médium Murashige a Skoog
MT – mikrotubuly
NASC – The Nottingham Arabidopsis Stock Centre
NPF – faktor podporující nukleaci (nucleation promoting factor)
NT – N terminal end – N-konec
OsDRP2B – dynamin-related protein 2B v *Oryza sativa*
P-CR – plant-specific conserved region
PM – plazmatická membrána
prc1 – procuste – mutace *CESA6*
px – pixel
RNAi – RNA interference

rsw1 – radial analyses swelling – mutace *CESA1*

rsw9 – radially swelling 9 - mutace v *DRP1A*

SmaCC/ MASC – Small CESA Compartments/ Microtubule Associated Cellulose Synthase Compartments

SPK1 – SPIKE1

STL – STELLO

SUSY (SUS) – sacharózasyntáza

TCs – terminální komplexy

TED – tracheary element differentiation-related

TM – transmembránová doména

UDP-G – uridindifosfát-glukóza

ÚEB – Ústav experimentální botaniky

UV – ultrafialové záření

W/SRC – WAVE/SCARkomplex

WT – wild type

YFP-TUA5 – α -tubulin se žlutým fluorescenčním proteinem

ZN – zinkový prst

Abstrakt

V této studii byly využity mutantní rostliny *Arabidopsis thaliana* s nefunkčním ARP2/3 komplexem (linie *arpc5* a *arp2*). Za účelem studia dynamiky celulózasyntázových komplexů byla v těchto liniích exprimována podjednotka komplexu celulózasyntáz CESA6, podílející se na syntéze primární buněčné stěny, označená YFP. Pohyb CESA6-YFP byl pozorován *in vivo* na plazmatické membráně moderními zobrazovacími metodami – konfokálním mikroskopem vybaveným rotujícím diskem, a VAEM mikroskopií. K měření rychlosti CESA6-YFP byla použita analýza kymogramů. V dalších experimentech byla studována rychlost regenerace buněčné stěny u protoplastů mutantních *arpc5* a wildtype rostlin *Arabidopsis thaliana*. Bylo zjištěno, že mutantní rostliny *arpc5* a *arp2* mají oproti WT pomalejší CESA6-YFP. Dále bylo zjištěno, že protoplasty *arpc5* pomaleji obnovují celulózní síť buněčné stěny oproti wildtype rostlinám.

Klíčová slova: Syntéza celulózy, ARP2/3 komplex, CESA, rychlost CSC, *arpc5*, *arp2*, *Arabidopsis thaliana*.

Abstract

Mutant plants *arpc5* and *arp2* lacking functional ARP2/3 complex were used in this study. Cellulose synthase subunit CESA6 involved in primary cell wall synthesis tagged with YFP was introduced into these mutant lines to study cellulose synthase dynamics. Modern imaging technologies such as spinning disc confocal microscopy and VAEM microscopy were used to observe the movement of tagged cellulose synthase complexes *in vivo* at the plasma membrane. Kymograph analyses were used to measure the velocity of CESA6-YFP. In addition to this, cell wall regeneration of protoplasts of *Arabidopsis thaliana* was compared in *arpc5* and WT plants. It was found out that mutant lines *arpc5* and *arp2* have reduced velocity of CESA6-YFP in comparison to WT. Further, *arpc5* protoplasts regenerated cellulose mesh of cell wall slower when compared to WT

Keywords: Cellulose synthesis, ARP2/3 complex, CESA, CSC velocity, *arpc5*, *arp2*, *Arabidopsis thaliana*.

Obsah

Seznam použitých zkratk.....	1
Abstrakt.....	4
Abstract.....	5
Obsah.....	6
1 Úvod a cíl diplomové práce.....	8
2 Literární přehled.....	9
2.1 Rostlinný cytoskelet.....	9
2.2 ARP2/3 komplex.....	10
2.3 Buněčná stěna.....	12
2.4 Celulóza:.....	13
2.5 Historie objevu CSCs.....	15
2.6 Geny CESA.....	16
2.7 Modely CESA komplexu:.....	16
2.8 Struktura a dynamika CESA proteinů.....	18
2.9 Mutace <i>CESA</i> genů.....	20
2.10 CSC a mikrotubuly.....	23
2.11 CSC a aktin.....	26
2.12 Dráha CSC v rostlinné buňce.....	27
2.13 Regulace syntézy celulózy.....	29
2.13.1 SUSY.....	29
2.13.2 Fosforylace.....	30
2.14 Proteiny asociované s CSC.....	31
2.14.1 KOR1 (KORRIGAN1) protein.....	31
2.14.2 COBRA a COBRA-like proteiny.....	31
2.14.3 TED6 a 7.....	32
2.14.4 CTL1/POM1.....	32
2.14.5 KOBITO (KOB1).....	32
3 Materiál a metody.....	34
3.1 Rostlinný materiál.....	34
3.2 Kultivační podmínky.....	35
3.3 Křížení a selekce mutantních rostlin.....	35
3.4 Získání dat pro rychlost CESA6.....	38

3.5	Analýza rychlosti pohybu CESA6	39
3.6	Regenerace protoplastů	41
3.6.1	Izolace a regenerace protoplastů	41
3.6.2	Zpracování dat z pozorování protoplastů	44
3.7	Média a roztoky	46
3.7.1	½ MS médium pro in vitro pěstování <i>Arabidopsis thaliana</i>	46
3.7.2	Gamborgovo B5 médium	46
3.7.3	Roztok W5 – pH 5,7	47
3.7.4	Enzymový roztok pro izolaci protoplastů – pH 5,8	47
3.7.5	TVL roztok	47
3.7.6	Roztok Calcofluor White (CW)	47
4	Výsledky	48
4.1	Analýza kymogramů YFP-CESA6 na PM	48
4.1.1	Analýza rychlosti CESA komplexů v kontrolní variantě	48
4.1.2	Analýza rychlosti CESA komplexů <i>arp2</i> mutanta	50
4.1.3	Analýza rychlosti CESA komplexů <i>arpc5</i> mutanta	51
4.2	Kvantifikace obnovy buněčné stěny protoplastů	54
5	Diskuze	56
5.1	Rychlost pozorovaných YFP-CESA6 na PM	56
5.2	Role ARP2/3 komplexu v syntéze celulózy?	58
5.3	Molekulární mechanismus	61
6	Shrnutí	63
	Citovaná literatura	64

1 Úvod a cíl diplomové práce

Buněčná stěna je nepostradatelnou komponentou rostlinných buněk, ať už jako mechanická struktura udržující tvar, pružnost a pevnost buňky nebo jako sklad látek či obranná linie vůči patogenům. Důležité jsou buněčné stěny rostlin v širším pojetí i pro samotné lidstvo, neboť obsahují celulózu, což je nejrozšířenější biopolymer na světě a využívá se hojně v papírenském i textilním průmyslu a celulóza je také významnou součástí v samotném dřevu.

Vzhledem k tomu, že buněčná stěna je základní komponentou rostlinných buněk, je nezbytné, abychom této struktuře porozuměli co nejlépe. Základní složky buněčné stěny jsou tvořeny polysacharidy hemicelulózou, pektinem a především celulózou. Celulóza primární i sekundární buněčné stěny je produkována proteinovými komplexy CSC tvořenými enzymy celulózasyntázami, které jsou lokalizované na plazmatické membráně.

Architektura i vznik buněčné stěny rostlinných buněk je ovlivňována nemalou vahou cytoskeletem, který je s buněčnou stěnou funkčně velmi těsně spojen. Tato práce se věnuje dynamice CESA komplexů u mutantních rostlin s defektním ARP2/3 komplexem. Arp2/3 komplex je jeden ze dvou známých nukleátorů aktinu u rostlin. ARP2/3 komplex jakožto nukleátor dává vznik novým aktinovým vláknům v úhlu zhruba 70° ze základu již existujícího aktinového filamenta.

Dlouho známým faktem je, že na tvorbu celulózy má nesporně vliv mikrotubulární cytoskelet. V poslední době se v mnoha pracích ukazuje, že i aktinový cytoskelet ovlivňuje syntézu celulózy. Otázkou je, zda ARP2/3 komplex nemá u rostlin kromě nukleace aktinu i další důležité úlohy. K této úvaze přispívá i nedávné zjištění, že rostliny s nulovými mutacemi vybraných podjednotek ARP2/3 komplexu mají v dospělosti snížený obsah celulózy a naopak je navýšen obsah pektinů. Hlavním cílem této práce je zjistit, zda a jak je ovlivněna dynamika enzymů celulózasyntáz (CESA) na plazmatické membráně v rostlinách s nefunkčním ARP2/3 komplexem.

2 Literární přehled

2.1 Rostlinný cytoskelet

Cytoskelet tvoří v buňkách trojrozměrnou velmi dynamickou síť proteinů, která je nezbytná pro většinu fyziologických procesů buňky nebo se na nich cytoskelet přinejmenším velmi významně podílí. V eukaryotních buňkách se vyskytují tři základní složky cytoskeletu: mikrotubuly (MT), aktinová (mikro)filamenta (AF) a intermediární filamenta (IF). Intermediární filamenta se vyskytují především v živočišných buňkách, u rostlin zatím nebyla jednoznačně prokázána jejich úloha.

Rostlinné buňky (až na výjimky) sice nemají schopnost lokomoce, jako tomu je u některých typů živočišných buněk, pro život rostlinné buňky však není cytoskelet o nic méně důležitý. I kvůli nepohyblivosti jednotlivých rostlinných buněk je důležité, aby vnitřní organizace buňky odpovídala jejím potřebám a právě mikrotubuly a aktinová mikrofilamenta zajišťují tuto organizaci a relokalizaci buněčných kompartmentů. Cytoskelet se podílí na zpracování signálů a velký význam má především při mitóze, cytokinezi, růstu a během morfogeneze buněk (Collings, 2008; Fu et al., 2005; Goode et al., 2000; Gutierrez et al., 2009; Petrášek and Schwarzerová, 2009; Szymanski, 2009).

Mikrotubuly jsou složeny ze dvou základních stavebních jednotek – z tubulinu α a β , které společně tvoří dimer. Z dimerů tubulinu jsou sestavována vlákna zvaná protofilamenta a ze třinácti protofilament spojených podélně k sobě je sestaven mikrotubulus do tvaru duté trubice o průměru 25nm. Dle potřeby buňky mohou mikrotubuly depolymerovat a znovu případně polymerovat. V rámci ontogeneze buňky se mikrotubuly seskupují do velmi specifických útvarů. Během interfáze tvoří mikrotubuly pod plazmatickou membránou seskupení zvané kortikální mikrotubuly. Při dělení jádra mizí kortikální mikrotubuly a vznikají útvary pro dělení jádra a následně i celé buňky – předprofázový prstenec, dělicí vřeténko a fragmoplast.

Aktinová mikrofilamenta jsou složena pouze ze dvou vláken stočených do společné šroubovice, přičemž jejich základní jednotka je molekula aktinu. Stejně jako u mikrotubulů se u aktinového vlákna rozlišuje + a – konec. Reorganizaci aktinových vláken pomáhá zajistit evolučně konzervovaný mechanismus nukleace nových vláken skrze forminy anebo pomocí ARP2/3 komplexu (Pollard, 2007).

Samotné mikrotubuly ani aktinová vlákna by však pro buňku nebyly dostačující vzhledem k mnoha různým funkcím, které cytoskelet musí zajistit. Mikrotubuly i aktinová vlákna asociují s celou řadou cytoskeletálních proteinů, některé se umí navázat na MT i AF a některé se váží specificky pouze na jeden typ cytoskeletu, celá řada těchto proteinů je také specifická pouze pro rostlinnou říši. Nazýváme je proteiny asociované s cytoskeletem.

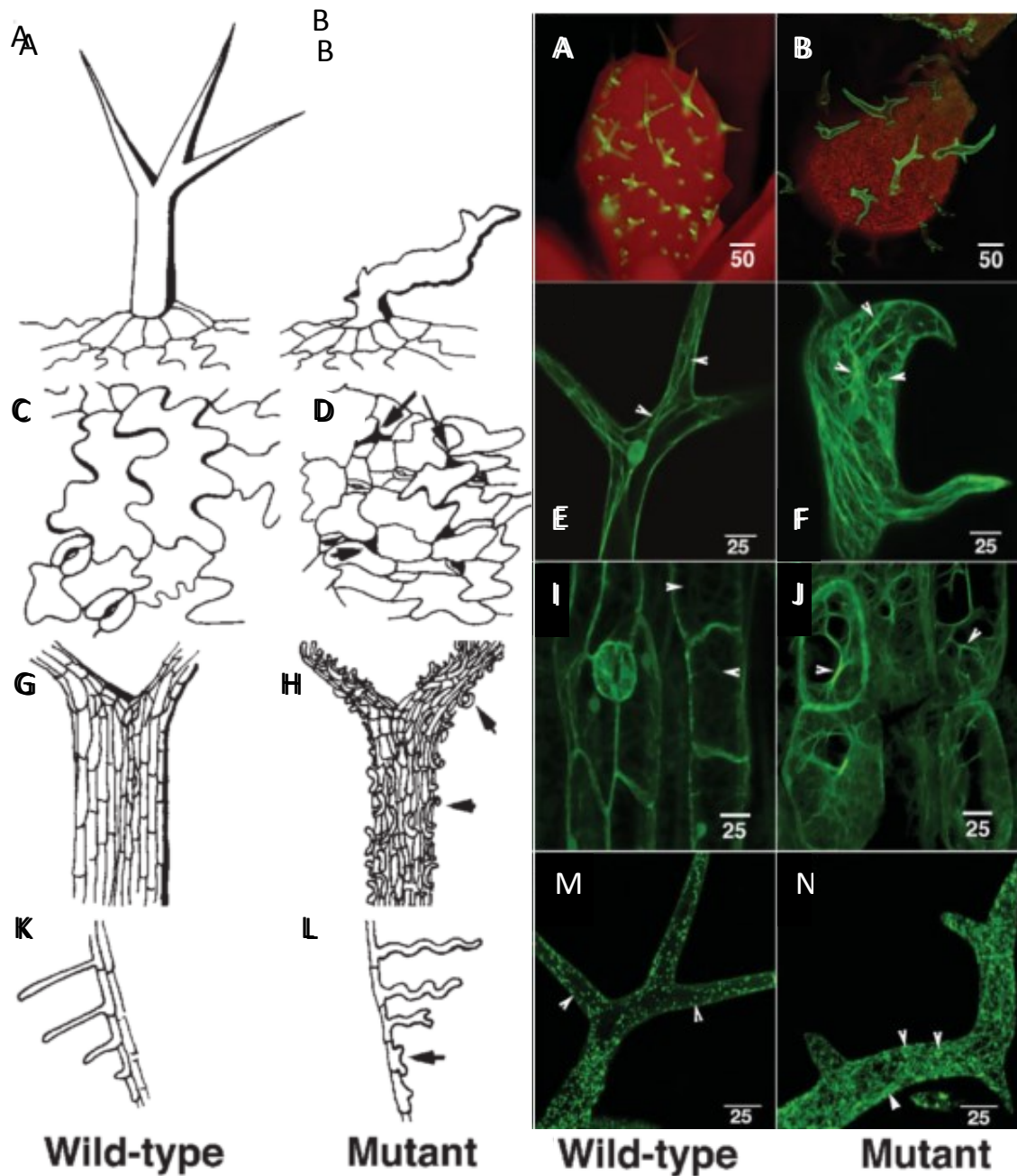
2.2 ARP2/3 komplex

ARP2/3 komplex se skládá celkem ze sedmi proteinových částí (viz Obrázek 2). Dva proteiny ARP2 a ARP3 (actin-related proteins) jsou příbuzné aktinu a dalších pět jsou aktinu nepříbuzné podjednotky komplexu ARPC1-5 (actin-related protein complex components) (Machesky a Gould, 1999; Mathur, 2005).

ARP2/3 komplex je nukleátorem nové větve aktinového vlákna pod úhlem 70° (Yang and Svitkina, 2011), ale ke své funkci vyžaduje aktivační faktor NPF (nucleation promoting factor) (Rotty et al., 2013; Yanagisawa et al., 2013). V případě rostlinného ARP2/3 komplexu byl zatím identifikován jako NPF pouze SCAR/WAVE komplex (Basu et al., 2005).

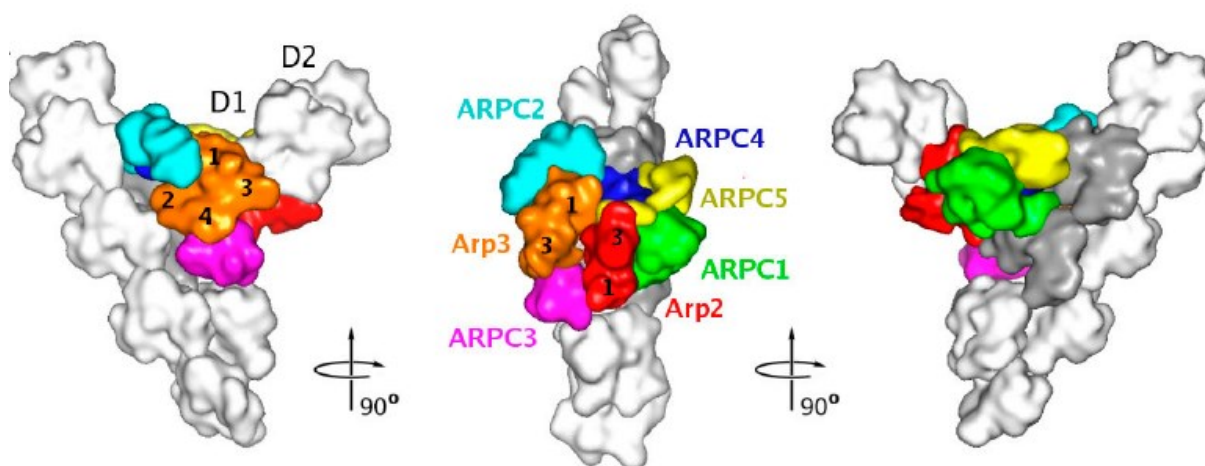
Mutanti *Arabidopsis* postrádající jednu z podjednotek ARP2/3 komplexu se řadí mezi skupinu mutantů projevující se tzv. distorted fenotypem, to znamená, že jejich trichomy jsou krátké a zkroucené (Hülkamp et al., 1994). Celkem bylo do skupiny *DISTORTED* zařazeno 8 genů *Arabidopsis*: *ALIEN*, *CROOKED*, *DISTORTED1*, *DISTORTED2*, *GNARLED*, *KLUNKER*, *SPIRRIG* a *WURM* (Hülkamp et al., 1994). Čtyři z těchto genů již byly identifikovány jako geny pro proteiny ARP2/3 komplexu – *WURM* pro ARP2, *DISTORTED1* pro ARP3, *CROOKED* pro ARPC5 a *DISTORTED2* pro ARPC2 (El-Assal et al., 2004; Le et al., 2003; Li et al., 2003; Mathur et al., 2003a; Mathur et al., 2003b; Saedler et al., 2004).

Samostatně se mutantní rostliny s defektním ARP2/3 komplexem řadí do skupiny *arp* mutantů. Mutace *ARP* genů se projevují také ztrátou komplexního tvaru buněk epidermis, omezenou elongací a mírným nabobtnáním buněk hypokotylu a kořenových vlásků (El-Assal et al., 2004; Le et al., 2003; Li et al., 2003; Mathur et al., 2003a; Mathur et al., 2003b; Saedler et al., 2004). Další projevy ARP mutací viz Obrázek 1.



Obrázek 1: Fenotypové projevy ARP mutantů (Mathur et al., 2005). Vlevo schéma fenotypů wild-type epidermálních buněk *Arabidopsis* oproti fenotypu shodným pro všechny arp mutanty (El-Assal et al., 2004; Le et al., 2003; Li et al., 2003; Mathur et al., 2003a, 2003b; Saedler et al., 2004). Vpravo fluorescence in vivo wild-type rostlin ve srovnání k arp mutantovi. (A) Větvený trichom listové epidermis wild-type *Arabidopsis*. (B) Deformovaný trichom listu ARP mutantu. (C) Pokožkové buňky děložníholistu wild-type rostlin. (D) Pokožkové buňky kotyledon mutantu mezi sebou mají mezery (šipky) a ztrácí obvyklý tvar. (E, F) Vizualizovaná organizace F-aktinu pomocí GFP-mTalinu (Kost et al., 1998) v (E) dospělém wild-type trichomu s typickými podélnými svazky aktinu (šipky), oproti tomu v (F) *arp2/wurm* mutantovi vykazuje F-aktin podstatně zvýšené svazkování a náhodná laterální spojení mezi aktinovými svazky (šipky). (G) Pokožkové buňky hypocotylu wild-type rostlin. (H) Kadeřnaté a kratší epidermální buňky hypocotylu (projev lze posílit změnou růstových podmínek) (Mathur et al., 2003a, 2003b). (I) Buňky hypocotylu wild-type rostoucí na světle mají aktinové svazky protáhlé (šipky) a je viditelná difúzní aktinová síť. Značeno GFP-mTalin. (J) Hypokotylové buňky *arpc5/crooked* mutantu rostoucího za stejných podmínek, který také exprimuje rovněž GFP-mTalin, mají nabobtnalý tvar a je vidět mnohem více svazků F-aktinu (šipky). (L) Kořenné vlásky arp mutantu jsou oproti WT (K) více náchýlné k vlnění a na jednom trichoblastu se může objevit více míst značící začátek apikálního růstu kořenného vlásku (šipka). Projev lze opět posílit změnou růstových podmínek (Mathur et al., 2003a, 2003b). (M) Vizualizované Golgi váčky pomocí GFP-ERF (Boevink et al. 1998) jsou v trichomech WT rozeznatelné jednotlivě (šipky). (N) V trichomech *arpc5/crooked* mutantu je znatelný nárůst v počtu a shlukování Golgiho váček (šipky). Golgiho váčky v trichomech *crk* také fluktuji v rychlosti, což pro WT není obvyklé (Mathur et al., 2003b).

V rostlinách byl ARP2/3 komplex navržen jako pravděpodobný mechanismus pro reorganizaci aktinu u pohybu buněk průduchů, při působení solného stresu, při intenzivní elongaci kořenových buněk a během interakce mezi hostitelskou rostlinou a symbiotickou bakterií (Dyachok et al., 2008, 2011; Jiang et al., 2012; Li et al., 2014; Zhao et al., 2013; Miyahara et al., 2010; Hossain et al., 2012). Yanagisawa et al. (2015) na základě GFP-ARPC5 in vivo pozorování naznačili, že tvorba aktinové sítě ve špičce větve trichomu závislá na ARP2/3 komplexu ve spolupráci se zónou bez mikrotubulů dává vzniknout polarizovaným cytoplazmickým svazkům aktinu, které jsou potřebné pro správnou dopravu a sestavení komponentů buněčné stěny rostoucího trichomu.

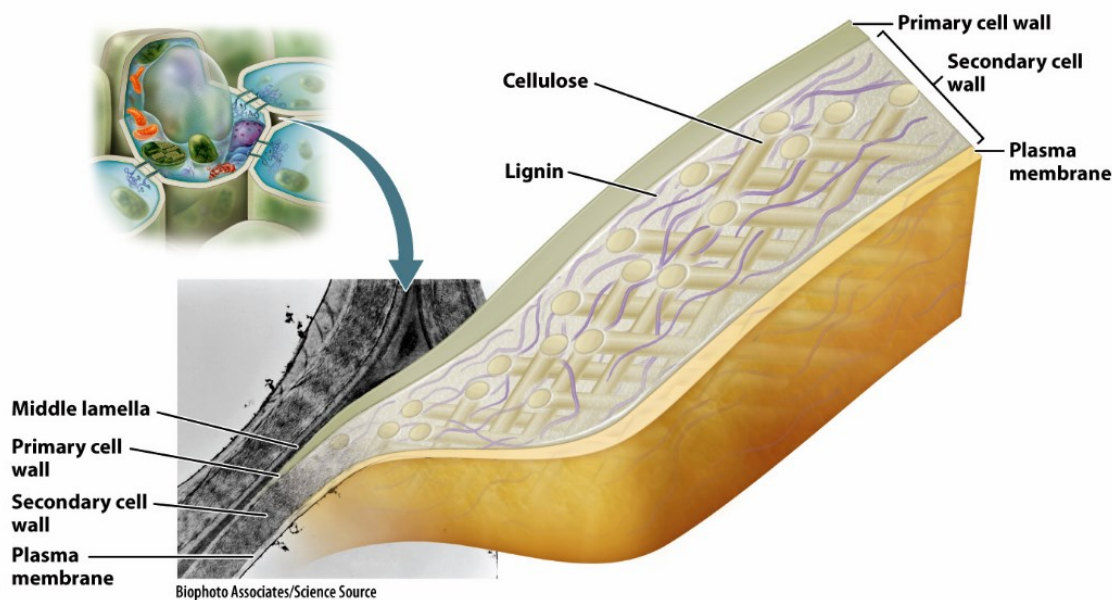


Obrázek 2: Model ARP2/3 komplexu ze tří různých úhlů (Rouiller et al., 2008). Šedivě znázorněny aktinové podjednotky, D1 a D2 jsou první dvě podjednotky v novém aktinovém vlákně. Barevně vyznačen ARP2/3 komplex. Nejmenší podjednotkou v komplexu je ARPC5 (Li et al., 2003; Mathur et al., 2003b).

2.3 Buněčná stěna

Buněčná stěna rostlinných buněk je složena ze tří základních vrstev (viz Obrázek 3). Při buněčném dělení vzniká jako první střední lamela, která je tvořena převážně pektiny. Primární buněčná stěna se formuje po vzniku střední lamely a po ukončení růstu buňky se může tvořit ještě sekundární buněčná stěna, která je sama o sobě často ještě dělena na vrstvy S1, S2 a S3 dle orientace celulózních mikrofibril (Beck, 2010). Všechny vrstvy buněčné stěny jsou tvořeny především polysacharidy, ale obsahují také proteiny, aromatické látky a molekuly vody i solí. Buněčná stěna obsahuje mikrofibrily celulózy a amorfni matrix tvořenou pektiny, hemicelulózami (Brett a Waldron, 1990). Polymery celulózy a hemicelulózy dodávají buněčné stěně pevnost, přičemž jsou v matrix stabilizovány různými proteiny a fenolickými látkami. Amorfní pektiny dovolují molekulám fluidní pohyb skrze matrix buněčné stěny (Ochoa-Villarreal et al., 2012).

Buněčné stěny cévnatých rostlin obsahují zhruba 30 % celulózy, 30 % hemicelulóz a 35 % pektinů s určitým podílem strukturálních proteinů od 1-5 % (Ochoa-Villarreal et al., 2012; Ridley et al., 2001; Smole et al., 2005). Primární buněčná stěna se skládá především z celulózy, neutrálních hemicelulóz a kyselých pektinů. Tato bariéra obklopuje cytoplazmatickou membránu s protoplastem. Sekundární buněčná stěna se tvoří u specializovaných buněk, ukládána je směrem dovnitř pod primární buněčnou stěnu (viz Obrázek 3). Na rozdíl od primární buněčné stěny sekundární buněčná stěna obsahuje velmi málo pektinů a naopak více celulózy – dle funkce a druhu od 40 %. Velmi často je sekundární buněčná stěna lignifikovaná. Sekundární buněčnou stěnu mají například sklerenchymatické buňky nebo tracheální elementy.



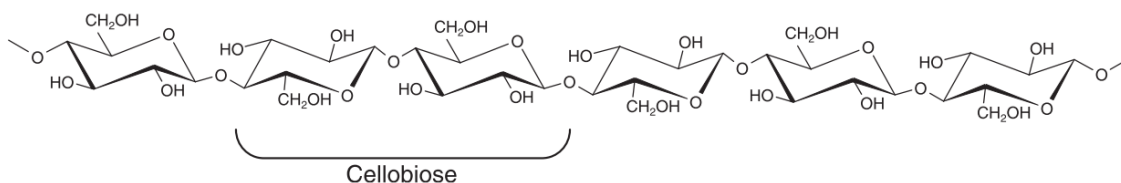
Obrázek 3: Struktura buněčné stěny. Pokud má buňka vytvořenou sekundární buněčnou stěnu, pak leží nad plazmatickou membránou a nad ní je vrstva primární buněčné stěny, která je od další buňky oddělena vrstvou střední lamely. (Dostupné z:

http://www.macmillanhighered.com/BrainHoney/Resource/6716/digital_first_content/trunk/test/morris2e/asset/img_ch10/morris2e_ch10_fig_10_15.html)

2.4 Celulóza:

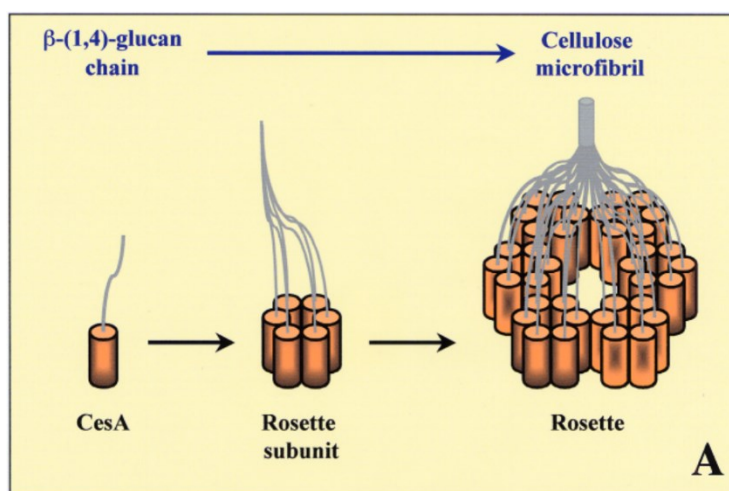
Celulóza je nejdůležitějším polysacharidem rostlinné buněčné stěny. Jedná se o lineární řetězec glukózových jednotek ($C_6H_{12}O_6$ – viz Obrázek 4). Spojením dvou glukózových jednotek vzniká molekula celobiózy ($C_{12}H_{22}O_{11}$). Opakující se glukózy spojené glykosidovou vazbou β -1,4 pod úhlem 180° tvoří glukanové řetězce (Festucci-Buselli et al., 2007). Základní celulózní jednotkou v rostlinách je mikrofibrila, ve které jsou jednotlivé glukanové řetězce vzájemně propojeny vodíkovými vazbami (Nishiyama, 2009).

Má se za to, že mikrofibrila je tvořená z 18 až 36 glukanových řetězců, ale v posledních letech se upřednostňuje spíše model s 18-24 řetězci, jak je popsáno níže.



Obrázek 4: Část β -1,4 glukanového řetězce. Označena je opakující se jednotka celobiózy (Taylor, 2008)

Stejně jako kalóza je celulóza glukanový polysacharid buněčné stěny, který je syntetizován přímo na plazmatické membráně. Ostatní polysacharidy jsou tvořeny v Golgiho aparátu a poté sekretovány do apoplastu. Tvorbu celulózních mikrofibril zajišťují proteinové celulózasyntázové terminální komplexy (CSCs - cellulose synthase complexes) dopravené na plazmatickou membránu (PM) (Doblin et al., 2002). Celulózasyntázové komplexy (CSCs) jsou proteinové komplexy obsahující vždy několik enzymů celulózasyntáz A (CESAs – Cellulose synthases A – viz Obrázek 5). Struktura mikrofibrily je přinejmenším částečně dána strukturou CSC (Kumar et al., 2018). Při tvorbě celulózy mají důležité úlohy pochopitelně i další proteiny, např. KORRIGAN, sacharózasyntáza, cytoskeletální proteiny, COBRA-like proteiny a objevují se stále další (viz Obrázek 10).



Obrázek 5: Jednotlivé CESA proteiny tvoří rozetovou podjednotku, která se v hexamerní sestavě skládá v CESA komplex. Dle tohoto modelu každý CESA protein produkuje β -1,4 glukanový řetězec. Jednotlivé glukanové řetězce se následně spojí v celulózní mikrofibrilu (Doblin et al., 2002).

Celulózní mikrofibrily svým uspořádáním v buněčné stěně těsně u PM regulují tvar buňky, neboť dovolují růst buňky rychleji v kolmém směru proti jejich uspořádání, protože dochází k roztahování jejich řad od sebe, v podélném směru k uloženým mikrofibrilám je růst buňky také umožněn, ale roztažnost je mnohem menší, a růst v tomto směru je tedy i

pomalejší. Bez kontrolovaného ukládání celulózních mikrofibril by buňka rostla izodiametricky (rovnoměrně do všech směrů). Příkladem tvarování růstu buněk řízeným ukládáním celulózních mikrofibril jsou buňky v elongační zóně kořene mnoha druhů rostlin. Kromě určování směru růstu buněk během fáze jejich expanze, mikrofibrily daný tvar buněk udržují společně s ostatními částmi buněčné stěny i po ukončení fáze růstu.

2.5 Historie objevu CSCs

Celulózasyntázové komplexy byly poprvé pozorovány pomocí elektronové mikroskopie již v roce 1972 a tehdy byly popsány jako granule transportované na membránu v plochých váčcích (Dobberst a Kiermaye, 1972; Robinson et al., 1972).

Brown et al., 1976 pozorovali podobné granule, jak u bakterie *Acetobacter xylinum*, tak v eukaryotní řase *Oocystis*. Na konci celulózních mikrofibril byla pozorována spojení s komplexy, přičemž jeho částice byly uspořádány do trojřad, proto byly komplexy poprvé pojmenovány jako lineární terminální komplexy (TCs) (Brown a Montezinos, 1976). O čtyři roky později byla zachycena poprvé syntéza mikrofibril i u vyšších rostlin a zároveň prokázána další forma terminálního komplexu v podobě rozety s hexamerní symetrií (Mueller a Brown, 1980). Od té doby byly rozetové komplexy mnohokrát pozorovány (Chapman a Staehelin, 1985; Giddings et al, 1980; Haigler a Brown, 1986; Herth a Weber, 1984; Hogetsu, 1983; Juniper et al, 1981; Schneider a Herth, 1986).

Spekulace o jejich úloze rozet jako jednotkách syntetizujících celulózu se objevily již dlouho předtím, než byl poprvé identifikován gen *CESA* v *A. xylinus* (Saxena et al., 1990; Wong et al., 1990). Geny pro *CESA* proteiny ve vyšších rostlinách byly poprvé identifikovány až v roce 1996 u bavlny na základě sekvenční homologie s již známými bakteriálními *CESA* geny (Pear et al., 1996).

Kimura et al. (1999) přispěli k utvrzení ve spojení mezi rozetovými komplexy a *CESA* proteiny, když se jim zdařilo pozorovat terminální komplexy vizualizované metodou imunodetekce pomocí *CESA* protilátek označených koloidním zlatem. Převratným krokem pro studium CSCs byla vizualizace *CESA* proteinů pomocí fluorescenčně značených proteinů. S fluorescenčním proteinem byly spojeny následující *CESA* proteiny *Arabidopsis thaliana*: AtCESA7 sekundární buněčné stěny (Gardiner et al., 2003; Wightman et al., 2009; Wightman a Turner, 2008) a dále primární *CESA* proteiny AtCESA6 (Paredes et al., 2006), AtCESA3 (Desprez et al., 2007) a AtCESA5 (Bischoff et al., 2011).

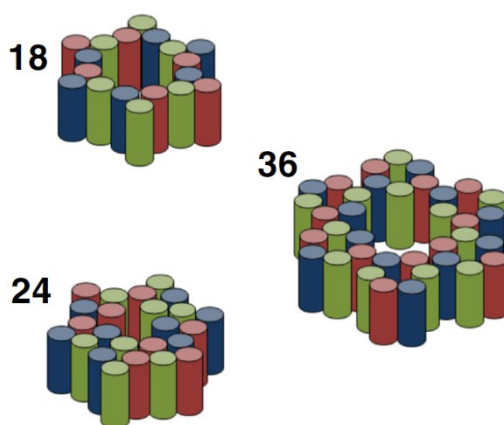
2.6 Geny CESA

CESA patří do rodiny membránově vázaných glykosyltransferáz (GT-2) (Sethaphong et al., 2013). V genomu *Arabidopsis* byla objevena velká rodina genů pro biosyntézu celulózy, z toho 10 genů *CESA* (*CESA1-10*) je pro celulózasyntázy a 29 genů pro CSL (cellulose synthase-like) proteiny (Carpita, 2011). Deset hlavních *CESA* genů bylo v *Arabidopsis* identifikováno hned po kompletním sekvenování jejího genomu (Richmond, 2000; Richmond a Somerville, 2000). Velikost jednotlivých *CESA* genů se pohybuje v rozmezí od 3,5 do 5,5 kb a jsou tvořeny 985 až 1088 aminokyselinami (Richmond, 2000).

Analýza exprese celulózasyntázových genů v *Arabidopsis* odhalila expresi většiny *CESA* genů ve většině orgánů (Williamson et al., 2002). *AtCESA4*, *AtCESA7* a *ATCESA8* jsou geny nezbytné pro tvorbu sekundární buněčné stěny (Taylor et al., 1999, 2000, 2003; Turner a Somerville, 1997). Taylor et al. (2003) a Timmers et al. (2009) ukázali, že tyto tři geny jsou exprimovány společně a také, že proteiny, které kódují, jsou součástí stejného komplexu. Syntézu primární buněčné stěny obstarávají *AtCESA1*, *AtCESA3* a *AtCESA6* (Arioli et al., 1998; Fagard et al., 2000; Scheible et al., 2001). *ATCESA2*, *AtCESA5* a *AtCESA9* jsou částečně redundantní s *AtCESA6*, proto jsou označovány jako *AtCESA6*-like geny (Desprez et al., 2007; Persson et al., 2007). Pro *AtCESA10* nebyla zatím zjištěna žádná konkrétní úloha (Kumar a Turner, 2015).

2.7 Modely CESA komplexu:

Každá celulózasyntáza v CSC komplexu produkuje jeden glukanový řetězec celulózového vlákna. Více glukanových řetězců může být syntetizováno různými geny



Obrázek 6: Model 18-36CESA proteinů v komplexu CSC (Schneider et al., 2016). Tři různé barvy v modelu značí tři různé CESA proteiny potřebné pro syntézu celulózní mikrofibrily, v komplexu jsou pravděpodobně v poměru 1:1:1

celulózasyntáz v každém terminálním komplexu (Persson et al., 2007). Počet glukánových řetězců vznikajících v jednom komplexu je odhadován u vyšších rostlin na osmnáct až třicet šest. Na základě těchto informací byl vytvořeny heterotrimerické modely 18-36 CESA proteinů (Doblin et al., 2002; Scheible et al., 2001; Schneider et al., 2016; Taylor et al., 2003 – viz Obrázek 6).

Měření dle Mueller a Brown (1980) naznačila, že pozorované rozety mají v průměru $24 \pm 2,5$ nm a obsahují 6 částic, kde podle nich má každá část 6 celulózasyntázových polypeptidů. Nedlouho poté byl jako první navržen 36 řetězcový model (Herth, 1985).

Kromě 36 řetězcového modelu existují další dva alternativní modely pro strukturu CSCs. Ve 24 řetězcovém modelu tvoří jednotku tři CESA polypeptidy a osm jednotek tvoří rozetovou formaci. V 18 řetězcovém modelu jsou rozety ze šesti jednotek, každá tvořena třemi cellulózasyntázovými polypeptidy.

V potaz je však potřeba také brát v úvahu výskyt tzv. twinningu mikrofibril (Fernandes et al., 2011), což je jev, při kterém spolu mikrofibrily podélně alespoň částí své délky v podstatě splývají v širší mikrofibrilu a mohou tak ovlivňovat měření šířek celulóznic mikrofibril. Výsledky práce Fernandes et al. (2011) se nejvíce shodují s 24 řetězcovým modelem, autoři sami ale uznávají, že model 18 řetězcové mikrofibrily by také dobře odpovídal, pokud by se kalkulace modelu prováděla včetně započítání twinningu (Fernandes et al., 2011; Thomas et al., 2013). Newman et al. (2013) ukazují data nejlépe odpovídající 18 řetězcové mikrofibrile při výpočtech s výskytem twinningu, ale opět nemohou vyloučit ani 24 řetězcový model pro nedostatečně známou míru výskytu twinningu.

Teoreticky vypočítaná plocha průřezu 36 řetězcové mikrofibrily se ukázala být větší než změřený průměr mikrofibrily z nedávných experimentů (Jarvis 2013). Vandavasi et al. (2016) a Nixon et al. (2016) se v nejnovějších studiích shodují, že CSC obsahuje hexamer CESA trimerů, každá část hexameru se tedy skládá ze tří CESA podjednotek. Společně s ostatními novodobými studii údaje ukazují, že rostlinná mikrofibrila obsahuje spíše 18 – 24 glukánových řetězců, ale 36 řetězcový model stále nebyl zavržen, neboť existuje i názor, že některé celulózasyntázy nemusí být v komplexu aktivní a tvoří se tak menší počet řetězců než komplex obsahuje syntázy (Fernandes et al., 2011; Kennedy et al., 2007; Newman et al., 2013; Thomas et al., 2013, Vandavasi et al., 2015; Wang a Hong, 2016). Pro konečné ujasnění správnosti modelu je potřeba určit přesné složení a stechiometrie CESAs obou typů stěn. Betancur et al. (2010) navíc ukázal, že rodina primárních CESA podporuje tvorbu

sekundární buněčné stěny u trichomů *Arabidopsis*. Stork et al. (2010) a Mendu et al. (2011) poukázali na funkci primárních CESAs ve formaci sekundární buněčné stěny také v osemeni.

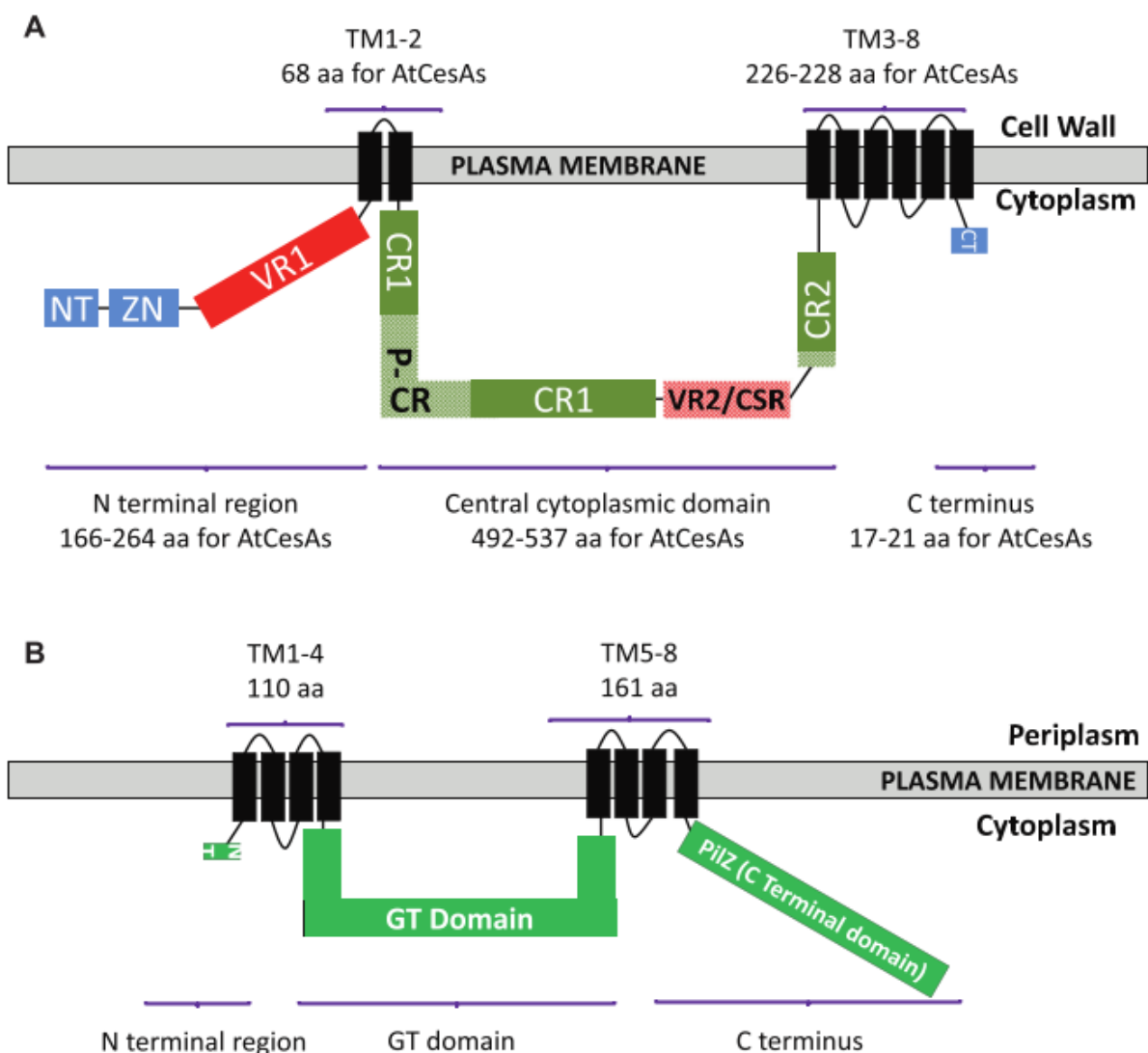
Struktura CSCs je, jak se zdá, v zelených rostlinách konzervována, ale vyskytují se rozdíly v produkci syntetizované celulózy - například mikrofibrily primární stěny jsou obecně tenčí než mikrofibrily sekundární buněčné stěny (Cosgrove a Jarvis, 2012). Salmén (2004) a Li et al. (2016) navrhuji, že rozdíly ve velikostech jsou výsledkem produkce od více než jednoho CSC, tedy, že produkované řetězce z více než jednoho CSC se spojily do jedné mikrofibrily. Úvahu podporují i objevy twinningu mikrofibril (Fernandes et al., 2011; Thomas et al., 2013).

2.8 Struktura a dynamika CESA proteinů

Jak již bylo zmíněno, u vyšších rostlin CESA podjednotky formují hexamerní rozety, které jsou tvořeny nejméně ze tří různých izoform CESA polypeptidů. Samotná rozeta s CESA proteiny má průměr zhruba 20-30 nm, ale po započítání asociovaných proteinů na plazmatické membráně podílejících se také na funkci komplexu, má celý CESA komplex v průměru 40-50 nm (Bowling and Brown, 2008). CESA proteiny jsou katalytickou částí CSC, přičemž byla prokázána interakce katalytických jednotek i s dalšími proteiny (Gu et al., 2010; Vain et al., 2011; Endler et al., 2015; Liu et al., 2016).

Nejméně tři různé třídy CESA proteinů jsou potřeba pro formaci CSC. Zatím se stále mnoho neví o organizaci jednotlivých CESA proteinů v rámci CSC. Hromadí se ale důkazy, že jednotlivé třídy CESA se od sebe liší nejen třídově specifickými doménami, ale i na úrovni celého proteinu (Kumar et al., 2017). Imunoprecipitace a hmotnostní spektroskopie potvrdily domněnku o rovnoměrném poměru v zastoupení CESA1, CESA3 a CESA6 v CSC primární buněčné stěny a stejně bylo vyzorováno u podjednotek sekundární buněčné stěny CESA4, CESA7 a CESA8 (Hill et al., 2014; Gonneau et al., 2014). V posledních letech se potvrzuje domněnka, že jedna izoforma CESA může za určitých podmínek v celém komplexu ovlivňovat syntézu celulózy mnohem více než izoformy jiné (Chen et al., 2010; Hu et al., 2018). Kumar et al. (2017) se domnívají, že jednotlivé třídy CESA proteinů potřebných k syntéze ve vyšších rostlinách zřejmě zaujímají v rozetě jedinečně určené postavení.

CESA proteiny mají konzervovanou doménovou strukturu (viz Obrázek 7), která obsahuje prodlouženou N-terminální doménu obsahující motiv zinkového prstu, osm transmembránových domén a velkou centrální katalytickou doménu obsahující aminokyseliny sestavené jako v rodině glykosyltransferáz 2 (Speicher et al., 2018). V mnoha ohledech se struktura rostlinného CESA proteinu podobá bakteriálnímu (viz Obrázek 7). Pear et al. (1996) objevili vysoce konzervovaný úsek ve struktuře rostlinných CESAs nazvaný P-CR (plant-specific conserved region), který se ale v bakteriích nevyskytuje. Druhý region ve struktuře CESA specifický pro rostliny objevil Delmer (1999) a byl nazván



Obrázek 7: Schéma rostlinné (A) a bakteriální (B) celulózasyntázy (Kumar, Turner, 2015). Jednotlivé bloky představují domény spojené konektory náhodné délky. (A): Dva regiony TM jsou bokem k centrální katalytické doméně. N-terminální region obsahuje krátký N konec (NT), konzervovaný zinkový prst (ZN) a variabilní oblast VR1. Centrální katalytická doména obsahuje region VR2, který je z obou stran obklopen regiony CR1 a CR2. Bakteriální katalytická doména je podstatně kratší, především protože postrádá dva rostlinně specifické regiony P-CR (Plant-Conserved Region) a třídově specifickou oblast CSR.

HVR (hyper-variable region). Dohromady tyto regiony tvoří třídivě specifickou doménu CSR (class specific region) (Vergara a Carpita, 2001).

Aktivační mechanismus produkce celulózy enzymovým komplexem není znám, v současnosti se uvažuje, že by roli mohla hrát fosforylace. Pohyb celého komplexu po fluidní plazmatické membráně způsobuje zřejmě samotná katalytická aktivita CESA. Glukanové řetězce krystalizují v mikrofibrily a propojují se v síti ostatních polymerů buněčné stěny, další syntéza nových glukanových řetězců tak způsobí odsunutí celého komplexu v membráně od zkrystalizované části mikrofibrily.

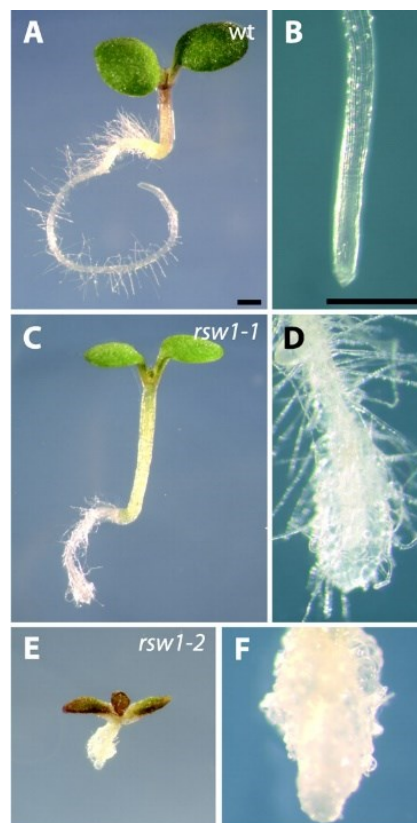
CESAs primární buněčné stěny byly pozorovány na PM *in vivo* konfokálním mikroskopem vybaveným spinning diskem jako výrazné částice pohybující se konstantní rychlostí v obou směrech v průměru 200-350 nm/min (Bischoff et al., 2011; Desprez et al. 2007; Gu et al., 2010; Paredez et al., 2006; Persson et al., 2007). Tato rychlost podle Paredez et al. (2006) odpovídá tvorbě 300-1000 glukózových zbytků v řetězci za minutu. Rychlost byla vždy vypočítána na základě vytvořených kymogramů. V osemení kolem kolumely je podle Griffiths et al. (2015) rychlost CESA komplexů nižší než 100 nm/min.

Pomocí metody FLIP (fluorescence loss in photobleaching) byla určena rychlost YFP-CESA7 sekundární buněčné stěny ve vyvíjejícím se xylému *Arabidopsis* na 7 $\mu\text{m/s}$, což je více než tisíckrát rychlejší než změřené rychlosti primárních CESA proteinů (Wightman et al., 2009). Je však velmi pravděpodobné, že naměřené částice pochází z ve skutečnosti z vrstvy pod membránou, kde k této vysoké rychlosti může přispívat cytoplazmatické proudění.

2.9 Mutace *CESA* genů

Vzhledem ke známým faktům o mutantech *rsw1* (*radial analyses swelling*), je **CESA1 (RSW1)** považován za esenciální protein v CSCs. Rostliny s mutantní alelou *rsw1-2* (viz Obrázek 8) jsou letální v embryonálním stádiu (Gillmor et al., 2002), nuloví mutanti *cesa1* jsou letální ve stádiu gametofytu (Persson et al., 2007) a teplotně senzitivní mutace *rsw1-1*

(viz Obrázek 8) způsobuje při působení vyšší teploty (29°C) zmizení CSCs z PM (Beeckman et al., 2002; Gillmor et al., 2002; Fujita et al., 2013). Ztráta CSCs má za následek snížený obsah celulózy vedoucí k izotropickému růstu buněk v kořeni i v hypokotylu a celkově k nižšímu růstu celé rostliny (Williamson et al., 2001). Arioli et al. (1998) u mutantu *rsw1-1* odhalili, že původ mutace leží ve změně jediné aminokyseliny AtCESA1 a mezi prvními poskytl přímý důkaz potvrzující funkci CESA v syntéze celulózy. V genu *CESA1* byla také objevena mutace *anisotropy1*, u které byla pozorována snížená rychlost CSCs (Fujita et al., 2013). Harris et al. (2012) identifikoval mutaci *aegeus* jako náhradu AK valinu za alanin na pozici 903 na C-konci *CESA1*. *aegeus* se vyznačuje zvýšenou rezistencí vůči inhibitoru biosyntézy celulózy quinoxifynu, podobně jako *ixr1* mutace *CESA3* zvyšuje rezistenci proti isoxabenu, ale *aegeus* nezpůsobuje rezistenci vůči isoxabenu a ani naopak *ixr1* není rezistentní vůči quinoxifynu (Harris et al., 2012). *cesa3^{ixr1}* i *cesa1^{aegeus}*



Obrázek 8: Fenotyp Wt, *rsw1-1* a *rsw1-2* semenáčků. Wt (A and B), *rsw1-1* (C and D), *rsw1-2* (E and F) po 5 dnech při 21°C. Měřítka pro A, C, E = 0,5 mm; pro B, D, F = 100 μ m. Převzato z Gillmor et al., 2002.

mutanti vykazují značně sníženou krystalinitu a zvýšenou rychlost CESA komplexů v plazmatické membráně oproti WT alelám *CESA3* a *CESA1* (Harris et al., 2012).

Druhým esenciálním enzymem v CESA komplexu je **CESA3 (IXR1)**, jeho nulová mutace *cesa3* je letální ve fázi gametofytu (Persson et al., 2007). Pro gen *CESA3* bylo nalezeno i několik mutantních alel se záměnou AK, které nezpůsobují pylovou sterilitu. *ixr1-1* a *ixr1-2* (*isoxaben-resistant*) jsou mutantní alely *CESA3* způsobující zvýšenou rezistenci vůči isoxabenu (herbicid inhibující syntézu celulózy ve vyšších rostlinách (Heim et al., 1990) a zároveň nevykazují trpasličí růst (Desprez et al., 2002; Robert et al., 2004). Oproti tomu další neletální mutace *CESA3 eli1-1* a *eli1-2* (*ectopic lignification1*) způsobují fenotyp trpasličího růstu (Robert et al., 2004) a ektopické ukládání ligninu v buňkách, kde by se normálně nevyskytoval (Cano-Delgado et al., 2000, 2003; Rogers et al. 2005). V *CESA3* mutantech *cevl* (*constitutive expression of vegetative storage proteins1*) a *eli1* jsou aktivovány jasmonátové a etylénové signální dráhy, přičemž jsou také up-regulovány

geny pro stresovou odpověď (Cano-Delgado et al., 2003; Elis a Turner 2001; Ellis et al., 2002; Hématy et al., 2017).

Třetím typem proteinu v CSC pro syntézu primární buněčné stěny je **CESA6** nebo zástupce ze třídy CESA6-like proteinů, což jsou **CESA2**, **CESA5** a **CESA9**. Na rozdíl od CESA1 a CESA3 proteinů nulová mutace *cesa6/prc1-1* není letální a projevuje se poměrně mírným fenotypem, který je spojován s deficitem celulózy (Fagard et al., 2000). *prc1-1* (*procuste*) mutant má zakrslé kořeny a hypokotyl (rostoucí za tmy), nápadné jsou radiálně rostoucí buňky a mezery mezi buněčnými stěnami (Fagard et al., 2002). Stejně jako gen *CESA3*, má *CESA6* mutantní alelu způsobující zvýšenou odolnost vůči herbicidu isoxaben *ixr2-1* (Desprez et al., 2002).

Důkaz úlohy CESA v sekundární buněčné stěně byl prokázán také zkoumáním mutantů, a sice mutantů *irx* (*irregular xylem*), kteří mají defekt v sekundární buněčné stěně v xylémovém pletivu projevující se v nepravidelných xylémových buňkách nebo jejich zhroucením a ve snížené mechanické pevnosti xylémových vláken. Konkrétně má mutant *irx1* (**CESA8**) změnu D23N, tedy kys. asparagová v pozici 13 AK řetězce se mění na asparagin. U *irx3* (**CESA7**) mutantu je vyměněn tryptofan se stopkodónem na pozici 859 a u mutantu *irx5* (**CESA4**) je glutamin nahrazen stopkodónem v pozici 263 (Taylor et al., 1999; Taylor et al., 2000; Taylor et al., 2003). Celkový přehled známých mutantních alel pro geny *CESA* vypracoval Maleki et al. (2016 – viz Tabulka 1).

TABLE 1: *Arabidopsis* CesA mutants and their phenotypes.

Gene name	Mutant alleles	Phenotype	References
CesA1	<i>rsw1-1 A549V</i>	Deficiency in cellulose content and number of TCs	[34]
	<i>aegeus A903V</i>	Quinoxiphen resistant, modified cellulose crystallinity	[44]
	<i>anyl D604N</i>	Reduction in cellulose crystallinity and CSC velocity	[45]
CesA3	<i>ixr1-1G998D</i>	Isoxaben resistance	[42]
	<i>ixr1-2 T942</i>		
	<i>cevl G617E</i>	Constitutive expression of JA and ethylene	[46]
	<i>elil-1 S301F</i> <i>elil-2 A522V</i>	Reduced cellulose synthesis, activating lignification and defense responses	[47]
CesA4	<i>irx5-1</i>	Irregular xylem, defective cellulose biosynthesis, dwarf plants	[32]
	<i>irx5-2 W995stop</i> <i>irx5-3 Q263stop</i>		
	<i>exi2 Y939stop</i>	Vascular defect, cell expansion defect, collapsed xylem, small rosette leaves, reducing the cell expansion	[37]
CesA6	<i>prc-19Y 275 STOP</i> <i>prc1-4/5W 777 STOP</i> <i>prc1-9K 7222 STOP</i> <i>prc1-1/3Q 720 STOP</i>	Stunted hypocotyl and roots; incomplete cell wall	[33]
	<i>ixr2-1 R1064W</i>	Resistance to isoxaben and semidominant allele	[43]
CesA7	<i>irx3 W859stop</i>	Irregular xylem and defective cellulose biosynthesis	[35]
	<i>fra5 P557T</i>		
	<i>mur10-1 W444stop</i> <i>mur10-2 H734Y</i>	Reduced fiber cell wall thickness and cellulose content No deposition of secondary wall	[48] [38]
	<i>exi5 W954stop</i>	Vascular defect, collapsed xylem, small rosette leaves, reducing the cell expansion	[37]
CesA8	<i>irx1-1 D683N</i> <i>irx1-2 S679L</i>	Irregular collapsed xylem and defective cellulose biosynthesis	[36]
	<i>fra6 R362K</i>	Recessive allele	[48]
	<i>lew2-1 W217stop</i> <i>lew2-2 L792F</i>	Leaf wilting, disruption of cellulose synthesis in SCW, increased tolerance to drought and osmotic stress	[39]
	<i>exi1-1 splicing variant</i> <i>exi1-2 G508E</i>	Vascular defect, cell expansion defect, collapsed xylem defect, small rosette leaves	[37]

Tabulka 1: Tabulka známých mutací CESA genů a jejich fenotypy (převzato z Maleki et al., 2016).

2.10 CSC a mikrotubuly

Údaje o asociaci kortikálních mikrotubulů s mikrofibrilami primární buněčné stěny jsou známé a dokumentovány již velmi dlouho (Hepler a Newcomb, 1964; Mueller a Brown, 1980; Quader et al., 1987; Baskin, 2001; Gardiner et al., 2003).

Green (1962) představil hypotézu v současnosti známou jako hypotéza souhlasné pozice mikrotubulu a mikrofibrily (microtubule-microfibril alignment hypothesis), která vysvětluje, že kortikální mikrotubuly svým umístěním pod PM kontrolují uspořádání a směr nově ukládaných celulózních mikrofibril na povrchu PM, aškoliv samotné kortikální mikrotubuly byly objeveny až později. Tato hypotéza byla posuzována u mnoha zelených řas (*Closterium acerosum*, *Oocystis solitaria*, *Nitella axillaris*) i Embryophyt (*Coleus blumei*, oves, *Arabidopsis*, kukuřice, bavlník) (Seagull, 1991; Baskin, 2001). Paredez et al. (2006) představil práci, ve které zkoumal lokalizaci mikrotubulů vůči celulózasyntázám primární buněčné stěny v živých rostlinách exprimujících fluorescenčně označené proteiny

CFP-TUA1 a YFP-CESA6. YFP-CESA6 částice byly lokalizovány na PM, přičemž jejich pohyb po lineárních trajektoriích byl shodný s mikrotubuly pod PM. Změny v orientaci mikrotubulů způsobené excitací modrým světlem způsobily i změnu v trase YFP-CESA6 proteinů. Paredez et al. (2006) také dokázal, že CSCs se pohybují i za konce mikrotubulů nebo po jejich zničení, což přispívá k myšlence, že samotný zdroj pohybové síly CSCs je na mikrotubulech nezávislý a mikrotubuly samotné nemusí být vždy určující pro směr pohybu CSCs. Kompletní depolymerace mikrotubulů vlivem oryzalinu způsobila stejnoměrnou distribuci CSCs na membráně (Crowell et al., 2009; Li et al. 2012).

Gardiner et al. (2003) ve své studii ukázali lokalizaci všech tří celulózasyntáz sekundární buněčné stěny - AtCESA4 (IRX5), AtCESA7 (IRX3), and AtCESA8 (IRX1). Proteiny CESA označené GFP byly pozorovány v tlustých pružích shodující se s pruhy kortikálních mikrotubulů označujících místa pro ukládání sekundární buněčné stěny ve vyvíjejícím se starším xylému *Arabidopsis*. Wightman a Turner (2008) testovali působením oryzalinu na propojení mikrotubulů a CSCs sekundární buněčné stěny. Po působení 45 min CFP značené mikrotubulární svazky zmizely společně s transverzálními pruhy proteinů CESA7 značených YFP, což naznačuje, že oproti primární buněčné stěně, pro tvorbu sekundární buněčné stěny mohou být mikrotubuly nepostradatelné (Gardiner et al., 2003; Wightman a Turner, 2008).

K vysvětlení hypotézy o souhlasné pozici mikrotubulu a mikrofibrily byly vytvořeny dva modely. Heath v roce 1974 předložil teorii o existenci přímého propojení mezi CESA komplexy a mikrotubuly. Druhý model byl založen se na myšlence mikrotubulů ovlivňovaných změnami fluidity PM, čímž by se omezoval pohyb CSCs (Herth, 1980). V tomto případě by nebylo potřeba žádné přímé interakce CESA komplexů a mikrotubulů. Ačkoliv nebyl předložen žádný přesvědčivý důkaz, druhý nepřímý model se stal více populárním a běžně byl uváděn v učebnicích (Alberts et al. 1994). Stále se však pátralo po proteinech interagujících s CESA, které mohou CSCs vázat k cytoskeletu. Jedním z řady takto identifikovaných proteinů je CSI1 (CESA interactive protein 1), který je označován také jako POM2. *csi1* nulové mutanti vykazují defektní buněčnou expanzi v hypokotylech a kořenech, s tím související úbytek obsahu krystalické celulózy, a dokonce je negativně ovlivněna pohyblivost CESA komplexu (Gu a Somerville, 2010; Gu et al. 2010).

Na základě následujících důkazů předložených Gu et al. (2010), Bringmann et al. (2012) a Li et al. (2012) byla uznána teorie přímého spojení CSCs s mikrotubuly přes CSI1 protein. CSI1-RFP proteiny lokalizovaly na PM jako zřetelné částice pohybující se v obou

směrech a s podobnou rychlostí jako GFP-CESA3. Zároveň se shodovala lineární trajektorie CSI1-RFP s mikrotubuly pod PM označené YFP-TUA5. Při odstranění CSI1 byla poškozena distribuce i pohyblivost CESA komplexů a narušilo se shodné uspořádání CSCs a mikrotubulů. Li et al. (2012) podpořili tvrzení o funkci CSI1 jako propojovacího proteinu mikrotubulů a CSCs pomocí demonstrace interakce CSI1 a mikrotubulů *in vitro*, kde CSI1, stejně jako konvenční proteiny vážící se na mikrotubuly, kosedimentoval s polymerizovaným tubulinem. Kromě toho Li et al. (2012) také ukázali, že *csi1* mutanti ztratili schopnost orientovat pohyb CSCs podle kortikálních mikrotubulů.

CSI1 nesdílí sekvenční homologii se známými strukturálními MAPs (microtubule-associated proteins), ale obsahuje několik tandemových kopií ARM (Armadillo) opakování, přičemž jsou známy proteiny s ARM opakováním ovlivňující cytoskelet (Li et al., 2012b). Vzhledem k tomu, že CSI1 se na mikrotubuly váže i *in vivo*, lze v dobré víře CSI1 považovat za jeden z MAP. CSI1 byl navíc nalezen u všech cévnatých rostlin, ale zda CSI1 představuje konzervovaný mechanismus pro shodné uspořádání mikrofibril s mikrotubuly, je potřeba ještě prokázat.

Delecí C2 domény CSI1 obsahující motiv armadillo došlo k nesprávné lokalizaci proteinu do cytosolu, Bringmann et al. (2012) tedy usoudili, že právě C2 doména dovoluje CSI1 interakci s CSC a zajišťuje jeho lokalizaci. Bylo ukázáno, že CSI1 kooperací s komplexem exocyst a rostlinně specifickým proteinem PATROL1 napomáhá de novo CSC sekreci (Speicher et al., 2018). V tomto roce bylo také naznačeno, že CSI1 skrze jeho interakce s mikrotubuly zřejmě označuje místo pro váčky obsahující CSC (Zhu et al., 2018).

Mutantní *csi1* rostliny jsou životaschopné i přes defekt v buněčném růstu. U *Arabidopsis* byly objeveny dva CSI1-like proteiny - CSI2 a CSI3. Bringmann et al. (2012) ukázal, že i trojitý mutant *csi1csi2csi3* je stále životaschopný, ale defekt je znatelně větší než u *csi1*. Vzhledem k viabilitě trojitého mutantu bylo usouzeno, že pravděpodobně existují i další proteiny, které zajišťují spojení mikrotubulů s CSCs.

Nedávno objevené rostlinně specifické proteiny CC1-4 (Companion of Cellulose Synthase 1-4) dokáží přímo interagovat C-terminální částí s CESA proteiny a N-terminální část s mikrotubuly (Endler et al., 2015). CC1-4 podle Endler et al. (2015) slouží v CESA komplexu jako ochrana proti působení abiotického stresu tím, že přispívá k obnově mikrotubulů po působení stresoru. Dalšími poměrně nově objevenými proteiny jsou CUM1-3 (Cellulose synthase-Microtubule Uncoupling 1-3). Kortikálním mikrotubulům spojených

s CSCs zřejmě CUM1-3 brání vychýlení ze správného umístění vlivem pohybu CESA komplexů proteiny (Liu et al., 2016).

2.11 CSC a aktin

V současnosti je již známo, že pro správnou distribuci, organizaci a dynamiku CSCs je zapotřebí nejen cytoskeletu mikrotubulárního, ale důležitý je i aktinový cytoskelet (Sampathkumar et al., 2013; Wightman a Turner, 2008). Crowell et al. (2009) a Gutierrez et al. (2009) prokázali, že v pokožkových buňkách hypokotylů *Arabidopsis*, které rostly ve tmě, je aktin vyžadován k pohybu a celkové distribuci Golgi váčků s lokalizovanými CESA komplexy. Mikrotubuly v tomto typu buněk označují místo pro doručení CSC primární buněčné stěny k plazmatické membráně. Chemický i genetický zásah způsobující rozrušení organizace aktinu inhiboval pohyb SmaCC/MASC v cytosolu a celkově byl snížen počet exocytujících váčků, což vedlo k deficienci celulózy (Breuer et al., 2017; Gutierrez et al., 2009; Sampathkumar et al., 2013).

Oproti tomu Wightman a Turner (2008) tvrdí, že v xylémových cévách k označení míst pro samotné doručení CSC nejsou nezbytné mikrotubuly, ale aktin. Vypracovali studii o vlivu aktinových vláken na intracelulárních přesunech CSCs sekundární buněčné stěny, které podle nich označují místa doručení CSC na plazmatickou membránu. V xylémových cévách jsou transverzální svazky aktinu blízko k místům tvorby sekundární buněčné stěny. Jejich tvrzení podporuje experiment s oryzalinem způsobující depolymeraci mikrotubulů, ale i přes to nebylo zabráněno v zastavování kompartmentů s CSC na místech tvorby buněčné stěny. V souladu s jejich tvrzením je také pokus s latrunkulinem B na rozrušení aktinu, což způsobilo ztrátu pruhů CSC.

Seagull již v roce 1990 publikoval práci, ve které popisuje reorientaci aktinových mikrofilament na vláknech bavlníku z axiálního vzoru na spirálovitý v závislosti na depozici sekundární buněčné stěny. Rozrušení aktinového cytoskeletu cytochalasiny v tracheálních elementech bavlníku a *Zinnia* vyústilo ve ztrátu organizovanosti celulózních mikrofilamentů (Seagull et al., 1990).

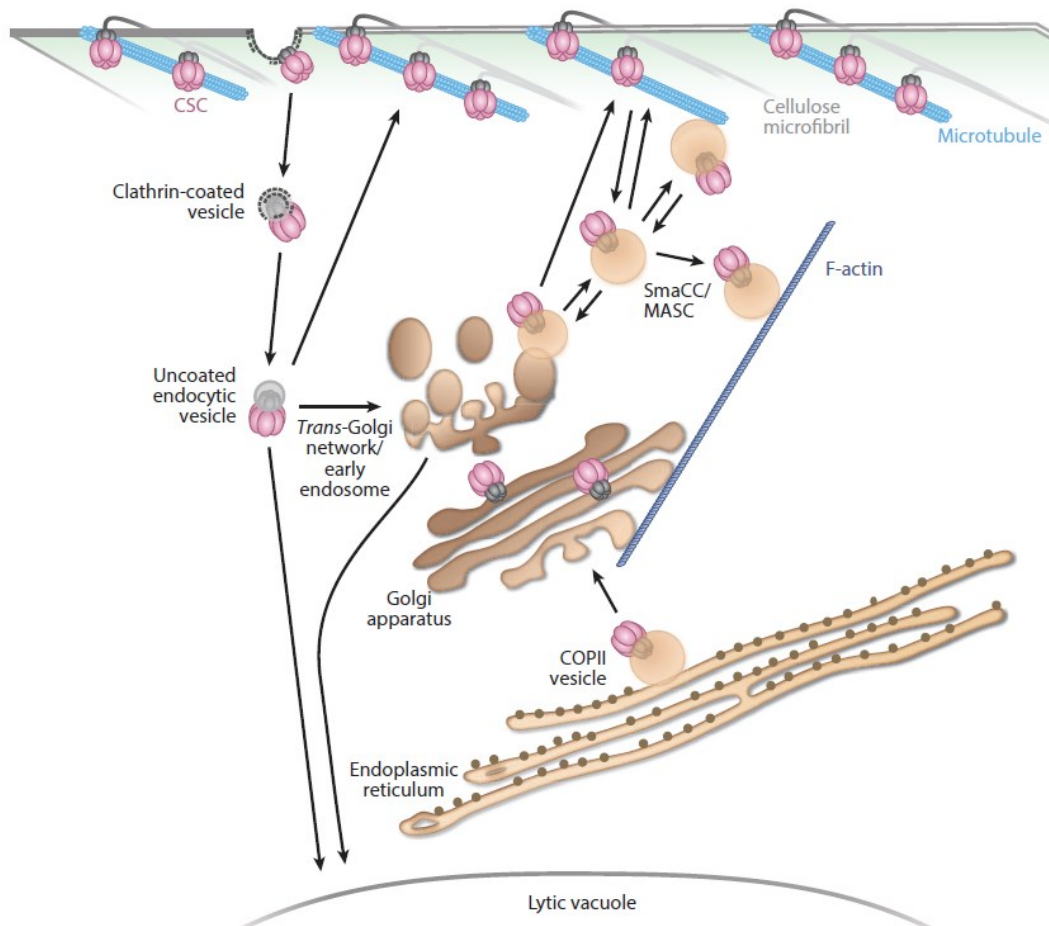
Wasteneys a Collings (2004) popsali reorientaci mikrotubulů při rozrušení aktinových mikrofilament v rostlinných buňkách, což vedlo k myšlence, že aktinový cytoskelet může ovlivňovat buněčný růst skrz interakce mezi aktinovými mikrofilamenty a mikrotubuly. Pomocí farmakologických látek bylo demonstrováno vzájemné ovlivňování mezi aktinem a mikrotubuly při jejich stabilizaci nebo rozrušení (Collings, 2008). Poměrně nedávno byly

tyto studie o vzájemné dynamice aktinových mikrofilament a mikrotubulů potvrzeny v interfázi rostlinné buňky pomocí duálně značené linie pro F-aktin a mikrotubuly (Sampathkumar et al., 2011, 2013).

V živočišných buňkách jsou známy proteiny, které se podílí na interakcích mezi aktinem a mikrotubuly (MAP1 a 2, ERM proteiny, coronin, dynein). Rostlinné buňky však svůj protějšek těchto savčích proteinů postrádají. Havelková et al. (2015) předložili důkazy o schopnosti podjednotky ARP2/3 komplexu ARPC2 vázat se, jak na mikrotubuly, tak i AF. Schopnost ARPC2 vázat MT tak může představovat nový molekulární mechanismus pro interakce mikrotubulů s mikrofilamenty. Dalšími potenciálními kandidáty jsou PLD, LIM a proteiny příbuzné dynaminu (Collings, 2008; Petrášek a Schwarzerová 2009).

2.12 Dráha CSC v rostlinné buňce

Přepokládá se, že rozeta terminálního komplexu je sestavována v Golgiho aparátu (GA) nebo v endoplazmatickém retikulu (ER), a poté je transportována již v aktivní formě na plazmatickou membránu (Doblin et al., 2002; McFarlane et al., 2014; Neumann et al., 2003 – viz Obrázek 9). V nedávno publikované studii byla v Golgi odhalena interakce proteinů CESAs se STL (STELLO) proteiny (Zhang et al., 2016). Narušení funkce STL vedlo k redistribuci CESA z periferního do centrálního Golgi a také k redukci v produkci celulózy (Zhang et al., 2016). V mutantovi *stl* bylo do komplexů začleněno méně CESA podjednotek, což naznačuje jeho funkci ve skládání CESA v Golgi (tamtéž). Na plazmatickou membránu složené rozety pokračují zřejmě ve váčcích trans-Golgiho aparátu a ve váčcích označených jako MASCs (Microtubule Associated Cellulose Synthase Compartments)/ SmaCCs (Small CESA Compartments) (Crowell et al., 2009; Gutierrez et al., 2009)



Obrázek 9: Schéma možného pohybu CSCs na plazmatickou membránu a zpět dle McFarlane et al., 2014. CESA jsou sestaveny do rozety CSC v endoplazmatickém retikulu nebo v Golgiho aparátu. Po průchodu skrz Golgiho aparát a trans-Golgiho aparát jsou CSCs dopraveny na membránu – pravděpodobně pomocí SmaCCs/MASCs. CSCs mohou být internalizovány pomocí klathrinových váčků nebo znovu SmaCCs/MASCs. CSC mohou být recyklovány a znovu být zaslány na membránu nebo jsou transportovány pro degradaci (McFarlane et al., 2014).

V rostlinné buňce byly nalezeny celkem tři různě lokalizované populace CESA. Částice na plazmatické membráně jsou pokládány za součást funkčních CESA komplexů konvertující molekuly glukózy v celulózní mikrofibryly. Další jsou zploštělé váčky, které zřejmě představují periferní Golgi (Wightman a Turner, 2010). Poslední nalezené útvary s lokalizací CESA byly označeny jako SmaCCS anebo MASCs. a v současnosti je na ně pomýšleno jako na kompartmenty, které při syntéze primární buněčné stěny přenášejí CSCs z Golgi k membráně a zřejmě hrají roli i v endocytóze (Crowell et al., 2009; Gutierrez et al., 2009; Kumar a Turner, 2015). Bylo také zjištěno, že SmaCCs/MASCs se hromadí v kortexu buňky při osmotickém stresu, při inhibici syntézy proteinů anebo při inhibici syntézy celulózy (Crowell et al., 2009; Gutierrez et al., 2009; Kumar a Turner, 2015).

Zatím není zcela jasné, zda SmaCCs/MASCs představují mechanismus pro internalizaci/recyklaci nebo pro doručení na membránu, nebo obojí. Působením

osmotického stresu nebo inhibicí syntézy celulózy však došlo k prodloužení interakcí těchto kompartmentů s mikrotubuly, přičemž tato interakce je zřejmě důležitá pro doručení CSCs na plazmatickou membránu (Bashline et al., 2011).

Studována byla v tomto ohledu také endocytóza závislá na klathrinu (CME clathrin-mediated endocytosis). Její přerušení může zřejmě ovlivňovat složení buněčných stěn. Zatím pouze nepřímé důkazy naznačují, že cesta endocytózy závislé na klathrinu může zajišťovat internalizaci a recyklaci CSC součástí. Konopka a Bednarek (2008) zjistili, že v endocytóze má roli dynamin-like protein AtDRP1A. Mutace v DRP1A u mutantů *rsw9* (*radially swelling 9*) způsobila deficit v obsahu celulózy a také defekty v buněčném růstu (Collings et al., 2008). Obdobně tomu je i u mutantu *bc3* (*brittle culm3*) genu *OsDRP2B*, který stejně jako u *Arabidopsis* má v rýži důležitou roli v endocytóze (Xiong et al., 2008).

CME využívá adaptorový proteinový komplex 2 (AP2) pro naložení nákladu z plazmatické membrány (Chen et al., 2011). V roce 2010 identifikovali Gu et al. (2010) protein jménem $\mu 2$ jako protein interagující s AtCESA6. Protein $\mu 2$ (znám také jako AP2M) je podjednotka komplexu AP2 v *Arabidopsis* (Li et al., 2012a; Bashline et al., 2013; Yamaoka et al., 2013). Mutantní rostliny postrádající $\mu 2$ jsou fenotypově podobné primárním CESA mutantům *Arabidopsis* (Bashline et al., 2013). Kromě defektů expanze buněčné stěny $\mu 2$ mutanty mají také sníženou internalizaci FM4-64 markeru pro endocytózu. $\mu 2$ protein byl lokalizován na plazmatické membráně, kde ovlivňuje hustotu YFP-AtCESA6 částic, ale rychlost pohybu CSCs na membráně a rychlost doručování CSCs na plazmatickou membránu změněny nebyly (Bashline et al., 2013).

2.13 Regulace syntézy celulózy

Syntéza celulózy je regulována mnoha faktory, mimo jiné hormony, světlem, mechanickými stimuly, dostupnými živinami a interakcí s cytoskeletem. Jmenované faktory mohou ovlivňovat ukládání celulózy skrze ovlivnění obsahu substrátu pro syntézu, skrze aktivitu CSCs anebo množstvím CSCs na plazmatické membráně. Bringmann et al. (2012) navrhli možnost regulace CSC aktivity také skrze CSI1 protein, neboť se váže na katalytickou doménu CESA.

2.13.1 SUSY

Omadjela et al. (2013) popsali, že není vyžadován žádný primer pro iniciaci tvorby glukonového řetězce a není potřeba ani dodávat žádný jiný typ energie pro sestavení

jednotlivých řetězců do vyšší struktury, neboť polymerace UDP-glukózy poskytuje dostatek energie pro celulózni řetězec rostoucí skrz membránový pór.

V roce 1995 byla u bavlníku poprvé popsána asociace sacharózasyntázy (*P-SUSY*) s CSCs na plazmatické membráně (Amor et al., 1995). V současnosti se předpokládá, že UDP-glukóza pro CSCs je produkována právě sacharózasyntázami (SUSY) rozložením sacharózy na UDP-G a fruktózu. SUSY proteiny jsou v *Arabidopsis* kódovány malou rodinou šesti genů SUS1-6. Experiment inhibice funkce SUSY vlivem RNAi v mrkvi a bramboru tuto myšlenku podporuje, neboť suprese vedla k redukci tvorby celulózy (Tang a Sturm, 1999; Haigler et al., 2001). Existuje také populární teorie o přímé asociaci CSCs se SUSY, díky níž je UDP-glukóza přímo vedena do celulózasyntázového komplexu (Amor et al., 1995; Haigler et al. 2001).

Barratt et al. (2009) využil genetický přístup pro zjištění role SUSY v syntéze celulózy. Čtyřnásobný mutant *sus1/sus2/sus3/sus4* vykazoval obvyklé buněčné stěny i obsah celulózy, přičemž tito mutanti postrádají SUS aktivitu ve všech typech buněk kromě floému. U dvojitého mutantu *sus5/sus6* postrádajícího SUS specificky ve floému bylo zjištěno defektní ukládání kalózy v sítkových políčkách, ale na aktivitu celulózasyntáz vliv prokázán nebyl (Barratt et al., 2009). Mutace dvou cytosolických invertáz oproti tomu měla na růst rostliny velmi výrazný vliv. Toto zjištění zpochybnilo úlohu SUSY v syntéze celulózy, ale dodatečná přesnější analýza odhalila aktivitu SUS u mutantů *sus1/sus2/sus3/sus4* i *sus5/sus6* v listech i ve stoncích, zřejmě ještě na vyhovující úrovni pro zajištění dostatečného množství celulózy (Baroja-Fernandez et al., 2012 a, b). Pokud SUSY není hlavním enzymem dodávající substrát celulózasyntázám, je velmi pravděpodobné, že dodává UDP-glukózu alespoň za určitých okolností. Důkazem může být i studie overexprese SUSY v topolu, kde byly zjištěny silnější sekundární buněčné stěny následkem zvýšeného ukládání celulózy (Andersson-Gunneras et al., 2006; Coleman et al., 2009).

2.13.2 Fosforylace

Somerville (2006) navrhl, že v regulaci aktivity CESA by mohla mít roli fosforylace. V proteomickém průzkumu fosfoproteinů plazmatické membrány Nuhse et al. (2004) zjistili fosforylaci AtCESA1, AtCESA3 a AtCESA5 na mnoha místech seskupených ve dvou variabilních oblastech – VR1 a VR2. Později byla potvrzena fosforylovaná místa v doméně VR1 také u sekundárních CESA4 a CESA7 (Taylor, 2007).

Chen et al. (2010) nedávno studovali všechny potenciální místa fosforylace AtCESA1 vytvářením mutací ve VR1 a VR2 doméně. Fosforylace některých míst (T166, S686 a S688) vedla ke zvýšení CESA aktivity. Naopak fosforylace (S162, T165 a S167) aktivitu CESA zřejmě snížily. Vliv fosforylace vybraných míst byl posuzován na základě délky hypokotylů a kořenů *Arabidopsis*. Vytvořené linie (S162E, T165E, T166A, S167E, S686A a S688A) navíc vykazovaly nesymetrickou rychlost CSCs pohybujících se v proti sobě/ od sebe jdoucích směrech - v porovnání s WT, kde je rychlost CSCs v obou směrech podobná. Při aplikaci oryzalinu rozrušujícího mikrotubuly byl obnoven symetrický pohyb CSCs v linii T165A a S167A, což naznačuje na interakci mezi CSCs a mikrotubuly závislou na fosforylaci (Chen et al., 2010). Fosforylace byla testována také u proteinu CESA5, který je redundantní s CESA6. CESA5, ale nedokáže plně komplementovat mutaci *cesa6^{prc1-1}*. Fosforylační místa na Ser122, Ser126, Ser229 a Ser230 byla substituována glutaminem, což vyústilo v konstrukt plně komplementující růstový defekt *cesa6^{prc1-1}* i sníženou rychlost CSC (Bischoff et al., 2011).

2.14 Proteiny asociované s CSC

2.14.1 KOR1 (KORRIGAN1) protein

KOR1 je β -1,4-endoglukanáza, která se váže na plazmatickou membránu, kolokalizuje s CSCs a přímo interaguje s CESA proteiny (Lane et al., 2001; Sato et al., 2001; Vain, et al., 2014). *kor1* mutanti jsou fenotypově obdobní jako jiní mutanti dráhy biosyntézy celulózy, vykazují izodiametrický růst epidermálních buněk, deficit celulózy v primární i sekundární stěně a také redukovanou elongaci kořene (Mansoori et al., 2014; Nicol et al., 1998; Lane et al., 2001; Lei et al., 2014; Sato et al., 2001; Vain, et al., 2014). Navíc má *kor1* sníženou pohyblivost CSCs, což naznačuje, že aktivita KOR1 stimuluje tvorbu celulózy (Paredes et al., 2008; Vain, et al., 2014). Funkcí KOR je zřejmě úprava a kontrola přeměny glukanového řetězce, uvolnění nových celulózních mikrofibril a při odstranění defektních glukanových řetězců při sestavování mikrofibrily (Mølhøj et al., 2002; Nicol et al., 1998; Szyjanowicz et al., 2004; Takahashi et al., 2009).

2.14.2 COBRA a COBRA-like proteiny

COBRA je GPI-zakotveným proteinem na extracelulární straně plazmatické membrány (Roudier et al., 2005). V roce 1993 byla u mutanta *cob* prokázána jeho nezbytnost pro správnou orientaci buněčného růstu (Benfey et al., 1993). Mutace v *COB* se projevuje krátkými a nabobtnalými kořeny. U *cobra* mutanta byla identifikována nepravidelná

elongace kořenových buněk a vykazuje také redukcii obsahu celulózy (Benfey et al., 1993; Schindelman et al., 2001). Protein COBRA byl asociován i s ukládáním celulózních mikrofibril v kořenových pletivech (Schindelman et al., 2001; Roudier et al., 2005).

Členové genové rodiny *COBRA-like*: *COBL2*, *COBL6*, *COBL9*, *COBL10*, a *COBL11* jsou potřeba pro orientované ukládání celulózy v primární buněčné stěně během vývoje semene, kořenových vlásků a pylové láčky (Ben-Tov et al., 2015; Li et al., 2013). *COBL4* má úlohu během formace vaskulárního systému xylémových buněk (Ben-Tov et al., 2015). *COBRA-like* BRITTLE CULM1 (*Oryza sativa*) hraje roli ve skládání celulózních svazků skrz interakce s celulózními mikrofibrilami (Ben-Tov et al., 2015; Liu et al., 2013). Mutace v *COBL9* ovlivňují architekturu kořene a vedou v kořenu k fenotypu nabobtnalých buněk s krátkými kořenovými vlásky (Jones et al., 2009).

2.14.3 TED6 a 7

Po indukci tvorby xylému v buněčné kultuře *Zinnia elegans* byla zjištěna exprese genů TED6 a TED7 (tracheary element differentiation-related) podobných sekundárním *CESA* genům. Endo et al. (2009) prokázal interakci mezi TED6 a *CESA7*. Snížení exprese *TED7*, vlivem RNAi umlčování, vedlo v buněčné kultuře k odkladu diferenciaci na xylémové elementy (Endo et al., 2009). Přesná úloha v syntéze celulózy buněčné stěny zatím není známá.

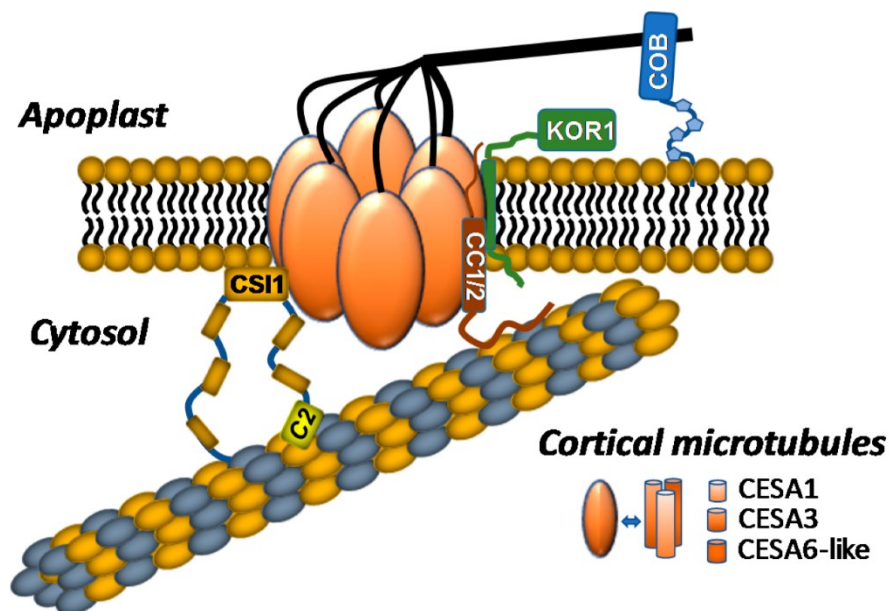
2.14.4 CTL1/POM1

CTL1 (Chitinase-like protein 1) byl objeven jako mutace *pom1* způsobující abnormální buněčný růst v kořenech (Hauser et al., 1995). Ačkoliv jméno proteinu odkazuje na spojitost s chitinázou na základě jejich podobných sekvencí, nebyla aktivita chitinázy detekována a rostliny obvykle chitin ani neprodukují (Hermans et al., 2010; Zhong et al., 2002). Reed et al., (1998) a Mouille et al. (2003) ukázali, že mutace v CTL1/POM1 vedou ke zmenšenému růstu etiolovaných hypokotylů a k bobtnání kořene. Mutanti trpěli velkým úbytkem v obsahu celulózy a buněčné stěny byly nekompletní (Mouille et al., 2003; Zhong et al., 2002).

2.14.5 KOBITO (KOB1)

KOBITO1 je rostlinně-specifický protein esenciální pro tvorbu celulózy (Pagant et al., 2002). Mutace *KOB1* způsobují velmi závažné fenotypové projevy včetně trpasličího vzrůstu rostlin, sterility a obsahují až o 33 % méně krystalické celulózy (Lertpiriyapong and

Sung, 2003; Pagant et al., 2002). Lokalizován byl KOB1 na plazmatické membráně, v buněčné stěně i uvnitř cytoplazmy (Brocard-Gifford et al., 2004; Lertpiriyapong and Sung, 2003; Pagant et al., 2002). Specifické funkce KOB1 zůstávají neodhaleny, ale je známo, že zřejmě hraje roli i v ABA signalizaci (Brocard-Gifford et al., 2004).



Obrázek 10: Současný model CSC a asociovaných proteinů (Speicher et al., 2018). CSC je tvořen rozetou hexagonálního tvaru s 18 celulózasyntázami rozdělenými v rozetě v podjednotkách po třech. Asociované proteiny s CSC jsou CSI1 (cellulose synthase interactive protein 1), CC1/2 (companion of cellulose synthase 1/2), KOR1 (KORRIGAN1) a COBRA (Speicher et al., 2018).

3 Materiál a metody

3.1 Rostlinný materiál

Pro práci byly využity rostliny *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., ekotyp Columbia. K analýze pohybu CESAs *in vivo* na plazmatické membráně byla použita linie YFP-CESA6^{prc1-1}, ve které je ztrátová nulová mutace *prc1-1* (*procuste 1/ cellulose synthase 6*) komplementována proteinem YFP-CESA6 (cellulose synthase a catalytic subunit 6) ve fúzi se žlutým fluorescenčním proteinem (viz Obrázek 11). Gen *CESA6* kóduje jednu z podjednotek komplexu celulózasyntáz. Linie YFP-CESA6^{prc1-1} tvořící fluorescenčně označené CESA6 proteiny v mutantním pozadí *prc1-1* pochází z laboratoře Chrise Sommerville (viz Paredez et al., 2006). Tato komplementovaná linie YFP-CESA6^{prc1-1} byla v práci použita jako kontrolní varianta a jako parentální rostlina pro křížení dalšího rostlinného materiálu.



Obrázek 11: Osmidenní semenáčky *Arabidopsis thaliana*. Nahoře viditelné nabobtnalé buňky kořenového systému (označeno šipkami) mutantu *prc1-1*. Dole kořen rostliny bez projevu *prc1* mutace (zachráněno YFP-CESA6). Pozorováno na Olympus ProvisAX70, kamera Nikon DS-F11, průchozí světlo. Měřítko $\cong 100 \mu\text{m}$.

Rostliny YFP-CESA6^{prc1-1} byly kříženy s rostlinami s nulovou ztrátovou mutací jedné z podjednotek ARP2/3 proteinového komplexu, a to jednotlivě s *arp2* a *arp5* (Sahi, Cifrová et al., 2017). T-DNA inzerční linie *arp2* (SALK_077920.56.00) a *arp5* (SALK_123936.41.55) pochází z The Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC). Z F1

generace potomstva YFP-CESA6^{prc1-1} X *arp2* a YFP-CESA6^{prc1-1} X *arpc5* byly dále selektovány a znovu kříženy linie tak, aby byly ve všech pozorovaných znacích homozygotní (*prc1*, *arp2* či *arpc5* i YFP-CESA6). Regenerování protoplastů byla kvantifikována u protoplastů z WT rostlin a mutantní linie *arpc5* bez fluorescenčního značení.

3.2 Kultivační podmínky

Pro všechna měření byly rostliny pěstovány ve sterilních in vitro podmínkách. Ex vitro na rašelinových jiffech (Jiffy Products International) byly pěstovány rostliny jako křížící materiál nebo pro namnožení rostlin. Některé rostliny byly nejdříve pěstovány in vitro a po selekci příslušných znaků byly převedeny do ex vitro podmínek.

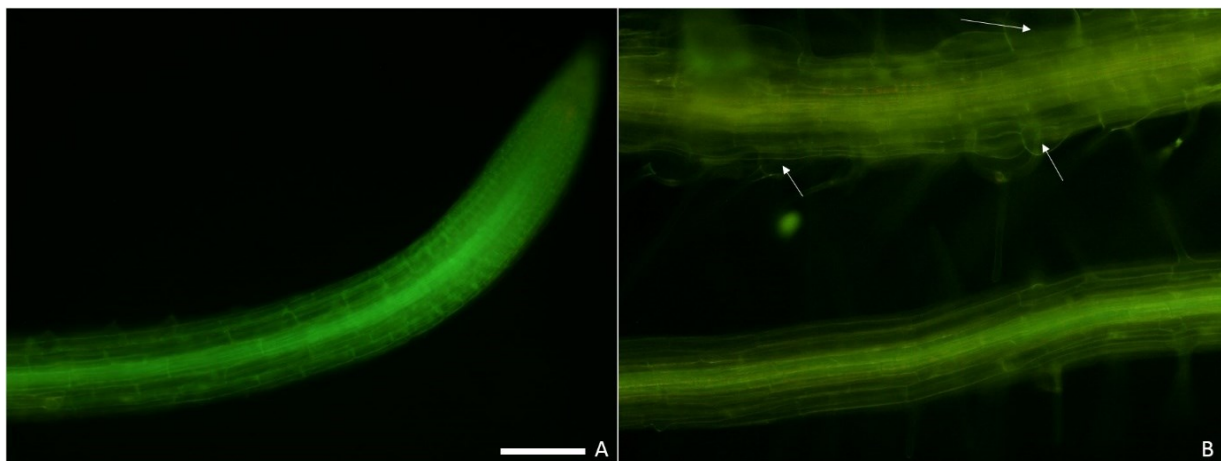
U in vitro pěstovaného materiálu byla semena dezinfikována v 1,5 ml mikrozkušavkách Eppendorf 1 minutu 70% etanolem a následně přípravkem SAVOs 50% koncentrací po dobu 10 minut. Semena byla propláchnuta 3-4 krát destilovanou vodou a v poslední proplachovací vodě byla uložena do lednice, kde byla semena ve 4°C stratifikována jeden až dva dny. Stratifikovaná semena byla vyseta ve sterilním prostředí flowboxu pomocí pipety na hranaté plastové Petriho misky (12 x 12 cm) s minimálním MS médiem (složení viz 3.7.1) a celá miska byla uzavřena parafilmem. V případě měření rychlosti částic celulózasyntáz na membráně byly Petriho misky ještě obaleny alobalem, aby neprocházelo světlo a byly získány etiolované rostliny. Pro snímání rychlosti CESA6 byly použity třídenní etiolované semenáčky. Pro regeneraci protoplastů byl použit in vitro rostlinný materiál starý deset dní až 2 týdny. Petriho misky byly vždy postaveny vertikálně ve sklonu maximálně do 10°. Teplota v kultivačních místnostech byla nastavena na 25°C při 16/8 h fotoperiodě.

Rostliny pěstované ex vitro byly vysety na vlhké rašelinové jiffy a umístěny do arasystému (plastový set pro pěstování *Arabidopsis thaliana*, výrobce Betatech). Rostliny byly zalévány vodou z vodovodu, jen první zálivka byla podpořena hnojivem Kristalon (1 g/1 l).

3.3 Křížení a selekce mutantních rostlin

Po zkřížení YFP-CESA6^{prc1-1} rostlin s *arp* mutanty byly získány v první generaci potomstva heterozygoti ve všech znacích. Mutace *prc1*, *arp2* i *arpc5* jsou recesivně homozygotní, tzn., že se fenotypově projeví pouze, pokud má gen alely recesivní obě. V F₁ heterozygotní generaci se tedy fenotyp *prc1* ani *arp* mutací neobjevil. Oproti tomu genu

YFP-CESA6, exprimovanému pod konstitutivním promotorem 35S, k fenotypovému projevu postačuje i heterozygotní stav alel. Tudíž všechny rostliny F₁ generace vykazovaly wild type fenotyp, ale byly označeny markerem YFP-CESA pozorovaným jako žlutozelená fluorescence (viz **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**) v kořincích *in vitro* pěstovaných emenáčků, především v kořenových špičkách a v cévních svazcích. Velmi často byla na překážku autofluorescence buněk, ale kořínky bez YFP byly pod excitačním světlem místy nepozorovatelné (především kořenové špičky) a vyzářené světlo mělo podstatně nižší



Obrázek 12: Vlevo (A) kořenový špička rostliny exprimující YFP-CESA. Vpravo (B) starší oblast kořínků jiných rostlin pro srovnání. Nahoře rostlina bez alel YFP-CESA – projevují se nabobtnalé epidermální buňky (označeno šipkami) vlivem nulové mutace genu *CESA6*, zachycená záře je pouze autofluorescence. Dole (B) koříněk rostliny zachráněné YFP-CESA s jasně zářící fluorescencí YFP – především v cévních svazcích a v kořenových špičkách. Pozorováno na Olympus ProvisAX70, kamera Nikon DS-F11, fluorescence. Měřítka pro A i B $\cong 100 \mu\text{m}$.

jasnost.

Ve druhé generaci F₂ již docházelo ke štěpení fenotypů (viz Tabulka 2). Část populace byla shodná s F₁ generací, ale mohla mít gen YFP-CESA6 v heterozygotní (+/-) nebo v dominantně homozygotní formě (-/-). Kromě toho vznikly i rostliny, které alely genu YFP-CESA6 nenesly vůbec (+/+), ale zároveň nebyly recesivně homozygotní v *prc1*. Tyto rostliny se nijak nelišily od wild type rostlin a pod ozářením fluorescenčního mikroskopu vyzářovaly pouze slabou autofluorescenci.

V F₂ generaci se vyskytly i rostliny s nekompleťovanou ztrátovou mutací *prc1* (-/-) neboť nezdědily žádnou alelu pro gen YFP-CESA6 (+/+), která by mutantní fenotyp zachránila. Ve stejné generaci také zároveň docházelo k fenotypovému štěpení ve znaku deformovaných trichomů – část F₂ populace měla recesivně homozygotní stav alel (*arp* -/-) s fenotypovým projevem mutace a zbytek nemusel mít mutantní alelu žádnou (+/+) nebo pouze jednu (+/-) a fenotyp *arp* mutace se v takovém případě neprojevil.

Varianta alel arp	Fenotyp z hlediska arp mutace	Varianta alel prc1	Varianta alel YFP-CESA6	Stav alel popsany slovně	Fenotyp z hlediska prc1 mutace	Další postup
arp -/-	Fenotypový projev arp mutace, v F3 generaci by nedocházelo ke štěpení v ARP znaku.	prc1 +/+	YFP-CESA6 +/+	Bez fenotypu prc1 mutace. Bez YFP-CESA6.	WT fenotyp bez YFP fluorescence, F3 by byla identická bez štěpení.	Zamítnuto pro další práci
arp -/-		prc1 +/-	YFP-CESA6 +/+	Bez fenotypu prc1 mutace. Bez YFP-CESA6.	WT fenotyp, F3 generace by stále byla bez mutantních alel ARP, ale vyskytovala by se část potomstva s prc1 mutací.	
arp -/-		prc1 -/-	YFP-CESA6 +/+	Fenotyp mutace prc1 ano. Bez YFP-CESA6.	Fenotyp prc1 mutace, bez mutantních alel ARP, v F3 nemůže dojít k záchraně prc1 fenotypu.	Přepěstování pro F3 generaci
arp -/-		prc1 +/+	YFP-CESA6 -/-	Bez fenotypu prc1 mutace. YFP-CESA6 ano.	WT fenotyp s YFP fluorescencí, F3 by byla identická bez štěpení.	Zamítnuto pro další práci
arp -/-		prc1 +/-	YFP-CESA6 -/-	Bez fenotypu prc1 mutace. YFP-CESA6 ano.	WT fenotyp s YFP fluorescencí, F3 by štěpila ve znaku PRC1, ale fenotypově by se nijak neprojevovalo neboť mutaci YFP-CESA6 vždy zachránil.	
arp -/-		prc1 -/-	YFP-CESA6 -/-	Mutace prc1 ano, ale bez fenotypu. YFP-CESA6 ano.	Fenotyp jako WT s YFP fluorescencí, F3 by byla identická bez štěpení. Mutace prc1 je zachráněna CESA-YFP.	
arp -/-		prc1 +/+	YFP-CESA6 +/-	Bez fenotypu prc1 mutace. YFP-CESA6 ano.	Fenotyp jako WT s YFP fluorescencí, F3 by štěpila potomstvo na WT-like bez fluorescence a potomstvo s CESA-YFP6.	Zamítnuto pro další práci
arp -/-		prc1 +/-	YFP-CESA6 +/-	Bez fenotypu prc1 mutace. YFP-CESA6 ano.	Fenotyp jako WT s YFP fluorescencí. V F3 by se vyskytovaly všechny kombinace znaků mimo mutaci ARP komplexu.	
arp -/-		prc1 -/-	YFP-CESA6 +/-	Mutace prc1 ano, ale bez fenotypu. YFP-CESA6 ano.	Fenotyp jako WT s YFP fluorescencí, F3 by byla část identická, část by ale měla fenotyp prc1 mutace. Mutace prc1 je zachráněna CESA-YFP - v F3 generaci by bylo potomstvo i bez alely CESA-YFP6.	Přepěstování pro F3 generaci

Tabulka 2: Schéma výběru vhodného potomstva pro další křížení z F2 generace z křížení YFP-CESA6^{prc1-1} rostlin s rostlinami s mutantní podjednotkou ARP2/3 komplexu. Potomstvo, které nemá obě alely genu pro podjednotku ARP2/3 komplexu mutantní, není ve schématu zahrnuto a bylo zamítnuto pro další práci. V případě arp2 i arp5 mutací bylo postupováno stejným způsobem.

Pro další práci byla z F₂ generace selektována varianta s mutantním fenotypem arp (-/-) a zároveň i prc1 (-/-). Vybrány tedy byly rostliny s deformovanými trichomy, které zároveň vykazovaly defekty v buněčných stěnách, což se nejvíce projevuje v kořeni. Tyto rostliny pak byly znovu kříženy s parentální linií YFP-CESA6^{prc1-1}. Tím bylo dosaženo toho, že veškeré další potomstvo bylo v prc1 mutantním pozadí stejně jako rodičovská linie YFP-CESA6^{prc1-1}.

První generace tohoto potomstva po druhém křížení měla pouze heterozygotní stav alel pro *arp* mutaci. Stejně tak byl heterozygotní stav i u YFP-CESA6, ale ten by již nebyl překážkou. Byla tedy vypěstována a sklizena i druhá generace. V generaci P₂F₂ byly selektovány rostliny s deformovanými trichomy (homozygotní *arp* ^{-/-}), které zároveň exprimovaly YFP označené CESA6. Pro ověření, zda jsou všechny znaky v homozygotním stavu, tedy i YFP-CESA6, bylo ve třetí generaci P₂F₃ ověřeno, že žádný potomek nevykazuje *prc1* fenotyp a použity byly pouze rostliny z P₂F₂ generace, které toto kritérium splňovaly. Pro práci byl tedy použit mutant v homozygotním stavu *arp*^{-/-} *prc1*^{-/-} exprimující YFP-CESA6 také v homozygotním stavu.

3.4 Získání dat pro rychlost CESA6

Pozorovány byly tří denní etiolované rostliny YFP-CESA6^{*prc1-1*}, *arp2*/YFP-CESA6^{*prc1-1*} a *arpc5*/YFP-CESA6^{*prc1-1*}. Na podložní sklo byl vždy umístěn celý semenáček do kapky vody a překryt krycím sklem. Pro měření rychlosti CESA6 byla snímána pouze hypokotylová část poblíž apikálního háčku, kde dochází k intenzivní elongaci buněk. Skenování bylo u každé mutantní linie provedeno ve třech opakováních v různých dnech a ve stejný den byla vždy s mutantní variantou nasnímána i kontrolní linie YFP-CESA6^{*prc1-1*}. Celkem tedy byla zpracována tři biologická opakování od každé mutantní varianty a u kontrolního vzorku bylo opakování celkem šest.

Část pozorování bylo provedeno na pracovišti Ústavu experimentální botaniky AV ČR, v. v. i. (ÚEB) pomocí mikroskopu Nikon (Eclipse Ti-E, invertovaný) s nainstalovanou spinning disk jednotkou Yokogawa CSU-X1. Mikroskop je vybaven systémem Perfect Focus, který kompenzuje posun ve fokální rovině a také duálním kamerovým systémem. Využito bylo kamery sCMOS Andor Zyla. Nainstalovaný software na přístroji byl NIS Elements, který ukládá soubory do formátu *nd2*.

Kvůli nutnosti transportu vzorků na ÚEB a také proto, že byl zprovozněn nový objektiv na fakultním nanoskopu Zeiss Elyra SP. 1, byla další část experimentů provedena na fakultním pracovišti. Zeiss Elyra SP. 1 je superezoluční mikroskop vybavený pro pozorování metodou TIRF, která umožňuje pozorovat velmi úzký prostor pod sklíčkem a minimalizuje nechtěné světlo z neostrých hlubších rovin a je tak schopný dosáhnout rozlišení pod 200 nm. Použit by objektiv alpha Plan-Apochromat 63x/1,46 Oil Korrer M27. Snímání bylo provedeno kamerou sCMOS. Při optimálním nastavení bylo dosaženo

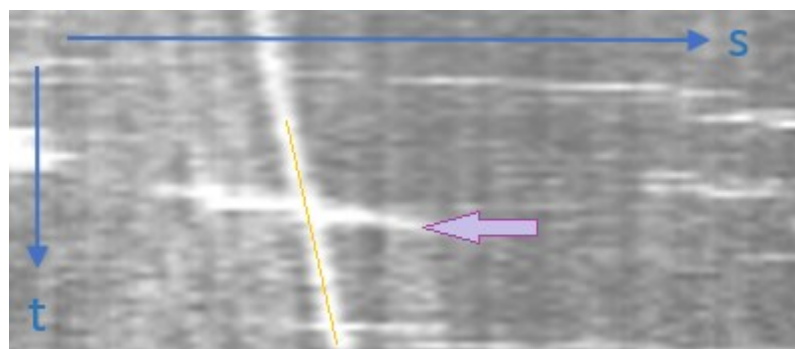
rozlišení odpovídající 64 nm/ 1 pixel. Software určený pro tento mikroskop je ZEN od společnosti Carl Zeiss Microscopy GmbH, který ukládá soubory do formátu *dzi*.

Byly sbírány časové sekvence lišící s intervaly mezi jednotlivými snímky od 5 s do 20 s. Nevýhodou krátkého rozestupu mezi snímky (5 s a méně) je velmi rychlé vysvícení vzorku – zhruba ve druhé minutě snímání. Při příliš dlouhém intervalu (20 s) docházelo k posunům v rovině, protože se nahrávala 10 minutová a delší doba a zachytil se tak pravděpodobně i samotný růst semenáčku. Dobrým kompromisem se ukázala být videa s nastaveným intervalem snímků na 10 s.

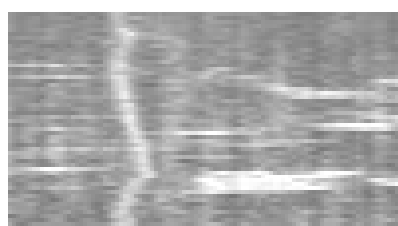
3.5 Analýza rychlosti pohybu CESA6

Během snímání byl od každé varianty snímán minimálně jeden hypokotyl (pracovní označení hyp1, hyp2 atd.) a na jednom obvykle bylo snímáno několik různých míst (pracovně označeno cell1, cell2 atd.). K analýze rychlosti CESA6 částic byly vybrány pouze takové videosekvence, u nichž nedošlo k posunu roviny během snímání. Efektivně proti takovému posunu při snímání působil systém Perfect Focus na mikroskopu Nikon s SD na ÚEB, ale nanoskop Elyra obdobnou funkci Definite Focus bohužel nemá funkční. Formáty *nd2* a *dzi* nejsou vzájemně kompatibilní, proto bylo potřeba převést *dzi* do *nd2* formátu. Na videa v *nd2* se v programu NIS Elements (verze 4.60) použila funkce Ekvalizovat intenzitu v čase (**Obraz -> ND zpracování -> Vyrovnaná intenzita v čase**), což zamezilo kolísání intenzity mezi jednotlivými snímky.

Hlavním nástrojem pro hodnocení této části práce byly kymogramy. Ekvalizovaná videa byla zpracovávána v programu ImageJ. Do tohoto programu byl doinstalován nástroj pro měření rychlosti a jednodušší tvorbu kymogramů (Volker Baecker, 2014 - modifikovaná verze pluginu ImageJ Kymograph od J. Rietdorf a A. Seitz). Pro tvorbu kymogramu byla v sekvenci po sobě jdoucích snímků (stack) v ImageJ na jednom ze snímků nakreslena přímka jakožto trajektorie pohybu jednotlivé CESA6 částice od počátku do konce vybrané sekvence. Pomocí příkazu **Reslice [1] (Image -> Stack -> Reslice)** byl vytvořen kymogram, který ukazuje pohyb částic v rámci původně nakreslené linie.



Obrázek 13: Kymogram CESA6 částice na membráně pohybující se stejným směrem konstantní rychlosti (oranžově). Fialová šipka ukazuje velmi rychlý pohyb procházejícího váčku z GA.



Obrázek 14: Kymogram částice vykazující skákavý pohyb (saltatory movement).

Osa y je tvořena počtem snímků a značí čas, osa x určuje vzdálenost v pixelech (px). Rychlost, kterou se daná částice pohybovala lze vypočítat pomocí nástroje pro měření rychlosti, kde se znovu kreslícím nástrojem linie obtáhne vzniklá cesta částice v kymogramu a nástroj vypočítá uraženou vzdálenost v px.

$$v = s/t \quad [\mu\text{m/s}]$$

Vzorec pro výpočet rychlosti.

Vzhledem ke známé celkové délce videa v sekundách (osa y je v kymogramu uvedena také v px), k vypočítané uražené vzdálenosti částice v px a ke známému přepočtu px na μm lze podle vzorce pro výpočet rychlosti vypočítat jakou vzdálenost částice urazila za stanovenou dobu (Tab.). Výsledná rychlost je uváděna v nanometrech za minutu.

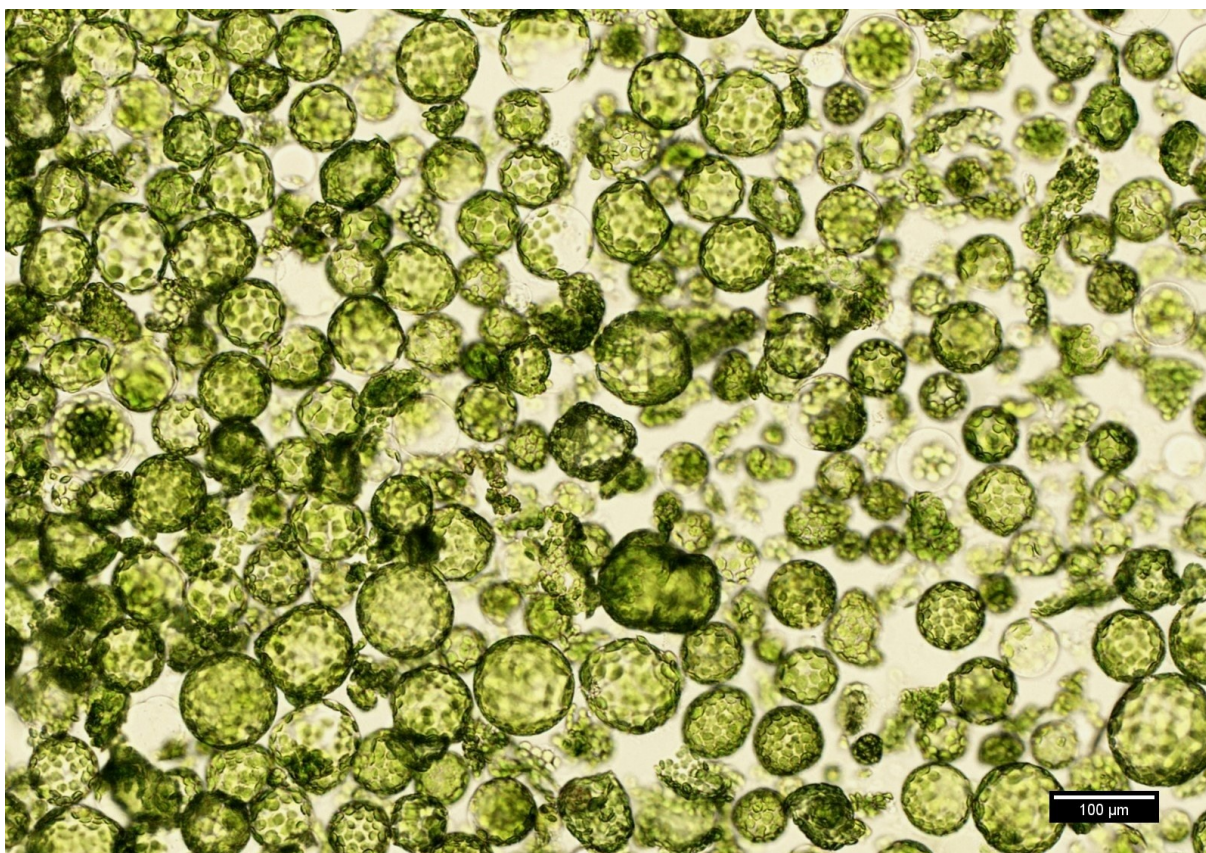
	s (osa x) [px]	s (osa x) [μm]	s (osa x) [nm]	1 px ~ [s]	za čas [px] (osa y)	za čas [s] (osa y)	za čas [min]	s/t [px]	s/t [$\mu\text{m/s}$]	s/t [nm/min]
Data	16,2500	1,1323	1132,3489	5,00002	56,8333	284,1676	4,7361	0,2859	0,0040	239,0875
Výpočet	Změřeno	11,5 *	1,1323 *	Nastaveno	Změřeno	5,00002 *	284,1676 /	16,25 /	16,25 /	1132,3489 /
		0,06968	1000			56,8333	60	56,83	284,1676	4,7361

Tabulka 3: Ukázka výpočtu rychlosti a převodů jednotek pro rychlost CESA6 částic. 0,6968 je zaokrouhlené číslo odpovídající počtu mikrometrů na 1px. V řádce výpočet je uveden postup výpočtu pro buňku výše.

3.6 Regenerace protoplastů

3.6.1 Izolace a regenerace protoplastů

Jeden ze základních problémů pro úspěšnou regeneraci buněčné stěny protoplastů *Arabidopsis thaliana*, byl výskyt kontaminace v protoplastových kulturách. Kvůli silné kontaminaci kultur izolovaných z rostlin pěstovaných na rašelinových jířech, byl zaveden postup práce se sterilním materiálem a ve sterilním prostředí. Postupů pro regeneraci protoplastů bylo vyzkoušeno několik, ale pouze při níže uvedeném postupu se regenerace protoplastů zdařila opakovaně.



Obrázek 15: Izolované protoplasty odebrány po první centrifugaci. Pozorováno na Olympus ProvisAX70, kamera Nikon DS-F11, průchozí světlo. Měřítko $\cong 100 \mu\text{m}$.

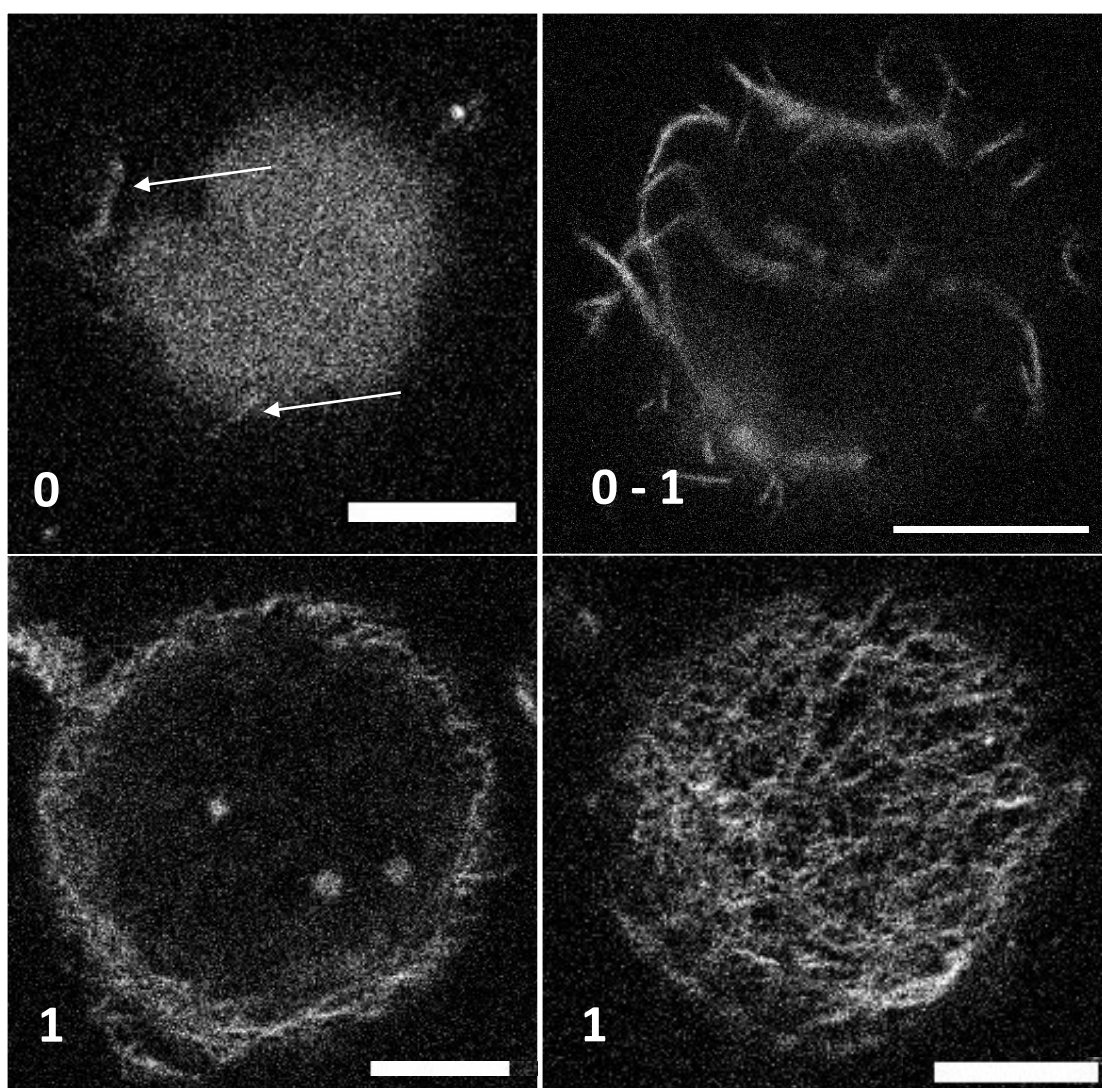
Postup:

1. Přefiltrovat enzymový roztok (složení viz 3.7.4, Tabulka 7) s rozpuštěným mannitolem, celulózou a macerozymem v množství podle počtu variant, se kterým se bude pracovat (10 ml na 1 typ vzorku – zhruba 70 – 100 rostlinek).
2. Desetidenní až čtrnáctidenní *in vitro* rostliny *Arabidopsis* sterilně nakrájet sterilním skalpelem na co nejmenší části. Použity byly nadzemní části rostlin, aby se enzymový

roztok nemísil s MS médiem, (složení viz 3.7.1, Tabulka 4) na kterém rostliny vyrostly. K nakrájeným částem přidat roztok TVL (složení viz 3.7.5, Tabulka 8) pro zvlhčení. Množství použitých rostlin by mělo odpovídat zhruba dvěma hustě vysetým řadám (cca 35 rostlin na řadu) na hranaté Petriho misce o rozměrech 12 x 12 cm.

3. Po nakrájení co nejrychleji resuspendovat rostlinné části v enzymovém roztoku (3-5 ml) v inkubační nádobě (např. kultivační destička se 6 jamkami nebo sterilní Petriho misky).
4. Inkubační nádobu uzavřít a zabezpečit proti světlu (např. alobal, černá látka) a při mírném třepání nechat působit enzymy při pokojové teplotě 10-12 hodin. Při příliš dlouhé inkubační době protoplasty odumírají.
5. Po uplynutí inkubační doby přefiltrovat enzymový roztok s protoplasty přes vrstvu miraclothu nebo přes sterilní nylonové sítko (velikost pórů: 100 μm).
6. Přefiltrované protoplasty bez rostlinných zbytků napipetovat do zkumavky (10 ml) zhruba po 2 ml. Poté opatrně převrstvit asi 1 ml roztoku W5 (složení viz 3.7.3, Tabulka 6) tak, aby se vrstvy nepromíchaly.
7. Centrifugace 100 g po dobu 7 minut (zrychlení 4, brzda 0). Po centrifugaci na dně zkumavky zůstávají mrtvé protoplasty či protoplasty se zbytky buněčné stěny a odpadní část vzorku. Na rozhraní vrstvy W5 a enzymového roztoku flotují živé protoplasty.
8. Flotující protoplasty odpipetovat do nových zkumavek a promíchat s roztokem W5 (nejen převrstvit).
9. Druhá centrifugace 100g, 7 minut.
10. Po druhé centrifugaci protoplasty klesnou ke dnu. Odstranit supernatant a protoplasty ze dna resuspendovat ve sterilním Gamborg B5 médiu s 0,45 M glukózou (složení viz 3.7.2, Tabulka 5).
11. Pro opravdu důkladné promytí lze přidat ještě 3. centrifugaci s Gamborgovým regeneračním médiem, po centrifugaci odsát (protoplasty sedimentují na dně) a resuspendovat v čerstvém regeneračním médiu.
12. Protoplasty inkubovat ve sterilní Petriho misce na světle v kultivační místnosti s fotoperiodou 16/8 při teplotě 25°C. Osvědčilo se inkubační misky uzavřít do ve větší Petriho misky s navlhčeným ubrouskem pro udržení vlhkosti.

13. Do 12 hodin od inkubace by již měly být viditelné známky regenerace protoplastů. Rozsáhlá celulózni síť je viditelná do 24 h. Nápadná je i velmi častá agregace regenerujících protoplastů do shluků.
14. Před pozorováním protoplasty přenést do mikroskopické eppendorfové kádinky (1-2 ml) a přidat roztok Calcofluoru white (1 μ l zásobního roztoku na 1 ml – viz 3.7.6). Vzorek centrifugovat opět při 100 g po 7 minut, aby se dosáhlo co nejvyšší hustoty protoplastů na pozorování.
15. Supernatant bez protoplastů odsát, ale nechat dostatek tekutiny pro odběry kapátkem na podložní sklo.

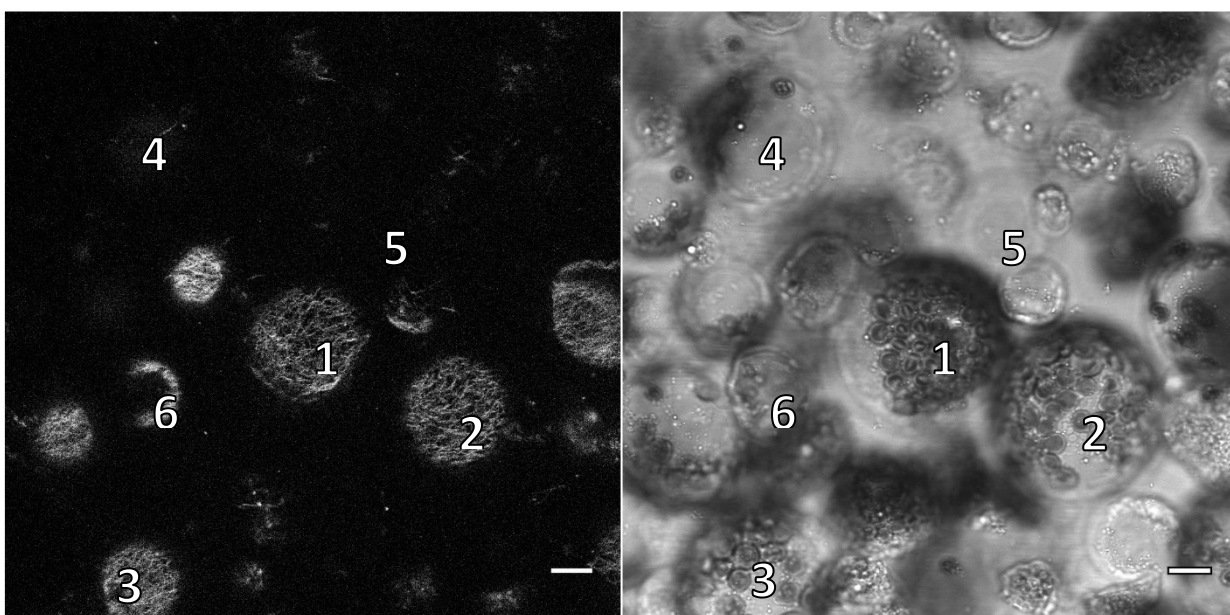


Obrázek 16: Stupně regenerace protoplastů. 0: Částečná obnova (šipkami označeno celulózni vlákno), 0-1: Částečná pokročilá obnova, 1: Úplná obnova buněčné stěny – vlevo i vpravo stejný protoplast v jiné rovině zaostření. Obarveno Calcofluorem White. Snímáno na konfokálním mikroskopu Leica TCS SP2, excitováno 405 nm diodovým laserem. Měřítka $\cong 10 \mu$ m.

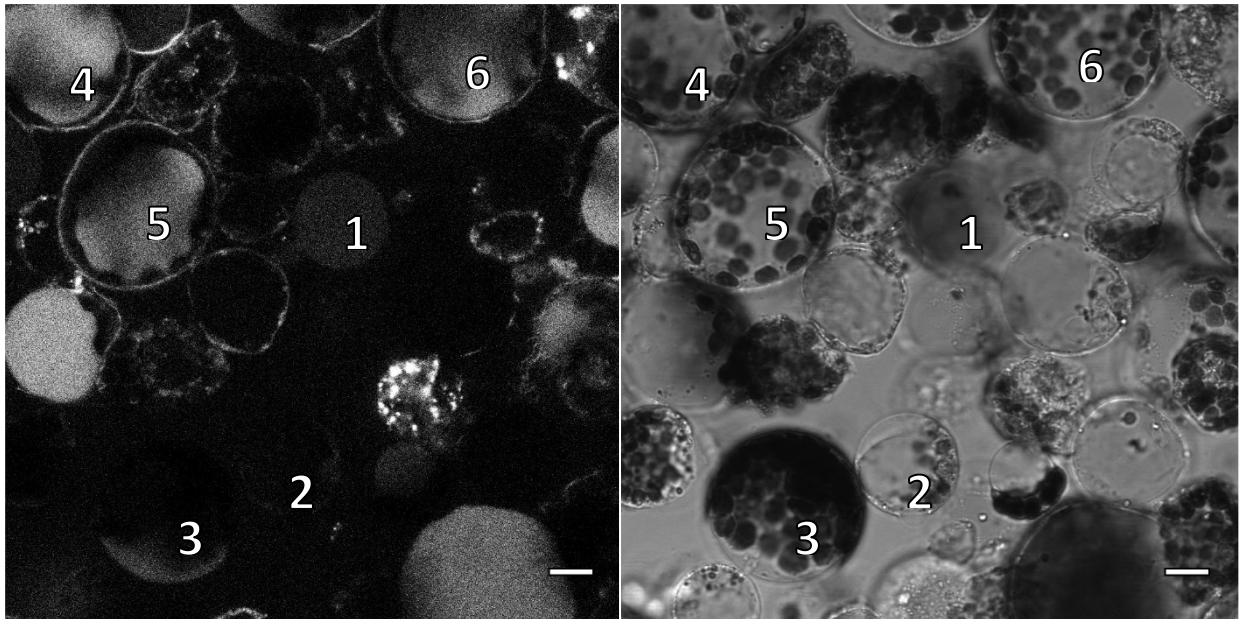
3.6.2 Zpracování dat z pozorování protoplastů

Protoplasty byly pozorovány na invertovaném konfokálním mikroskopu Leica TCS SP2 s diodovým laser s vlnovou délkou 405 nm pro excitaci v oblasti UV spektra. Byl použit objektiv s vodní imerzí se zvětšením 63x/1.2 W. Data byla uložena ve formátu *lei* o velikosti 1024 x 1024 px ($238,1 \mu\text{m}^2$) s rozlišením od 4,3 pixelů/ μm až po 36,4 px/ μm podle stupně přiblížení pomocí funkce Zoom.

Regenerující vzorky protoplastů byly nasnímány (viz Obrázek 17 a Obrázek 18) a následně kvantifikovány v programu ImageJ, který je schopen formát *lei* otevřít bez konverze do jiného formátu. Byly spočítány všechny živé protoplasty na snímku (kulaté, neporušené) za průchozího světla a následně na snímku z kanálu pro fluorescenci bylo spočítáno, kolik z těchto buněk jeví známky regenerace buněčné stěny. Regenerující buňky byly dále rozlišeny na buňky s částečnou obnovou (pracovní označení 0 nebo 0-1) a úplnou obnovou (pracovně označeno 1- viz Obrázek 16).



Obrázek 17: Shluk WT protoplastů obarvených CW po 16 h od přenosu do regeneračního média, zaostřeno na povrch protoplastů. Vlevo excitace 405 nm diodovým laserem. Vpravo stejný vzorek ve stejné poloze v průchozím světle. 1-3: úplně obnovená celulózní síť BS, 4: částečně obnovující protoplast (0), 5: neobnovující protoplast, 6: Poškozený protoplast (i přes viditelnou obnovu BS nebyl započítán jako živý protoplast). Snímáno na konfokálním mikroskopu Leica TCS SP2. Měřítka $\approx 10 \mu\text{m}$.



Obrázek 18: Shluk WT protoplastů v hlubší rovině zaostření obarvených CW po 16 h od přenosu do regeneračního média. Vlevo excitace 405 nm diodovým laserem. Vpravo stejný vzorek ve stejné poloze v průchozím světle. 1-3: neobnovující BS, 4-6: celulózní síť obnovena po celé buňce (viditelné při jiném zaostření).. Snímáno na konfokálním mikroskopu Leica TCS SP2. Měřítko $\cong 10 \mu\text{m}$.

3.7 Média a roztoky

Pro roztoky či média, která není možné klávkovat, bylo využito sterilní filtrace přes injekční filtry s póry o velikosti 0,22 µm. Zásobní roztoky enzymových roztoků, TVL, W5 byly sterilně skladovány v mrazu a při použití znovu přefiltrovány.

3.7.1 ½ MS médium pro in vitro pěstování *Arabidopsis thaliana*

1000 ml, pH 5,7	
½ MS solí	2,2 g
NH ₄ NO ₃	844 mg
H ₃ BO ₃	3,17 mg
CaCl ₂	170 mg
CoCl ₂ * 6H ₂ O	0,01 mg
CuSO ₄ * 6H ₂ O	0,01 mg
EDTA,2Na	19,1 mg
FeSO ₄ * 7H ₂ O	14,2 mg
MgSO ₄	92,5 mg
MnSO ₄ * H ₂ O	8,65 mg
Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	0,01 mg
KI	0,43 mg
KNO ₃	972 mg
KH ₂ PO ₄	87,0 mg
ZnSO ₄ * 7H ₂ O	4,40 mg
Sacharóza	10,0 g
Agar	8,0 g

Tabulka 4: Složení minimálního ½ MS média (Murashige a Skoog, 1962). Sterilizováno klávkováním.

3.7.2 Gamborgovo B5 médium

Mikroprvky	mg / 1 000 ml
CoCl ₂ * 6H ₂ O	0,025
CuSO ₄ * 5H ₂ O	0,025
FeNaEDTA	36,70
H ₃ BO ₃	3,00
KI	0,75
MnSO ₄ * H ₂ O	10,00
Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	0,25
ZnSO ₄ * 7H ₂ O	2,00
Makroprvky	mg / 1 000 ml
CaCl ₂	113,23
KNO ₃	2500,00
MgSO ₄	121,56

NaH ₂ PO ₄	130,44
(NH ₄) ₂ SO ₄	134,00
Vitamíny	mg / 1 000 ml
myo-Inositol	100,00
Nicotinic acid	1,00
Pyridoxine HCl	1,00
Thiamine HCl	10,00

Tabulka 5: Složení a koncentrace složek média Gamborg B5 včetně solí a vitamínů (Gamborg et al., 1968). Sterilizováno klávováním. Mikroprvky a makroprvky použity ze směsi solí pro Gamborgovo B5 médium – G5768 Sigma.

3.7.3 Roztok W5 – pH 5,7

CaCl ₂	1,84%
NaCl	0,9%
KCl	0,08%
MES-KOH (pH 5,7)	2 mM
Glukóza	0,1%

Tabulka 6: Složení a koncentrace jednotlivých složek roztoku W5 (Zhai et al., 2009). Sterilizováno filtrací.

3.7.4 Enzymový roztok pro izolaci protoplastů – pH 5,8

KCl	40 mM
CaCl ₂	20 mM
MES-KOH (pH 5,7)	10 mM
Sacharóza	0,5 M
Celuláza (Onozuka R-10)	1%
Macerozym (R10)	1%

Tabulka 7: Složení a koncentrace jednotlivých složek enzymového roztoku pro tvorbu protoplastů (Zhai et al., 2009). Sterilizováno filtrací.

3.7.5 TVL roztok

sorbitol	0,3 M
CaCl ₂	50 mM

Tabulka 8: Složení a koncentrace roztoku TVL pro zvlhčení krájených rostlin (Zhai et al., 2009). Sterilizováno filtrací.

3.7.6 Roztok Calcofluor White (CW)

Zásobní roztok Calcofluoru White uchovávaný v mrazu rozmrazit. Pokud je roztok Calcofluoru rozmrazovaný opakovaně a jeví známky zakalení, je potřeba centrifugovat asi 10 minut při maximálních otáčkách nebo připravit čerstvý. Starší roztoky CW mohou při pozorování pod mikroskopem způsobovat velmi jasně zářící artefakty. Množství je dostačující 1 μl na 1 ml suspenze, při vyšší koncentraci dochází k přesvěcování regenerující buněčné stěny zářícími agregáty CW.

4 Výsledky

V rámci diplomové práce byly zpracovány dva druhy dat. Hlavní část práce je zaměřena na analýzu dynamiky pohybu CESA komplexů v rostlinách s defektním ARP2/3 komplexem. Práci dále doplňují data z obnovy buněčné stěny protoplastů.

4.1 Analýza kymogramů YFP-CESA6 na PM

Aby bylo možné pomocí analýzy kymogramů porovnat dynamiku CESA komplexů mutantních rostlin *arp5* a *arp2* s dynamikou WT, bylo zapotřebí ke každému snímání mutantní varianty snímat a poté určit rychlost také u kontrolní varianty, kterou v této práci představuje YFP-CESA6^{prcl-1}. Průměrná rychlost CESA komplexů kontrolní varianty byla v této práci naměřena 325 ± 77 nm/min. V mutantní variantě *arp2* se CESA komplexy pohybovaly průměrnou rychlostí 264 ± 48 nm/min a ve variantě *arp5* byla průměrná rychlost CSC na membráně 279 ± 97,5 nm/min. Dle Tukeyho HSD testu (honestly significant difference) jsou průměrné rychlosti u obou mutantních variant oproti kontrolní variantě (A) signifikantně rozdílné při hladině významnosti 0,01 (viz Tabulka 9). Porovnáním mutantních variant (B, C) mezi sebou signifikantnost nebyla zjištěna (viz Tabulka 9). Kromě průměrné rychlosti bylo zkoumáno rozložení naměřených částic

Porovnání variant	Výsledek Tukeyho testu
A vs B	** p < 0,01
A vs C	** p < 0,01
B vs C	nesignifikantní

Tabulka 9: Významnost rozdílů v průměrné rychlosti CESA komplexů zkoumaných variant při hladině významnosti 0,01. Rychlost CESA komplexů kontrolní varianty (A) je signifikantně rozdílná vůči oběma mutantním variantám (B, C). Po srovnání mutantních variant mezi sebou nebyly jejich rychlosti CESA komplexů signifikantně odlišné (B vs C).

v určitých rychlostních kategoriích.

4.1.1 Analýza rychlosti CESA komplexů v kontrolní variantě

Byla zjištěna průměrná rychlost CESA komplexů kontrolní varianty YFP-CESA6^{prcl-1} 324,97 nm/min (± 77,77 nm/min) vypočítaná ze šesti buněk šesti různých rostlin ze šesti různých měření (viz Tabulka 10). Vypočítaná střední hodnota (medián) 320,61 je velmi blízko průměrné hodnotě. Celkem bylo vytvořeno 256 kymogramů, ze kterých bylo zpracováno 472 částic, které vykazovaly pohyb konstantní rychlostí po rovné trajektorii. Nejpomalejší naměřená částice měla rychlost 70,03 nm/min a naopak nejrychlejší dosahovala rychlosti 558,69 nm/min.

(A) CESA6-YFP						
Počet různých dní	Počet rostlin	Počet buněk	Počet kymogramů	Počet naměřených částic	Průměrná rychlost	Směrodatná odchylka
17-03-06	hyp1	cell4	50	63	280,40	64,06
17-03-10	hyp1	cell4	61	72	265,22	42,00
17-03-13	hyp1	cell6	70	105	375,16	46,46
17-05-19	hyp1	cell2	25	104	302,57	49,35
17-07-05	hyp1	cell2	21	68	319,17	81,49
18-02-20	hyp1	cell3	29	60	401,06	92,72
6	6	6	256	472	324,97	77,77

Tabulka 10: Přehled o jednotlivých měřeních kontrolní varianty použitých pro zpracování dat. V prvním sloupci je ve formátu RR-MM-DD uvedeno datum, kdy probíhalo snímání. Hyp1 ve sloupci Počet rostlin značí, kolikátá rostlina v pořadí během měření byla zpracována, a tím tedy kolik rostlin bylo použito. Počet buněk opět popisuje, že bylo zpracováno 6 různých buněk, pracovně označené různými čísly. Dále jsou uvedeny počty kymogramů, kolik bylo naměřeno z jednoho vzorku částic, průměrná rychlost jednotlivě a k rychlosti jsou uvedené směrodatné odchylky. Poslední řádek podává celkový přehled ze všech použitých variant. Průměrná rychlost i směrodatná odchylka jsou uvedeny v nm/ min).

Naměřené částice CESA komplexů byly dále rozděleny do rychlostních kategorií (viz Tabulka 11). Vzhledem k poměrně vysoké variabilitě výsledků, a tedy vysokým směrodatným odchylkám byly kategorie rozděleny po 50 nm/ min s první a druhou skupinou sloučenou do kategorie menší než 100 nm/ min pro velmi nízký výskyt částic v této kategorii. Stacionární částice nebyly v této práci hodnoceny, ale jejich výskyt byl ve vytvořených videích příležitostně také pozorován. Jako horní hranice pro nejvyšší rychlostní kategorii byla vybrána hodnota 500 nm/ min, přičemž bylo změřeno několik částic, které tuto hodnotu překročily. Největší četnost byla zaznamenána v rychlostních kategoriích

CESA6-YFP			< 100	100 - 149	150 - 199	200 - 249	250 - 299	300 - 349	350 - 399	400 - 449	450 - 499	> 500
17-03-06	hyp1	cell4	1	0	4	14	23	13	6	2	0	0
17-03-10	hyp1	cell4	0	0	0	22	36	13	1	0	0	0
17-03-13	hyp1	cell6	0	0	0	0	4	27	53	15	5	1
17-05-19	hyp1	cell 2	0	0	3	12	31	43	13	2	0	0
17-07-05	hyp1	cell2	0	0	3	12	13	14	16	5	4	1
18-02-20	hyp1	cell3	0	0	0	5	8	5	7	12	15	8
Celkem			1	0	10	65	115	115	96	36	24	10
Celkem v %			0,21%	0,00%	2,12%	13,77%	24,36%	24,36%	20,34%	7,63%	5,08%	2,12%

Tabulka 11: Přehled četností v rychlostních kategoriích (nm/ min) z jednotlivých měření kontrolní varianty. Barevné rozlišení odpovídá grafům níže pro lepší přehlednost při porovnávání s mutantními variantami. V řádce Celkem jsou součty naměřených částic ze všech měření. V posledním řádku jsou hodnoty z řádku Celkem převedeny na procentní vyjádření výskytu dané kategorie vzhledem k celkovému počtu naměřených částic (n = 472).

250 - 299 nm/ min (24,36 %), 300 - 349 nm/ min (24,36 %) a jen o trochu nižší v kategorii 350 - 399 nm/ min (20,34 %) (viz Tabulka 11 a **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**).

4.1.2 Analýza rychlosti CESA komplexů *arp2* mutanta

Průměrná rychlost CESA komplexů v *arp2* mutantech byla 263,5 nm/ min +/- 47,53 nm/ min. V porovnání s kontrolní variantou (průměrná rychlost 324,97 nm/ min) je rychlost CESA komplexů u mutanta s defektní podjednotkou ARP2 signifikantně nižší (viz Graf 3). Nejrychlejší změřená částice dosahovala rychlosti 385,92 nm/ min a nejnižší rychlosti 162,91 nm/ min. Střední hodnota z naměřených rychlostí byla určena na 260,55 nm/ min. Ze tří biologických opakování bylo změřeno rychlost 222 částic *arp2* mutantů ze 110 kymogramů (viz Tabulka 12).

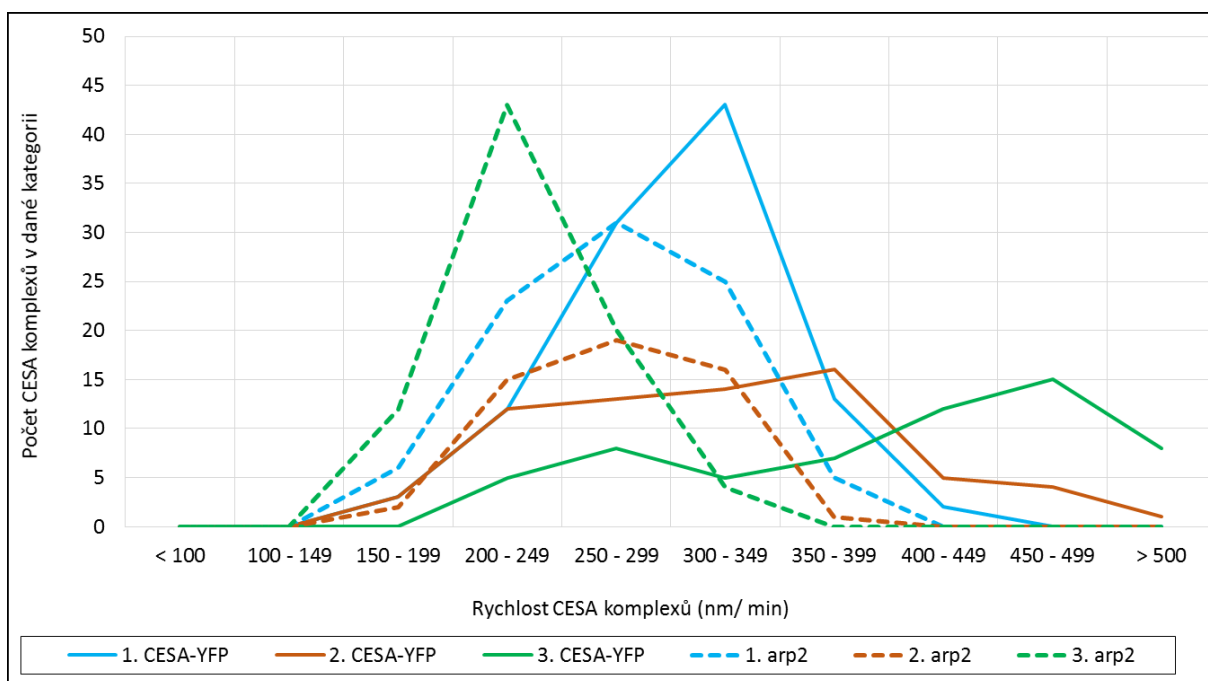
(C) <i>arp2</i>						
Počet různých dní	Počet rostlin	Počet buněk	Počet kymogramů	Počet naměřených částic	Průměrná rychlost	Směrodatná odchylka
17-05-19	hyp1	cell7	50	90	277,2	48,40
17-07-05	hyp2	cell3	30	53	275,5	47,75
18-02-20	hyp1	cell1	30	79	239,8	35,72
3	3	3	110	222	263,50	47,53

Tabulka 12: Přehled o jednotlivých měřeních varianty *arp2* použitých pro zpracování dat. V prvním sloupci je ve formátu **RR-MM-DD** uvedeno datum, kdy probíhalo snímání. **Hyp1**, případně **hyp2** ve sloupci Počet rostlin značí, kolikátá rostlina v pořadí během měření byla zpracována, a tím tedy kolik rostlin bylo použito. Počet buněk opět popisuje, že bylo zpracováno 3 různé buňky, pracovně označené různými čísly. Dále jsou uvedeny počty kymogramů, kolik bylo naměřeno z jednoho vzorku částic, průměrná rychlost jednotlivě a k rychlosti jsou uvedené směrodatné odchylky. Poslední řádek podává celkový přehled ze všech použitých variant. Průměrná rychlost i směrodatná odchylka jsou uvedeny v nm/ min).

Stejně jako v kontrolní variantě byly i u *arp2* mutantů naměřené rychlosti rozděleny do rychlostních kategorií (viz Tabulka 13, Graf 4). Nejčastěji se pohybovaly částice rychlostí

<i>arp2</i>			< 100	100 - 149	150 - 199	200 - 249	250 - 299	300 - 349	350 - 399	400 - 449	450 - 499	> 500
17-05-19	hyp1	cell7	0	0	6	23	31	25	5	0	0	0
17-07-05	hyp2	cell3	0	0	2	15	19	16	1	0	0	0
18-02-20	hyp1	cell1	0	0	12	43	20	4	0	0	0	0
Celkem			0	0	20	81	70	45	6	0	0	0
Celkem v %			0,00%	0,00%	9,01%	36,49%	31,53%	20,27%	2,70%	0,00%	0,00%	0,00%

Tabulka 13: Přehled četností v rychlostních kategoriích (nm/ min) z jednotlivých měření *arp2* mutantů. Barevné rozlišení odpovídá grafům níže pro lepší přehlednost při porovnávání s kontrolní variantou. V řádku Celkem jsou součty naměřených částic ze všech tří měření. V posledním řádku jsou hodnoty z řádku Celkem převedeny na procentní vyjádření výskytu dané kategorie vzhledem k celkovému počtu naměřených částic (n = 222).



Graf 1: Rozložení naměřených částic v rychlostních kategoriích z měření kontrolní varianty a arp2 dle jednotlivých dní (3 opakování). Plnou čarou značena kontrolní varianta, arp2 mutant vyznačen přerušovaně. Barvy čar odpovídají barevnému značení přehledové tabulky jednotlivých měření, viz Tabulka 13.

200 – 249 nm/ min (36,49 %) a necelých 32 % změřených CESA komplexů se pohybovalo rychlostí od 250 do 299 nm/ min. Nebyly změřeny žádné CESA komplexy pohybující se větší rychlostí než 400 nm/ min (viz Graf 1, Graf 4).

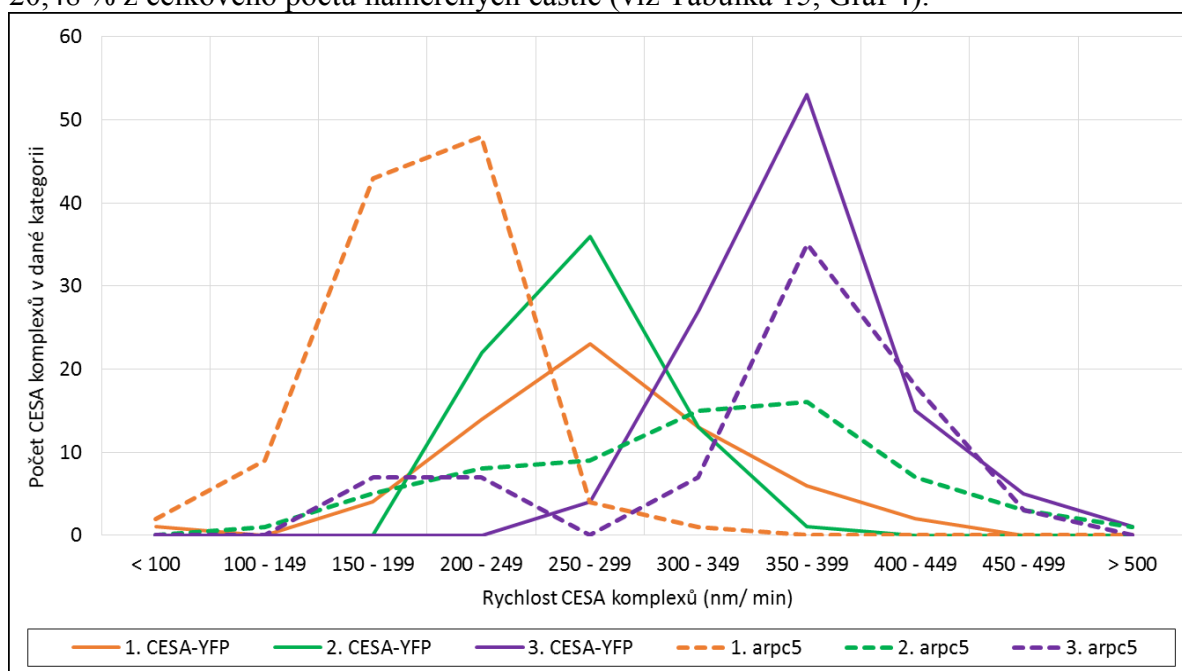
4.1.3 Analýza rychlosti CESA komplexů arp5 mutanta

Mezi mutantem arp5 a arp2 nebyl zjištěn signifikantní rozdíl v rychlosti pohybu CESA komplexů na membráně. Avšak stejně jako u arp2 mutanta, tak i arp5 mutant

(B) arp5						
Počet různých dní	Počet rostlin	Počet buněk	Počet kymogramů	Počet naměřených částic	Průměrná rychlost	Směrodatná odchylka
17-03-06	hyp1	cell3	89	107	195,77	35,11
17-03-10	hyp1	cell2	57	65	326,39	80,68
17-03-13	hyp2	cell4	42	77	354,43	79,24
3	3	3	188	249	278,93	97,43

Tabulka 14: Přehled o jednotlivých měřeních varianty arp5 použitých pro zpracování dat. V prvním sloupci je ve formátu RR-MM-DD uvedeno datum, kdy probíhalo snímání. Hyp1, případně hyp2 ve sloupci Počet rostlin značí, kolikátá rostlina v pořadí během měření byla zpracována, a tím tedy kolik rostlin bylo použito. Počet buněk opět popisuje, že bylo zpracováno 3 různé buňky, pracovně označené různými čísly. Dále jsou uvedeny počty kymogramů, kolik bylo naměřeno z jednoho vzorku částic, průměrná rychlost jednotlivě a k rychlosti jsou uvedené směrodatné odchylky. Poslední řádek podává celkový přehled ze všech použitých variant. Průměrná rychlost i směrodatná odchylka jsou uvedeny v nm/ min).

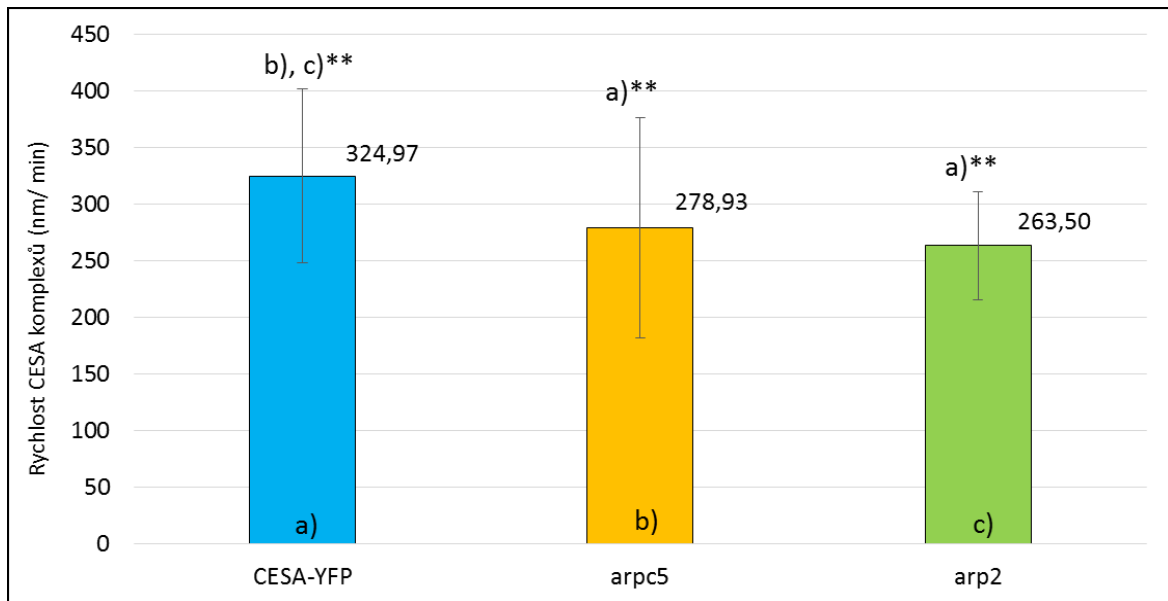
vykazuje signifikantně nižší rychlost CESA komplexů oproti kontrolní variantě mez *arp* mutace (viz **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**). Průměrná rychlost zachycených CESA komplexů je v *arpc5* mutantovi 278,93 nm/ min \pm 97,43 nm/ min (u kontrolní varianty 324,97 nm/ min). Hodnota mediánu byla vypočítána na 241,09 nm/ min. Nejnižší naměřená rychlost byla 90,76 nm/ min a nejvyšší 517,63 nm/ min. Změřeno bylo 249 CESA částic ze 188 vytvořených kymogramů (viz Tabulka 14). Podobně jako u *arp2* mutantu, nejvíce změřených CESA komplexů se pohybovalo rychlostí od 200 do 250 nm/ min (25,30 %), pouze o 8 částic méně bylo naměřeno v rychlostní kategorii 150 - 199 nm/ min (22,09 %). Nicméně oproti předchozí mutantní variantě *arp2*, je u *arpc5* mutantu významné zastoupení i CESA komplexů pohybujících se rychlostí 350 - 399 nm/ min v hodnotě odpovídající 20,48 % z celkového počtu naměřených částic (viz Tabulka 15, Graf 4).



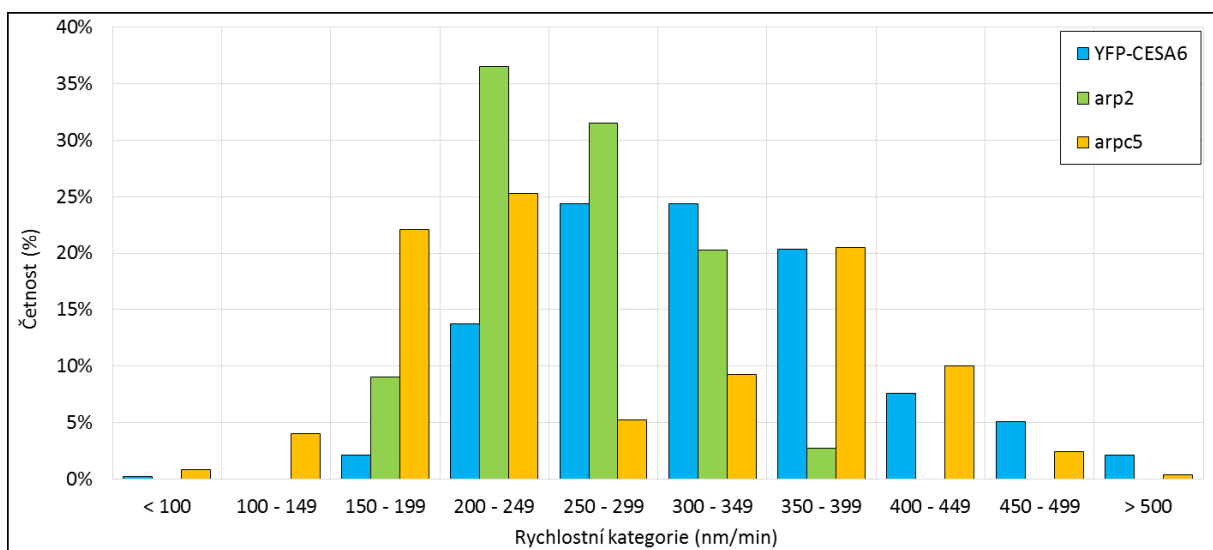
Graf 2: Rozložení naměřených částic v rychlostních kategoriích z měření kontrolní varianty a *arpc5* dle jednotlivých dní (3 opakování). Plnou čarou značena kontrolní varianta, *arpc5* mutant značen přerušovaně. Barvy čar odpovídají barevnému značení přehledové tabulky jednotlivých měření, viz Tabulka 14.

arpc5			< 100	100 - 149	150 - 199	200 - 249	250 - 299	300 - 349	350 - 399	400 - 449	450 - 499	> 500
17-03-06	hyp1	cell3	2	9	43	48	4	1	0	0	0	0
17-03-10	hyp1	cell2	0	1	5	8	9	15	16	7	3	1
17-03-13	hyp2	cell4	0	0	7	7	0	7	35	18	3	0
Celkem			2	10	55	63	13	23	51	25	6	1
Celkem v %			0,80%	4,02%	22,09%	25,30%	5,22%	9,24%	20,48%	10,04%	2,41%	0,40%

Tabulka 15: Přehled četností v rychlostních kategoriích (nm/ min) z jednotlivých měření *arpc5* mutantů. Barevné rozlišení odpovídá grafům níže pro lepší přehlednost při porovnávání s kontrolní variantou. V řádce Celkem jsou součty naměřených částic ze všech tří měření. V posledním řádku jsou hodnoty z řádku Celkem převedeny na procentní vyjádření výskytu dané kategorie vzhledem k celkovému počtu naměřených částic (n = 249).



Graf 3: Průměrné rychlosti jednotlivých testovaných variant (** značí signifikantní rozdíl k dané variantě označené písmenem, hladina významnosti 0,01). Rozptylové úsečky představují směrodatné odchylky.



Graf 4: Celkové rozdělení naměřených YFP-CESA6 částic do rychlostních kategorií: kontrolní varianta (modře), arp2 (zeleně), arpc5 (oranžově).

4.2 Kvantifikace obnovy buněčné stěny protoplastů

Úspěšně byly provedeny dva pokusy regenerace protoplastů *Arabidopsis thaliana*, v obou případech s WT a *arpc5* rostlinami. Izolace a regenerace protoplastů *arp2* mutantů zřejmě potřebuje odlišné podmínky, neboť za podmínek uvedených v této práci nebylo regenerace *arp2* protoplastů docíleno. Je možné, že protoplasty *arp2* mutantních rostlin jsou citlivější k délce působení nebo ke koncentraci enzymů zbavujících buňku buněčné stěny a úspěšná izolace vyžaduje kratší dobu působení enzymů.

V prvním úspěšném pokusu byly protoplasty pozorovány po 16 h od resuspendování v regeneračním médiu. Celkem bylo nasnímáno 110 živých protoplastů z WT rostlin a 112 z *arpc5* mutantů. Počet obnovujících oproti neobnovujícím byl velmi vyvážený – 63 WT protoplastů (57,27 %) a 66 *arpc5* protoplastů (58,93 %). Výskyt plně obnovené buněčné stěny však jasně převažoval u WT rostlin, kde úplná regenerace byla nalezena u 73 % obnovujících protoplastů, tedy 27% vykazovalo pouze částečně obnovenou celulózní síť buněčné stěny. Naopak u *arpc5* mutantů se u 74 % obnovujících protoplastů buněčná stěna regenerovala pouze částečně, a tedy plná regenerace byla pozorována jen u 26% regenerujících protoplastů.

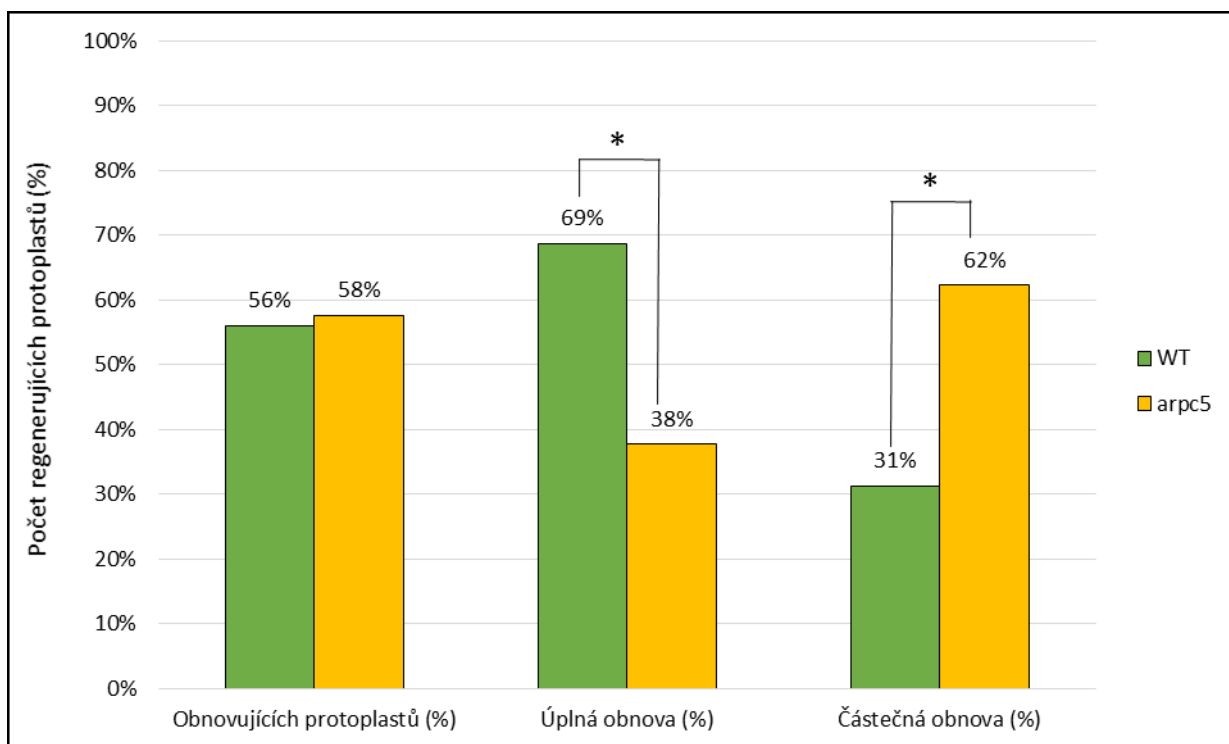
Druhé měření probíhalo až po 24 h od resuspendování v Gamborgově B5 regeneračním médiu. Celkem bylo nasnímáno 90 živých protoplastů WT a 89 protoplastů *arpc5*. Procento obnovujících protoplastů vzhledem k celkovému počtu živých protoplastů bylo obdobné jako v prvním měření – 54,44 % obnovujících WT protoplastů (49 protoplastů) a 55,81 % pro *arpc5* mutanty (48 protoplastů). Úplná obnova buněčné stěny po 24 h byla u WT zaznamenána v 63 %, tedy 37% regenerujících protoplastů mělo obnovu celulózní sítě pouze částečnou. Ze 48 *arpc5* regenerujících protoplastů po 24 zhruba polovina (54 %) z nich vykazovala úplnou obnovu celulózní sítě, tedy u 46% byla regenerace ještě pouze částečná.

Celkem bylo z obou měření pro WT nasnímáno 200 živých protoplastů, z toho 56 % jevílo známky regenerace buněčné stěny (112 protoplastů), přičemž 68,75 % nasnímaných protoplastů mělo již úplně obnovenou buněčnou stěnu. Živých *arpc5* protoplastů bylo

	Celkem protoplastů	Obnovujících protoplastů	Obnovujících protoplastů (%)	Úplná obnova	Úplná obnova (%)	Částečná obnova	Částečná obnova (%)
WT	200	112	56%	77	69%	35	31%
<i>arpc5</i>	198	114	58%	43	38%	71	62%

Tabulka 16: Přehled výsledků ze dvou pozorování regenerace protoplastů WT a *arpc5* mutantních rostlin.

nasnímáno celkem 198, z toho 114 jich obnovovalo buněčnou stěnu (57,58 %). Ze 114 obnovujících arpc5 protoplastů pouze 43 protoplastů (37,72 %) vykazovalo úplnou obnovu buněčné stěny (viz Tabulka 16 a Graf 5).



Graf 5: Procentuální přehled výsledků ze dvou měření regenerujících protoplastů z WT a arpc5 rostlin. Signifikantnost rozdílů ověřena χ^2 testem. Rozdíl v celkovém počtu obnovujících protoplastů mezi WT a arpc5 není signifikantní ($p = 0,8289$). Mutant arpc5 a WT se však významně liší v rychlosti regenerace buněčné stěny (označeno *, $p = 1,718 \times 10^{-5}$).

5 Diskuze

Tato diplomová práce měla za cíl určit, zda a jak bude dynamika CESA komplexů na plazmatické membráně ovlivněna, pokud budou mít rostliny nefunkční podjednotku ARP2/3 komplexu. ARP2/3 komplex je jedním ze dvou objevených nukleátorů polymerace aktinu v rostlinách. Bez nukleačních mechanismů by nová aktinová vlákna mohla vzniknout pouze spontánně při vysoké koncentraci G-aktinu, přičemž spontánně aktinové vlákno v buňkách *in vivo* vzniká ve velmi nízké míře. CESA komplexy jsou pro rostlinu nesmírně důležitou součástí, protože v současné době představují jediný známý mechanismus pro syntézu celulózy rostlinných buněčných stěn. Studium souvislostí mezi CESA komplexy a cytoskeletem se zabývalo již mnoho autorů s důrazem především na mikrotubulární cytoskelet. V poslední době se do popředí ale dostávají také práce zaměřené na aktinový cytoskelet – teprve v roce 2013 bylo prokázáno, že aktinový cytoskelet reguluje míru doručování i životnost CESA komplexů na plazmatické membráně (Sampathkumar et al., 2013).

5.1 Rychlost pozorovaných YFP-CESA6 na PM

Hlavní částí práce bylo měření rychlosti CESA komplexů na plazmatické membráně vizualizací podjednotky CSC pomocí YFP (YFP-CESA6) v hypokotylech a porovnat rychlost CSCs nulových mutantů *arp5* a *arp2* s kontrolní variantou exprimující YFP-CESA6 v mutantním pozadí *prc1-1* pomocí analýzy kymogramů. Mutantní rostliny *arp5* a *arp2* byly v této práci kříženy s linií YFP-CESA6 v mutantním pozadí *prc1-1*. Získán byl tedy unikátní rostlinný materiál s mutantní podjednotkou ARP2/3 komplexu *arp2* a *arp5* exprimující YFP-CESA6 v mutantním pozadí *prc1-1*. Nové rostlinné linie představují užitečný nástroj, jak *in vivo* pozorovat celulózasyntázy v buňkách s poškozeným cytoskeletem. V době odevzdávání této práce byla také připravena k dalšímu přepěstování a selekci i linie s nulovou ztrátovou mutací podjednotky ARP3 (SALK_022445.34.70). Bylo doloženo, že YFP-CESA6 plně komplementuje *prc1-1* mutaci (Paredes et al., 2006). Současná představa o složení primárního CESA komplexu je taková, že obsahuje vždy tři různé třídy CESA enzymů, přičemž CESA1 a CESA3 jsou nepostradatelné a o místo třetího enzymu v komplexu soutěží CESA6 s CESA6-like proteiny (CESA2, 5 a 9), které jsou k CESA6 částečně redundantní. Je důležité si uvědomit, že rychlost CSCs pro syntézu primární BS v plazmatické membráně není nijak vysoká, v přepočtu by CSC touto rychlostí urazil 1 μm až za více než 3 minuty.

Průměrná rychlost kontrolní varianty YFP-CESA6 naměřená v této diplomové práci je 325 ± 78 nm/ min ($n = 472$), což je hodnota podobná zjištěným průměrným rychlostem CESA proteinů jinými autory. Paredez et al. (2006) zkoumající mezi prvními dynamiku CSC in vivo naměřili velmi podobnou rychlost YFP-CESA6, a sice 330 ± 65 nm/ min ($n = 303$) s rozsahem rychlostí od 150 do 500 nm/ min. Desprez et al. (2007) změřili rychlost, jak GFP-CESA6, tak GFP-CESA3, přičemž jejich rychlost i distribuce v rychlostních kategoriích byla velmi obdobná (GFP-CESA6: 272 nm/ min; GFP-CESA3: 277 nm/ min). Nižší průměrnou rychlost YFP-CESA6 naměřili DeBolt et al. (2007), a sice 250 ± 37 nm/ min. Podobně nízkou průměrnou rychlost YFP-CESA6 naměřili i Chen et al. (2016) v obou směrech pohybu CESA komplexů. Naopak vyšší průměrná rychlost, oproti mému výsledku, byla změřena v práci Gu et al. (2010) u YFP-CESA6 s rychlostí 365 ± 45 nm/ min ($n = 318$). Poměrně recentní studie Harrise et al. (2012) uvádí průměrnou rychlost pro YFP-CESA6 349 nm/min ($n = 720$), což souhlasí s hodnotou naměřenou v této práci. Výsledky různých autorů tedy naznačují, že rychlost CESA komplexů se pohybuje v celkem širokém rozmezí 250-365 nm/min, které může být dáno různým experimentálním materiálem či experimentálními podmínkami. Mnou naměřená průměrná rychlost 325 nm/min plně spadá do toho intervalu.

Je však potřeba brát v potaz, že hodnocení rychlosti částic na základě analýzy kymogramů člověkem je subjektivní proces a každý hodnotitel tak může nechtěně ovlivnit výsledek. Alternativou k individuálnímu hodnocení kymogramů může být automatické sledování částic (Woodley et al., 2018), které omezuje sklony ovlivnit měření subjektivitou a zároveň umožňuje za stejný čas sesbírat a vyhodnotit mnohem větší vzorek, neboť u tvorby a analýzy kymogramů musí být každá částice změřena samostatně. Podle autorů Fujita et al. (2011, 2013) na rychlost CSCs může mít i poměrně zásadní vliv teplota, ve které byly rostliny kultivovány před měřením. Zmínění autoři ukázali, že rychlost YFP-CESA6 v rostlinách pěstovaných při 21°C byla 84 ± 47 nm/ min, po 3 h při 29°C se však průměrná rychlost zvýšila na 311 ± 89 nm/ min a po dalších 24 h při 29°C dokonce na 354 ± 73 nm/ min (Fujita et al., 2011). Teplota kultivační místnosti využívané během této práce byla nastavena na 25°C , zatímco některé publikace uvádí v pěstebních podmínkách 22°C , to by mohlo být alespoň z části důvodem pro odlišné výsledky průměrných rychlostí u kontrolních variant. Pro porovnání mé kontrolní varianty s mutanty *arpc5* a *arp2* je možnost ovlivnění výsledků různou teplotou v kultivační místnosti vyloučena, neboť vždy

probíhalo měření mutantu a kontrolní varianty ve stejný den a všechny varianty byly pěstovány za stejných podmínek.

5.2 Role ARP2/3 komplexu v syntéze celulózy?

U celé řady mutantů *Arabidopsis thaliana* s defektním růstem buněk jsou tyto defekty způsobeny změnou ve stavbě či složení primární buněčné stěny. V mnoha případech byl u nesprávně rostoucích buněk zjištěn nižší obsah celulózy, což může být způsobeno celou škálou příčin, ale ve výsledku všechny ovlivňují celulózasyntázy, které celulózu produkují. Snížený obsah celulózy se velmi často projevuje nápadně nižším vzrůstem celé rostliny a izotropicky rostoucími buňkami – především v epidermálních buňkách kořenu a hypokotylu (Arioli et al., 1998; Cano-Delgado et al., 2003; Desprez et al., 2002; Fagard et al., 2000; Fujita et al., 2013; Williamson et al., 2001). Mutace způsobující snížený obsah celulózy bývají často doprovázeny projevem zvýšeného množství pektinů (His et al., 2001; Mouille et al., 2003; Peng et al., 2000; Sato et al., 2001). Ukazuje se, že tento úkaz platí i pro *arp* mutanty. Buněčné stěny dospělých rostlin (stáří 6 týdnů) s defektním ARP2/3 komplexem vykazují změny ve složení BS - obsahují méně celulózy, mají zvýšený obsah homogalakturonanů (pektinů) a také mají pozměněnou lignifikaci, což naznačuje úlohu ARP2/3 komplexu v morfogenezi buněčné stěny (Sahi, Cifrová et al., 2017). Nižší obsah celulózy detekovali i Sampatkumar et al. (2013) v rostlinách s mutacemi v genech aktinu. Ve studii Sampat Kumara et al. (2013) však redukovaný obsah celulózy byl rozpoznatelný v mutantovi aktinu *act2act7* již ve stádiu semenáčků, zatímco Sahi, Cifrová et al. (2017) u čtyřdenních hypokotylů nenaměřili rozdíl v obsahu celulózy mezi rostlinami s nefunkčním ARP2/3 komplexem a WT. To může znamenat, že snížená rychlost pohybu CESA komplexů nemá u *arp* mutantů v této vývojové fázi na strukturu buněčné stěny zásadní vliv, případně může být snížená rychlost komplexů komplementována jiným jevem.

Basu et al. (2008) objevili, že GEF SPIKE1 (SPK1) v rostlinách aktivuje WAVE/SCAR (W/SRC) komplex – jediný známý NPF ARP2/3 komplexu (Yanagisawa et al., 2013; Zhang et al., 2008). Bylo také potvrzeno zapojení SPK1 do procesu zašpičatění trichomů (Yanagisawa, et al., 2018), což je proces závislý na aktivitě ARP2/3 komplexu (Yanagisawa, et al., 2015). Umístění SPK1 se podobá lokalizaci W/SRC a ARP2/3 komplexů v apikální zóně bez mikrotubulů, přičemž signál SPIKE1 byl emitován z pouzdra asociovaného s PM (Yanagisawa, et al., 2018). Aktivovaný ARP2/3 komplex poté v trichomu nukleuje aktinovou síť, která řídí cytoplazmický proud ovlivňující tloušku

tvořené buněčné stěny (Yanagisawa, et al., 2015). Ačkoliv je trichom poměrně specifický rostlinný útvar, je známo, že jeho růst je difúzní podobně jako většina buněk rostlinného těla a lze tedy očekávat podobně fungující mechanismus i u jiných difúzně rostoucích buněk. Umístění SPIKE1 v místě syntézy BS trichomu tak představuje další vodítko pro roli ARP2/3 komplexu v syntéze BS.

V minulosti byl již mnohokrát popsán fenotyp *arp* mutantů se zakrslým hypokotylem (Basu et al., 2004, 2005; El-Assal et al., 2004; Le et al., 2006; Li et al., 2004; Mathur et al., 2003b; Saedler et al., 2004; Zhang et al., 2008). V recentní publikaci Sahi, Cifrová et al. (2017) poukázali na to, že menší růst hypokotyly je způsoben spíše defektem v elongačním růstu spíše než v radiálním. Ve všech třech testovaných mutantech (*arp2*, *arpc4* i *arpc5*) pozorovali Sahi, Cifrová et al. (2017) kratší (méně elongované) etiolované hypokotyly i kratší dospělé stonky. Prokázali také defekty v radiálním růstu dospělých orgánů (užší pravé listy, stonky) u všech tří testovaných mutantů, ale pouze u některých *arp* mutantů byl signifikantně ovlivněn radiální růst desetidenního hypokotyly (*arpc4*) a děložních listů (*arpc5*). Všechny objevené defekty *arp* mutantů dle Sahi, Cifrová et al. (2017) přispívají k menšímu vzrůstu celé rostliny - nižší obsah celulózy, navýšený obsah pektinů, méně lignifikované a tenčí buněčné stěny.

Defektní růst hypokotyly je u *arpc5* a *arp2* mutantů způsoben především abnormální organizací aktinové sítě. Hypokotylové buňky ve WT mají jemnou kortikální F-aktinovou síť a podélně protažené subkortikální provazce spojující konce buněk relativně bohaté na aktin, oproti tomu u *arpc5* (Mathur et al., 2003b) se F-aktinová vlákna shluknou do tlustých příčně spojených svazků. V etiolovaných hypokotylech *arpc5* pak byly svazky aktinu prodlouženy buď v celé buňce, nebo byly omezeny na malé oblasti na konci buněk – tato nerovná distribuce dává vzniknout vybouleninám na konci buněk, které následně mohou způsobit mezery mezi buňkami (Mathur et al., 2003b). Podobný fenotyp a abnormální organizace aktinu byly zjištěny i pro *arp2* (Mathur et al., 2003a).

V této práci byla v porovnání s WT naměřena signifikantně nižší rychlost CESA komplexů v rapidně elongujících buňkách tří denních etiolovaných hypokotylů *arp2* a *arpc5*. Toto přispívá k úvaze o zapojení ARP2/3 komplexu do procesu syntézy celulózy a v širším pojetí tedy i do morfogeneze celé buněčné stěny. Nižší rychlost CESA komplexů by logicky měla způsobit pomalejší produkci celulózy, což by se projevilo deficitem v obsahu celulózy. Podle Sahi, Cifrová et al. (2017) však u čtyřdenních mutantů *arp2* ani *arpc5* deficit celulózy vůči WT nebyl zjištěn. Sampathkumar et al. (2013) také zkoumal, zda nižší obsah celulózy

u aktinového mutanta *act2act7* není způsoben nižší rychlostí CESA komplexů, ale nebyl zjištěn žádný signifikantní rozdíl v rychlostech při pozorování oproti WT ani variantě ošetřené latrunkulinem B. Znamená to, že narušení aktinového cytoskeletu ztrátou genů *act2* a *act7*, a depolymerací aktinu pomocí latrunkulinu B má v buňkách jiné projevy než ztráta ARP2/3 komplexu. ARP2/3 komplex by mohl hrát unikátní roli v kontrole syntézy buněčné stěny. Ačkoliv byly v *arp* mutantních hypokotylech zjištěny pomalejší CESA komplexy, samotná nižší rychlost CESA v hypokotylu významný deficit celulózy zřejmě nezpůsobí.

Nelze vyloučit, že úlohu ARP2/3 komplexu ovlivňující obsah celulózy v BS dokážou u *Arabidopsis* v raném stádiu vývoje nahradit forminy jakožto další nukleátor aktinu, a změna v obsahu celulózy se projeví až v pozdější fázi vývoje rostliny, kdy už forminy defektní ARP2/3 komplex v tomto ohledu komplementovat nedokážou. Komplementovat úlohu nefunkčního ARP2/3 komplex může v semenáčcích i úplně jiný neznámý mechanismus. Také je možné, že nižší rychlost CESA komplexů *arp2* a *arpc5* mutantů je kompenzována větším množstvím CESA komplexů. Delší setrvání CESA na PM způsobené nižší mírou internalizace CESA by vyrovnalo nižší rychlost komplexů, neboť délku tvořeného glukanového řetězce celulózní mikrofibrily lze odvodit od rychlosti CESA komplexu násobeného délkou setrvání na PM. Podobně by hustotu CESA komplexů zvýšila větší míra doručování CESA na PM. V této práci však hustota ani míra doručování CESA částic nebyla zkoumána.

Výsledky z experimentu regenerace buněčné stěny protoplastů *arpc5* mutantů ukazují, že *arpc5* mutace neovlivnila množství regenerujících protoplastů. Bohužel nebylo možné z časových důvodů provést další pozorování regenerujících protoplastů a data pochází pouze ze dvou biologických opakování. Výrazný rozdíl však byl ukázán v rychlosti obnovy buněčné stěny protoplastů, neboť bylo naměřeno signifikantně více protoplastů *arpc5*, které vykazovaly pouze částečnou obnovu celulózní sítě oproti WT, kde byla pozorována u většiny regenerujících protoplastů úplná regenerace celulózní sítě po celé buňce. Při druhém pozorování protoplastů, které probíhalo až po 24 h od přenesení protoplastů do regeneračního média, byl počet obnovujících protoplastů procentuálně téměř shodný s prvním pozorováním provedeným po 16 h, ale po 24 h bylo zaznamenáno o polovinu více protoplastů *arpc5*, které stihly vytvořit celulózní síť po celé buňce oproti měření *arpc5* protoplastů pozorovaných po 16 h. Tyto výsledky z experimentu nezávislého na měření rychlosti CESA komplexů představují další důkaz o změnách v rychlosti syntézy celulózy způsobené nefunkčním ARP2/3 komplexem. I z tohoto experimentu je zřejmé, že ztráta

ARP2/3 komplexu nezpůsobuje rozsáhlé změny v syntéze celulózy, ale pouze částečně narušuje či zpomaluje tento proces. Opět to naznačuje unikátní, pravděpodobně regulační roli ARP2/3 komplexu. Tato role je zřejmě v jinak zdravé rostlině nahraditelná jiným procesem, a neprojevuje se tak na obsahu celulózy ve fázi semenáčku. Fenotypový projev je detekovatelný v pozdních fázích vývoje (šestitýdenní rostliny - Sahi, Cifrová et al., 2017) či ve stresových podmínkách (pomalejší obnova buněčné stěny po jejím odstranění v protoplastech).

5.3 Molekulární mechanismus

Rozložení a orientace kortikálních mikrotubulů pod plazmatickou membránou představují pro CESA komplexy vzor, podle kterého se CSC pohybují membránou (Paredes et al., 2006). Při působení inhibitorů mikrotubulů rostou buňky více izotropicky (Baskin et al., 1994), neboť CESA komplexy se pohybují dále, ale jejich lokalizace na PM je náhodná. Mikrotubuly tak zcela zásadně ovlivňují tvarování buněčné stěny. Bylo již zjištěno, že CSC kopírování polohy mikrotubulů je zajištěno interakcí CSII proteinu s mikrotubuly a CSC (Lei et al., 2012). Většina mutantů genů třídy *DISTORTED* ovlivňuje organizaci MT (Schwab et al., 2003). Aktinová mikrofilamenta mohou *in vivo* ovlivňovat chování mikrotubulů (Sampathkumar et al., 2011), orientaci MT i doručování CSC na PM (Sampathkumar et al., 2013). Bylo již identifikováno několik proteinů interagujících jak s MT, tak s MF, například kinesiny (Deeks et al., 2010) a forminy (Deeks et al., 2010; Li et al., 2010; Wang et al., 2013). Havelková et al. (2015) zjistili, že také podjednotka ARPC2 ARP2/3 komplexu se dokáže vázat na mikrotubuly, přičemž komplex je poté hypoteticky schopen současné interakce jen s dceřiným aktinovým vláknem, které nukleoval.

Pozoruhodné bylo zjištění, že obě složky cytoskeletu jsou asociovány s SmaCCs/MASCs (Sampathkumar et al., 2013). SmaCCs/MASCs jsou kompartmenty v kortikální a subkortikální vrstvě obsahující CESA proteiny, které pravděpodobně fungují jako váčky skladující internalizované CESA či pro dopravu CESA na PM (Crowell et al., 2009; Gutierrez et al., 2009). S mikrotubuly SmaCCs/MASCs kolokalizují především za podmínek osmotického stresu či inhibice celulózy a asociovány byly SmaCCs/MASCs Golgiho váčky, které se přemisťují podél aktinového cytoskeletu (Akkerman et al., 2011; Crowell et al., 2009; Gutierrez et al., 2009). Defektní organizace aktinového cytoskeletu může způsobit nižší rychlost váček z Golgi obsahující CESA a

akumulaci váčků z Golgiho aparátu, se kterými SmaCCs/MASC interagují, což ovlivňuje míru doručování CSC na membránu (Sampathkumar et al., 2013).

SmaCCs/MASC jsou také asociovány s CSI1, který zprostředkovává interakci MT s CSC (Lei et al., 2012, 2013; Li et al., 2012b). *csi1* mutanti mají výrazně nižší rychlost CESA komplexů na PM, jejich trajektorie nesouhlasí s polohou mikrotubulů pod PM, oproti WT obsahují méně celulózy a projevují se fenotypem souvisejícím s nízkým obsahem celulózy (Crowell et al., 2010, Lei et al., 2012). Nabízí se tedy možnost, že nižší rychlost CESA komplexů v hypokotylech *arp2* a *arpc5* může být způsobena skrze celou řadou interakcí mezi defektním aktinovým cytoskeletem a mikrotubuly. Je však potřeba si uvědomit, že ARP2/3 komplex zřejmě ovlivňuje mechanismus přímo na PM, protože děje v cytoplasmě nemají na rychlost CSC v PM vliv.

Vzhledem ke schopnosti ARP2/3 komplexu navázat se na mikrotubuly (Havelková et al., 2015), které se váží k CSC na PM přes CSI1 (Lei et al., 2012) a vzhledem k potřebě CSI1 pro tvorbu SmaCCs/MASC (Lei et al. 2015), které mohou být ovlivněny aktinovým cytoskeletem, je možné, že nižší rychlost CSC sledovaných *arp* mutantů komplexů je způsobena vlivem ARP2/3 komplexu či aktinu nukleovaného ARP2/3 komplexem na CSI1 proteiny. Do budoucna by bylo jistě zajímavé pozorovat chování CSC v *arp* mutantech se současnou vizualizací CSI1 a mikrotubulů. Bringmann et al. (2012) také navrhli možnost regulace CSC aktivity skrze CSI1 protein, neboť se váže na katalytickou doménu CESA. Dosud však nebylo ověřeno, zda a jak je chování a distribuce CSI1 proteinu v *arp* mutantách ovlivněno. Protože se CSI1 proteiny asociované s CSC pohybují podobnou rychlostí jako CESA komplexy, je pravděpodobné, že by v *arp* mutantech byla také zjištěna nižší rychlost CSI1 proteinů, a právě to by mohlo způsobovat snížení rychlosti CESA komplexu. Mutanti bez funkčního CSI1 se vyznačují nižší rychlostí CESA komplexů, přitom ale nebyla ovlivněna hustota YFP-CESA6 na PM (Lei et al., 2015). Za předpokladu, že by ARP2/3 komplex ovlivňoval množství CSI1 asociovaných s MT a CSC, mohlo by to způsobovat nedostatek CSI1 pro vazbu CSC k MT a neasociované CSC by se kvůli tomu mohly pohybovat pomalejší rychlostí. Pochopitelně může existovat také dosud neobjevený mechanismus, kterým ARP2/3 komplex ovlivňuje CSC na membráně – například nějaká další propojovací molekula.

6 Shrnutí

Buněčná stěna je již dlouho zkoumaným fenoménem v rostlinné buňce, stále však není objasněno mnoho otázek, které se k ní vztahují. Tato práce zkoumá možnou úlohu ARP2/3 komplexu v syntéze celulózy buněčné stěny, neboť bylo zjištěno, že mutanty ARP2/3 komplexu mimo dalších postihů obsahují v dospělosti méně celulózy, více pektinů a jejich buněčné stěny jsou tenčí a méně lignifikované (Sahi, Cifrová et al., 2017). Diplomová práce byla zaměřena na porovnání rychlosti CESA komplexů mezi mutanty *arpc5*, *arp2* a WT a doplněna byla o pozorování protoplastů *arpc5* a WT obnovujících celulózní síť buněčné stěny.

Rychlost CESA komplexů byla hodnocena v buňkách etiolovaných hypokotylů pomocí analýzy kymogramů. Bylo zjištěno, že *arpc5* a *arp2* mutanti mají signifikantně pomalejší CESA komplexy primární buněčné stěny oproti WT. Regenerace *arpc5* protoplastů byla také vyhodnocena jako pomalejší. Nižší rychlost CESA komplexů u *arp2* a *arpc5* mutantních rostlin je dalším důkazem zapojení ARP2/3 komplexu do tvorby buněčné stěny, ale není dosud znám mechanismus, kterým ARP2/3 komplex celulózasyntázy ovlivňuje.

Citovaná literatura

Akkerman, M., Overdijk, E. J. R., Schel, J. H. N., Emons, A. M. C., & Ketelaar, T. (2011). Golgi body motility in the plant cell cortex correlates with actin cytoskeleton organization. *Plant and Cell Physiology*, *52*(10), 1844–1855.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., et al. (1994). Cell junctions, cell adhesion, and the extracellular matrix. In Gibbs, S. (ed.), *Molecular Biology of the Cell* (1124). New York: Garland Science.

Amor, Y., Haigler, C. H., Johnson, S., Wainscott, M., & Delmer, D. P. (1995). A membrane-associated form of sucrose synthase and its potential role in synthesis of cellulose and callose in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *92*(20), 9353–9357.

Andersson-Gunnerås, S., Mellerowicz, E. J., Love, J., Segerman, B., Ohmiya, Y., Coutinho, P. M., ... Sundberg, B. (2006). Biosynthesis of cellulose-enriched tension wood in *Populus*: Global analysis of transcripts and metabolites identifies biochemical and developmental regulators in secondary wall biosynthesis. *Plant Journal*, *45*(2), 144–165.

Arioli, T., Peng, L., Bethner, S. A., Burn, J., Wittke, W., Herth, W., ... Williamson, R. E. (1998). Molecular Analysis of Cellulose Biosynthesis in *Arabidopsis*. *Science*, 717–720.

Baroja-Fernandez, E., Munoz, F. J., Bahaji, A., Almagro, G., & Pozueta-Romero, J. (2012a). Reply to Smith et al.: No evidence to challenge the current paradigm on starch and cellulose biosynthesis involving sucrose synthase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(14), E777–E777.

Baroja-Fernandez, E., Munoz, F. J., Li, J., Bahaji, A., Almagro, G., Montero, M., ... Pozueta-Romero, J. (2012). Sucrose synthase activity in the *sus1/sus2/sus3/sus4* *Arabidopsis* mutant is sufficient to support normal cellulose and starch production. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(1), 321–326.

Barratt, D. H. P., Derbyshire, P., Findlay, K., Pike, M., Wellner, N., Lunn, J., ... Smith, A. M. (2009). Normal growth of *Arabidopsis* requires cytosolic invertase but not sucrose synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(31), 13124–13129.

Bashline, L., Li, S., & Gu, Y. (2014). The trafficking of the cellulose synthase complex in higher plants. *Annals of Botany*.

Bashline, L., Li, S., Anderson, C. T., Lei, L., & Gu, Y. (2013). The Endocytosis of Cellulose Synthase in *Arabidopsis* Is Dependent on *CLATHRIN2*, a Clathrin-Mediated Endocytosis Adaptor. *Plant Physiology*, *163*(1), 150–160.

Baskin, T. I. (2001). On the alignment of cellulose microfibrils by cortical microtubules: A review and a model. *Protoplasma*.

Basu, D., El Essal, S. E. D., Le, J., Mallery, E. L., & Szymanski, D. B. (2004). Interchangeable functions of Arabidopsis PIROGI and the human WAVE complex subunit SRA1 during leaf epidermal development. *Development*, *131*(17), 4345–4355.

Basu, D., Le, J., El Essal, S. E. D., Huang, S., Zhang, C. H., Mallery, E. L., Koliantz, G., Staiger, C. J., Szymanski, D. B. (2005). DISTORTED3/SCAR2 is a putative Arabidopsis WAVE complex subunit that activates the Arp2/3 complex and is required for epidermal morphogenesis. *Plant Cell*, *17*, 502–524.

Basu, D., Le, J., Zakharova, T., Mallery, E. L., & Szymanski, D. B. (2008). A SPIKE1 signaling complex controls actin-dependent cell morphogenesis through the heteromeric WAVE and ARP2/3 complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(10), 4044–4049.

Beck, C., B. (2010). An Introduction to Plant Structure and Development. Plant Anatomy for the Twenty-First Century, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2nd edition.

Beeckman, T., & Przemeck, G. (2002). Genetic complexity of cellulose synthase A gene function in *Arabidopsis* embryogenesis. *Plant Physiology*, *130*(December), 1883–1893.

Benfey, P. N., Linstead, P. J., Roberts, K., Schiefelbein, J. W., Hauser, M.-T., & Aeschbacher, R. A. (1993). Root development in *Arabidopsis*: four mutants with dramatically altered root morphogenesis. *Development*, *119*, 57–70.

Ben-Tov, D., Abraham, Y., Stav, S., Thompson, K., Loraine, A., Elbaum, R., ... Harpaz-Saad, S. (2015). COBRA-LIKE2, a Member of the Glycosylphosphatidylinositol-Anchored COBRA-LIKE Family, Plays a Role in Cellulose Deposition in Arabidopsis Seed Coat Mucilage Secretory Cells. *Plant Physiology*, *167*(3), 711–724.

Betancur, L., Singh, B., Rapp, R. A., Wendel, J. F., Marks, M. D., Roberts, A. W., & Haigler, C. H. (2010). Phylogenetically distinct cellulose synthase genes support secondary wall thickening in *Arabidopsis* shoot trichomes and cotton fiber. *Journal of Integrative Plant Biology*, *52*(2), 205–220.

Bischoff, V., Desprez, T., Mouille, G., Vernhettes, S., Gonneau, M., & Höfte, H. (2011). Phytochrome regulation of cellulose synthesis in *Arabidopsis*. *Current Biology*, *21*(21), 1822–1827.

Boevink, P., Oparka, K., Cruz, S. S., Martin, B., Betteridge, A., & Hawes, C. (1998). Stacks on tracks : the plant Golgi apparatus traffics on an actin / ER network. *The Plant Journal*, *15*(March), 441–447.

Brett C. T., & Waldron, K. (1990). Physiology and biochemistry of plant cell walls. In Black, M., & Chapman, J. (eds.), *Topics in Plant Physiology*, vol. 2, (4–57). London: Unwin Hyman.

Breuer, D., Nowak, J., Ivakov, A., Somssich, M., & Persson, S. (2017). System-wide organization of actin cytoskeleton determines organelle transport in hypocotyl plant cells, 5741–5749.

Bringmann, M., Li, E., Sampathkumar, A., Kocabek, T., Hauser, M.-T., & Persson, S. (2012). POM-POM2/CELLULOSE SYNTHASE INTERACTING1 Is Essential for the Functional Association of Cellulose Synthase and Microtubules in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 24(1), 163–177.

Brocard-Gifford, I. (2004). The Arabidopsis thaliana ABSCISIC ACID-INSENSITIVE8 Locus Encodes a Novel Protein Mediating Abscisic Acid and Sugar Responses Essential for Growth. *The Plant Cell Online*, 16(2), 406–421.

Brown Jr, R. M., & Montezinos, D. (1976). Cellulose microfibrils: Visualization of biosynthetic and orienting complexes in association with the plasma membrane (freeze-etching/Oocystis/enzyme complex/granule bands/terminal synthesis). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(1), 143–147.

Brown, R. M., Willison, J. H., & Richardson, C. L. (1976). Cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: visualization of the site of synthesis and direct measurement of the in vivo process. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(12), 4565–4569.

Cano-Delgado, A., Penfield, S., Smith, C., Catley, M., & Bevan, M. (2003). Reduced cellulose synthesis invokes lignification and defense responses in Arabidopsis thaliana. *Plant Journal*, 34(3), 351–362.

Cano-Delgado, A.I., Metzlafl, K., & Bevan, M. W. (2000). The *eli1* mutation reveals a link between cell expansion and secondary cell wall formation in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 127, 3395–3405.

Carpita, N. C. (2011). Update on Mechanisms of Plant Cell Wall Biosynthesis: How Plants Make Cellulose and Other (1→4)-β-D-Glycans. *Plant Physiology*, 155(1), 171–184.

Coleman, H.D., Yan, J., Mansfield, S.D., 2009. Sucrose synthase affects carbon partitioning to increase cellulose production and altered cell wall ultrastructure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 13118–13123.

Collings, D. A. (2008). Crossed wires: interactions and cross-talk between the microtubule and microfilament networks in plants. In Nick, P. (ed.) *Plant Cell Monographs: Plant Microtubules, Development, and Flexibility*. Berlin: Springer, 47–82.

Collings, D. A., Gebbie, L. K., Howles, P. A., Hurley, U. A., Birch, R. J., Cork, A. H., ... Williamson, R. E. (2008). Arabidopsis dynamin-like protein DRP1A: A null mutant with widespread defects in endocytosis, cellulose synthesis, cytokinesis, and cell expansion. *Journal of Experimental Botany*, 59(2), 361–376.

Cosgrove, D. J., & Jarvis, M. C. (2012). Comparative structure and biomechanics of plant primary and secondary cell walls. *Frontiers in Plant Science*, 3(August), 1–6.

Crowell, E. F., Bischoff, V., Desprez, T., Rolland, A., Stierhof, Y.-D., Schumacher, K., ... Vernhettes, S. (2009). Pausing of Golgi Bodies on Microtubules Regulates Secretion of Cellulose Synthase Complexes in Arabidopsis. *The Plant Cell Online*, 21(4), 1141–1154.

DeBolt, S., Gutierrez, R., Ehrhardt, D. W., Melo, C. V., Ross, L., Cutler, S. R., ... Bonetta, D. (2007). Morlin, an inhibitor of cortical microtubule dynamics and cellulose synthase movement. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(14), 5854–5859.

Deeks, M. J., & Hussey, P. J. (2005). Arp2/3 and SCAR: Plants move to the fore. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(12), 954–964.

Delmer, D. P. (1999). CELLULOSE BIOSYNTHESIS: Exciting Times for A Difficult Field of Study. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50(1), 245–276.

Desprez, T., Juraniec, M., Crowell, E. F., Jouy, H., Pochylova, Z., Parcy, F., ... Vernhettes, S. (2007). Organization of cellulose synthase complexes involved in primary cell wall synthesis in Arabidopsis thaliana. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(39), 15572–15577.

Desprez, T., Vernhettes, S., Fagard, M., Refregier, G., Desnos, T., Aletti, E., ... Hofte, H. (2002). Resistance against Herbicide Isoxaben and Cellulose Deficiency Caused by Distinct Mutations in Same Cellulose Synthase Isoform CESA6. *Plant Physiology*, 128(2), 482–490.

Dobberst, B., Kiermaye, O. (1972). Occurrence of a special type of golgi-vesicles during secondary wall formation in *Micrasterias denticulata* Breb. *Protoplasma* 75, 185–194.

Doblin, M. S., Kurek, I., Jacob-Wilk, D., & Delmer, D. P. (2002). Cellulose biosynthesis in plants: From genes to rosettes. *Plant and Cell Physiology*, 43(12), 1407–1420.

Dyachok, J., Shao, M. R., Vaughn, K., Bowling, A., Facette, M., Djakovic, S., ... Smith, L. (2008). Plasma membrane-associated SCAR complex subunits promote cortical F-actin accumulation and normal growth characteristics in arabidopsis roots. *Molecular Plant*, 1(6), 990–1006.

Dyachok, J., Zhu, L., Liao, F., He, J., Huq, E., & Blancaflor, E. B. (2011). SCAR Mediates Light-Induced Root Elongation in Arabidopsis through Photoreceptors and Proteasomes. *The Plant Cell*, 23(10), 3610–3626.

El-Assal, S. E. D., Le, J., Basu, D., Mallery, E. L., & Szymanski, D. B. (2004). Distorted2 encodes an ARPC2 subunit of the putative Arabidopsis ARP2/3 complex. *Plant Journal*, 38(3), 526–538.

Ellis, C., & Turner, J. G. (2001). The Arabidopsis mutant *cev1* has constitutively active jasmonate and ethylene signal pathways and enhanced resistance to pathogens. *Plant Cell* 13, 1025–1033.

- Ellis, C., Karayyllidis, I., Wasternack, C., & Turner, J. G. (2002). The Arabidopsis mutant *cevl* links cell wall signaling to jasmonate and ethylene responses. *Plant Cell* *14*, 1557–1566.
- Endler, A., Kesten, C., Schneider, R., Zhang, Y., Ivakov, A., Froehlich, A., ... Persson, S. (2015). A Mechanism for Sustained Cellulose Synthesis during Salt Stress. *Cell*, *162*(6), 1353–1364.
- Fagard, M. (2000). PROCUSTE1 Encodes a Cellulose Synthase Required for Normal Cell Elongation Specifically in Roots and Dark-Grown Hypocotyls of Arabidopsis. *The Plant Cell Online*, *12*(12), 2409–2424.
- Fernandes, A. N., Thomas, L. H., Altaner, C. M., Callow, P., Forsyth, V. T., Apperley, D. C., ... Jarvis, M. C. (2011). Nanostructure of cellulose microfibrils in spruce wood. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(47), E1195–E1203.
- Festucci-Buselli, R. A., Otoni, W. C., & Joshi, C. P. (2007). Structure, organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, *19*(1), 1–13.
- Fu, Y., Gu, Y., Zheng, Z., Wasteneys, G., & Yang, Z. (2005). Arabidopsis interdigitating cell growth requires two antagonistic pathways with opposing action on cell morphogenesis. *Cell*, *120*(5), 687–700.
- Fujita, M., Himmelspach, R., Hocart, C. H., Williamson, R. E., Mansfield, S. D., & Wasteneys, G. O. (2011). Cortical microtubules optimize cell-wall crystallinity to drive unidirectional growth in Arabidopsis. *Plant Journal*, *66*(6), 915–928.
- Fujita, M., Himmelspach, R., Ward, J., Whittington, A., Hasenbein, N., Liu, C., ... Wasteneys, G. O. (2013). The anisotropy1 D604N Mutation in the Arabidopsis Cellulose Synthase1 Catalytic Domain Reduces Cell Wall Crystallinity and the Velocity of Cellulose Synthase Complexes. *Plant Physiology*, *162*(1), 74–85.
- Gardiner, J. C. (2003). Control of Cellulose Synthase Complex Localization in Developing Xylem. *The Plant Cell Online*, *15*(8), 1740–1748.
- Giddings, T. H., Brower, D. L., & Andrew Staehelin, L. (1980). Visualization of particle complexes in the plasma membrane of *Micrasterias Denticulata* associated with the formation of cellulose fibrils in primary and secondary cell walls. *Journal of Cell Biology*, *84*(2), 327–339.
- Gillmor, C. S., Poindexter, P., Lorieau, J., Palcic, M. M., & Somerville, C. (2002). α -glucosidase I is required for cellulose biosynthesis and morphogenesis in Arabidopsis. *Journal of Cell Biology*, *156*(6), 1003–1013.
- Gonneau, M., Desprez, T., Guillot, A., Vernhettes, S., Höfte, H., & Hofte, H. (2014). Catalytic Subunit Stoichiometry within the Cellulose. *Plant Physiology*, *166*(December), 1709–1712.

- Goode, B. L., Drubin, D. G., & Barnes, G. (2000). Functional cooperation between the microtubule and actin cytoskeletons. *Current Opinion in Cell Biology*, *12*(1), 63–71.
- Green, P. B. (1962). Mechanism for plant cell morphogenesis. *Science*, *138*(3548), 1404.
- Griffiths, J. S., Šola, K., Kushwaha, R., Lam, P., Tateno, M., Young, R., ... Haughn, G. W. (2015). Unidirectional Movement of Cellulose Synthase Complexes in Arabidopsis Seed Coat Epidermal Cells Deposit Cellulose Involved in Mucilage Extrusion, Adherence, and Ray Formation. *Plant Physiology*, *168*(2), 502–520.
- Gu, Y., & Somerville, C. (2010). Cellulose synthase interacting protein. *Plant Signaling & Behavior*, *5*(12), 1571–1574.
- Gu, Y., Kaplinsky, N., Bringmann, M., Cobb, A., Carroll, A., Sampathkumar, A., ... Somerville, C. R. (2010). Identification of a cellulose synthase-associated protein required for cellulose biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(29), 12866–12871.
- Gutierrez, R., Lindeboom, J. J., Paredez, A. R., Emons, A. M. C., & Ehrhardt, D. W. (2009). Arabidopsis cortical microtubules position cellulose synthase delivery to the plasma membrane and interact with cellulose synthase trafficking compartments. *Nature Cell Biology*, *11*(7), 797–806.
- Haigler, C. H., & Brown, R. M. (1986). Transport of rosettes from the golgi apparatus to the plasma membrane in isolated mesophyll cells of *Zinnia elegans* during differentiation to tracheary elements in suspension culture. *Protoplasma*, *134*(2–3), 111–120.
- Haigler, C. H., Ivanova-Datcheva, M., Hogan, P. S., Salnikov, V. V, Hwang, S., Martin, K., & Delmer, D. P. (2001). Carbon partitioning to cellulose synthesis. *Plant Molecular Biology*, *47*(1–2), 29–51. <https://doi.org/10.1023/A:1010615027986>
- Harris, D. M., Corbin, K., Wang, T., Gutierrez, R., Bertolo, A. L., Petti, C., ... DeBolt, S. (2012). Cellulose microfibril crystallinity is reduced by mutating C-terminal transmembrane region residues CESA1A903V and CESA3T942I of cellulose synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(11), 4098–4103.
- Hauser, M. T., Morikami, A., & Benfey, P. N. (1995). Conditional root expansion mutants of Arabidopsis. *Development (Cambridge, England)*, *121*(4), 1237–1252.
- Havelková, L., Nanda, G., Martinek, J., Bellinvia, E., Sikorová, L., Šlajcherová, K., ... Schwarzerová, K. (2015). Arp2/3 complex subunit ARPC2 binds to microtubules. *Plant Science*, *241*, 96–108.
- Heath, I. B. (1974). A Unified Hypothesis for the Role of Membrane Bound Enzyme Complexes and Microtubules in. *J. Theor. Biol*, *48*(1974), 445–449.

Heim, D. R., Skomp, J. R., Tschabold, E. E., & Larrinua, I. M. (1990). Isoxaben Inhibits the Synthesis of Acid Insoluble Cell Wall Materials In *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, *93*(2), 695–700.

Hématy, K., Sado, P. E., Van Tuinen, A., Rochange, S., Desnos, T., Balzergue, S., ... Höfte, H. (2007). A Receptor-like Kinase Mediates the Response of *Arabidopsis* Cells to the Inhibition of Cellulose Synthesis. *Current Biology*, *17*(11), 922–931.

Hepler, P. K., & Newcomb, E. H. (1964). Microtubules and Fibrils in the Cytoplasm of *Coleus* Cells Undergoing Secondary Wall Deposition. *The Journal of Cell Biology*, *20*, 529–532.

Hermans, C., Porco, S., Verbruggen, N., & Bush, D. R. (2010). Chitinase-Like Protein CTL1 Plays a Role in Altering Root System Architecture in Response to Multiple Environmental Conditions. *Plant Physiology*, *152*(2), 904–917.

Herth, W. (1980). Calcofluor white and congo red inhibit chitin microfibril assembly of *Poterioochromonas*: Evidence for a gap between polymerization and microfibril formation. *Journal of Cell Biology*, *87*(2), 442–450.

Herth, W. (1985). Plasma-membrane rosettes involved in localized wall thickening during xylem vessel formation of *Lepidium sativum* L. *Planta*, *164*(1), 12–21.

Herth, W., & Weber, G. (1984). Occurrence of the putative cellulose-synthesizing "rosettes" in the plasma membrane of *Glycine max* suspension culture cells. *Naturwissenschaften*, *71*(3), 153–154.

Hill, J. L., Hammudi, M. B., & Tien, M. (2014). The *Arabidopsis* Cellulose Synthase Complex: A Proposed Hexamer of CESA Trimers in an Equimolar Stoichiometry. *The Plant Cell Online*, *26*(12), 4834–4842.

His, I., Driouich, A., Nicol, F., Jauneau, A., & Höfte, H. (2001). Altered pectin composition in primary cell walls of korrigan, a dwarf mutant of *Arabidopsis* deficient in a membrane-bound endo-1,4- β -glucanase. *Planta*, *212*(3), 348–358.

Hogetsu, T. (1983). Distribution and local activity of particle complexes synthesizing cellulose microfibrils in the plasma membrane of *Closterium Acerosum* (Schrank) Ehrenberg. *Plant and Cell Physiology*, *24*(4), 777–781.

Hossain, M. S., Liao, J., James, E. K., Sato, S., Tabata, S., Jurkiewicz, A., ... Szczyglowski, K. (2012). *Lotus japonicus* ARPC1 Is Required for Rhizobial Infection. *Plant Physiology*, *160*(2), 917–928.

Hu, H., Zhang, R., Tao, Z., Li, X., Li, Y., Huang, J., ... Peng, L. (2018). Cellulose synthase mutants distinctively affect cell growth and cell wall integrity for plant biomass production in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*, *59*(6), 1144–1157.

Hülkamp, M., Misra, S., & Jürgens, G. (1994). Genetic dissection of trichome cell development in *Arabidopsis*. *Cell*, *76*(3), 555–566.

Chapman, R. L., & Staehelin, L. A. (1985). Plasma-Membrane Rosettes in Carrot and Sycamore Suspension-Culture Cells. *Journal of Ultrastructure Research*, 93(1–2), 87–91.

Chen, S., Ehrhardt, D. W., & Somerville, C. R. (2010). Mutations of cellulose synthase (CESA1) phosphorylation sites modulate anisotropic cell expansion and bidirectional mobility of cellulose synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(40), 17188–17193.

Chen, S., Jia, H., Zhao, H., Liu, D., Liu, Y., Liu, B., ... Somerville, C. R. (2016). Anisotropic Cell Expansion Is Affected through the Bidirectional Mobility of Cellulose Synthase Complexes and Phosphorylation at Two Critical Residues on CESA3. *Plant Physiology*, 171(1), 242–250.

Chen, X., Irani, N. G., & Friml, J. (2011). Clathrin-mediated endocytosis: The gateway into plant cells. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(6), 674–682.

Jarvis, M. C. (2013). Cellulose Biosynthesis: Counting the Chains. *Plant Physiology*, 163(4), 1485–1486.

Jiang, K., Sorefan, K., Deeks, M. J., Bevan, M. W., Hussey, P. J., & Hetherington, A. M. (2012). The ARP2/3 Complex Mediates Guard Cell Actin Reorganization and Stomatal Movement in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 24(5), 2031–2040.

Jones, M. A., Raymond, M. J., & Smirnov, N. (2006). Analysis of the root-hair morphogenesis transcriptome reveals the molecular identity of six genes with roles in root-hair development in Arabidopsis. *Plant Journal*, 45(1), 83–100.

Juniper, B. E., Lawton, J. R., Harris, P. J. (1981). Cellular organelles and cell-wall formation in fibers from the flowering stem of *Lolium temulentum* L. *New Phytol.* 89, 609–619.

Kennedy, C. J., Cameron, G. J., Šturcová, A., Apperley, D. C., Altaner, C., Wess, T. J., & Jarvis, M. C. (2007). Microfibril diameter in celery collenchyma cellulose: X-ray scattering and NMR evidence. *Cellulose*, 14(3), 235–246.

Kimura, S. (1999). Immunogold Labeling of Rosette Terminal Cellulose-Synthesizing Complexes in the Vascular Plant *Vigna angularis*. *The Plant Cell Online*, 11(11), 2075–2086.

Konopka, C. A., & Bednarek, S. Y. (2008). Comparison of the Dynamics and Functional Redundancy of the Arabidopsis Dynamin-Related Isoforms DRP1A and DRP1C during Plant Development. *Plant Physiology*, 147(4), 1590–1602.

Kost, B., Spielhofer, P., & Chua, N. (1998). A GFP-mouse talin fusion protein labels plant actin filaments in vivo and visualizes the actin cytoskeleton in growing pollen tubes, 16(September), 393–401.

Kumar, M., & Turner, S. (2015). Plant cellulose synthesis: CESA proteins crossing kingdoms. *Phytochemistry* 112(1), 91–99.

Kumar, M., Atanassov, I., & Turner, S. (2017). Functional Analysis of Cellulose Synthase (CESA) Protein Class Specificity. *Plant Physiology*, 173(2), 970–983.

Kumar, M., Mishra, L., Carr, P., Pilling, M., Gardner, P., Mansfield, S. D., & Turner, S. R. (2018). Exploiting CELLULOSE SYNTHASE (CESA) class-specificity to probe cellulose microfibril biosynthesis. *Plant Physiology*, 177(May), 151-167.

Lane, D. R., Wiedemeier, A., Peng, L., Ho, H., Vernhettes, S., Hocart, C. H., ... Williamson, R. E. (2001). Temperature-Sensitive Alleles of RSW2 Link the KORRIGAN Endo-1,4- β -Glucanase to Cellulose Synthesis and Cytokinesis in Arabidopsis. *Plant Physiology* 126, 278-288.

Le, J., El-Assal, S. E. D., Basu, D., Saad, M. E., & Szymanski, D. B. (2003). Requirements for Arabidopsis ATARP2 and ATARP3 during epidermal development. *Current Biology*, 13(15), 1341–1347.

Le, J., Mallery, E. L., Zhang, C., Brankle, S., & Szymanski, D. B. (2006). Arabidopsis BRICK1/HSPC300 Is an Essential WAVE-Complex Subunit that Selectively Stabilizes the Arp2/3 Activator SCAR2. *Current Biology*, 16(9), 895–901.

Lei, L., Li, S., & Gu, Y. (2012). Cellulose Synthase Complexes: Composition and Regulation. *Frontiers in Plant Science*, 3(75), 1–6.

Lei, L., Li, S., Du, J., Bashline, L., & Gu, Y. (2013). CELLULOSE SYNTHASE INTERACTIVE3 Regulates Cellulose Biosynthesis in Both a Microtubule-Dependent and Microtubule-Independent Manner in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 25(12), 4912–4923.

Lei, L., Singh, A., Bashline, L., Li, S., Yingling, Y. G., & Gu, Y. (2015). CELLULOSE SYNTHASE INTERACTIVE1 Is Required for Fast Recycling of Cellulose Synthase Complexes to the Plasma Membrane in Arabidopsis. *The Plant Cell*, tpc.15.00442.

Lei, L., Zhang, T., Strasser, R., Lee, C. M., Gonneau, M., Mach, L., ... Gu, Y. (2014). The *jiaoyao1* Mutant Is an Allele of *korrigan1* That Abolishes Endoglucanase Activity and Affects the Organization of Both Cellulose Microfibrils and Microtubules in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 26(6), 2601–2616.

Lertpiriyapong, K., & Sung, Z. R. (2003). The elongation defective1 mutant of Arabidopsis is impaired in the gene encoding a serine-rich secreted protein. *Plant Molecular Biology*, 53(4), 581–595.

Li, R., Liu, P., Wan, Y., Chen, T., Wang, Q., Mettbach, U., ... Lin, J. (2012a). A Membrane Microdomain-Associated Protein, Arabidopsis Flot1, Is Involved in a Clathrin-Independent Endocytic Pathway and Is Required for Seedling Development. *The Plant Cell*, 24(5), 2105–2122.

Li, S., Bashline, L., Lei, L., & Gu, Y. (2014). Cellulose Synthesis and Its Regulation. *The Arabidopsis Book*, 12.

Li, S., Bashline, L., Zheng, Y., Xin, X., Huang, S., Kong, Z., ... Gu, Y. (2016). Cellulose synthase complexes act in a concerted fashion to synthesize highly aggregated

cellulose in secondary cell walls of plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(40), 11348–11353.

Li, S., Blanchoin, L., Yang Z. & Lord, E. M. (2003). The Putative Arabidopsis Arp2/3 Complex Controls Leaf Cell Morphogenesis. *Plant Physiology*, 132(4), 2034–2044.

Li, S., Ge, F. R., Xu, M., Zhao, X. Y., Huang, G. Q., Zhou, L. Z., ... Zhang, Y. (2013). Arabidopsis COBRA-LIKE 10, a GPI-anchored protein, mediates directional growth of pollen tubes. *Plant Journal*, 74(3), 486–497.

Li, S., Lei, L., Somerville, C. R., & Gu, Y. (2012b). Cellulose synthase interactive protein 1 (CSI1) links microtubules and cellulose synthase complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(1), 185–190.

Li, X., Li, J. H., Wang, W., Chen, N. Z., Ma, T. S., Xi, Y. N., ... Chen, Y. L. (2014). ARP2/3 complex-mediated actin dynamics is required for hydrogen peroxide-induced stomatal closure in Arabidopsis. *Plant, Cell and Environment*, 37(7), 1548–1560.

Li, Y., Shen, Y., Cai, C., Zhong, C., Zhu, L., Yuan, M., & Ren, H. (2010). The Type II Arabidopsis Formin14 Interacts with Microtubules and Microfilaments to Regulate Cell Division. *The Plant Cell*, 22(8), 2710–2726.

Li, Y., Sorefan, K., Hemmann, G., & Bevan, M. W. (2004). Arabidopsis *NAP* and *PIR* Regulate Actin-Based Cell Morphogenesis and Multiple Developmental Processes. *Plant Physiology*, 136(3), 3616–3627.

Liu, L., Shang-Guan, K., Zhang, B., Liu, X., Yan, M., Zhang, L., ... Zhou, Y. (2013). Brittle Culm1, a COBRA-Like Protein, Functions in Cellulose Assembly through Binding Cellulose Microfibrils. *PLoS Genetics*, 9(8).

Liu, Z., Schneider, R., Kesten, C., Zhang, Y. Y., Somssich, M., Zhang, Y. Y., ... Persson, S. (2016). Cellulose-Microtubule Uncoupling Proteins Prevent Lateral Displacement of Microtubules during Cellulose Synthesis in Arabidopsis. *Developmental Cell*, 38(3), 305–315.

Maleki, S. S., Mohammadi, K., & Ji, K. (2016). Characterization of Cellulose Synthesis in Plant Cells. *The Scientific World Journal*, 2016, 1–8.

Mansoori, N., Timmers, J., Desprez, T., Kamei, C. L. A., & Dees, D. C. T. (2014). KORRIGAN1 Interacts Specifically with Integral Components of the Cellulose Synthase Machinery, 9(11), 4–11.

Mathur, J. (2005). The ARP2/3 complex: Giving plant cells a leading edge. *BioEssays*, 27(4), 377–387.

Mathur, J., Mathur, N., Kernebeck, B., & Hulskamp, M. (2003a). Mutations in actin-related proteins 2 and 3 affect cell shape development in Arabidopsis. *The Plant Cell ...*, 15(July), 1632–1645.

Mathur, J., Mathur, N., Kirik, V., Kernebeck, B., Srinivas, B. P., & Hulskamp, M. (2003b). Arabidopsis CROOKED encodes for the smallest subunit of the ARP2/3 complex and controls cell shape by region specific fine F-actin formation. *Development*, *130*, 3137–3146.

McFarlane, H. E., Döring, A., & Persson, S. (2014). The Cell Biology of Cellulose Synthesis. *Annual Review of Plant Biology*, *65*(1), 69–94.

Mendu, V., Griffiths, J. S., Persson, S., Stork, J., Downie, A. B., Voiniciuc, C., ... DeBolt, S. (2011). Subfunctionalization of Cellulose Synthases in Seed Coat Epidermal Cells Mediates Secondary Radial Wall Synthesis and Mucilage Attachment. *Plant Physiology*, *157*(1), 441–453.

Miyahara, A., Richens, J., Starker, C., Morieri, G., Smith, L., Long, S., ... Oldroyd, G. E. D. (2010). Conservation in Function of a SCAR/WAVE Component During Infection Thread and Root Hair Growth in *Medicago truncatula*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *23*(12), 1553–1562.

Mølhøj, M., Pagant, S., & Höfte, H. (2002). Towards understanding the role of membrane-bound endo- β -1,4-glucanases in cellulose biosynthesis. *Plant and Cell Physiology*, *43*(12), 1399–1406.

Mouille, G., Robin, S., Lecomte, M., Pagant, S., & Höfte, H. (2003). Classification and identification of Arabidopsis cell wall mutants using Fourier-Transform InfraRed (FT-IR) microspectroscopy. *Plant Journal*, *35*(3), 393–404.

Mueller, S. C., & Malcolm Brown, R. (1980). Evidence for an intramembrane component associated with a cellulose microfibril-synthesizing complex in higher plants. *Journal of Cell Biology*, *84*(2), 315–326.

Neumann, U., Brandizzi, F., & Hawes, C. (2003). Protein transport in plant cells: In and out of the Golgi. *Annals of Botany*, *92*(2), 167–180.

Newman, R. H., Hill, S. J., & Harris, P. J. (2013). Wide-Angle X-Ray Scattering and Solid-State Nuclear Magnetic Resonance Data Combined to Test Models for Cellulose Micro fibrils in Mung Bean Cell Walls 1, *163*(December), 1558–1567.

Nicol, F., His, I., Jauneau, A., Vernhettes, S., Canut, H., & Höfte, H. (1998). A plasma membrane-bound putative endo-1,4- β -D-glucanase is required for normal wall assembly and cell elongation in Arabidopsis. *EMBO Journal*, *17*(19), 5563–5576.

Nishiyama, Y. (2009). Structure and properties of the cellulose microfibril. *Journal of Wood Science*, *55*(4), 241–249.

Nuhse, T. S. (2004). Phosphoproteomics of the Arabidopsis Plasma Membrane and a New Phosphorylation Site Database. *The Plant Cell Online*, *16*(9), 2394–2405.

Ochoa-villarreal, M., Aispuro-hernández, E., Vargas-arispuro, I., & Martínez-téllez, M. Á. (2012). Plant Cell Wall Polymers : Function , Structure and Biological Activity of Their Derivatives. *Characterization of Apple Pectin*, 63–86.

Omadjela, O., Narahari, A., Strumillo, J., Melida, H., Mazur, O., Bulone, V., & Zimmer, J. (2013). BcsA and BcsB form the catalytically active core of bacterial cellulose synthase sufficient for in vitro cellulose synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(44), 17856–17861.

Pagant, S., Bichet, A., Sugimoto, K., Lerouxel, O., Desprez, T., McCann, M., Lerouge, P., Vernhettes, S., & Höfte, H. (2002). KOBITO1 Encodes a Novel Plasma Membrane Protein Necessary for Normal Synthesis of Cellulose during Cell Expansion in Arabidopsis. *The Plant Cell Online*, *14*(9), 2001–2013.

Paredez, A. R., Persson, S., Ehrhardt, D. W., Somerville, C. R., Biology, P., & California, A. R. P. (2008). Genetic Evidence That Cellulose Synthase Activity Influences Microtubule Cortical, *147*(August), 1723–1734.

Paredez, A. R., Somerville, C. R., & Ehrhardt, D. W. (2006). Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules. *Science*, *312*(5779), 1491–1495.

Pear, J. R., Kawagoe, Y., Schreckengost, W. E., Delmer, D. P., & Stalker, D. M. (1996). Higher plants contain homologs of the bacterial celA genes encoding the catalytic subunit of cellulose synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(22), 12637–42.

Persson, S., Paredez, A., Carroll, A., Palsdottir, H., Doblin, M., Poindexter, P., ... Somerville, C. R. (2007). Genetic evidence for three unique components in primary cell-wall cellulose synthase complexes in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(39), 15566–15571. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706592104>

Petrášek, J., & Schwarzerová, K. (2009). Actin and microtubule cytoskeleton interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, *12*(6), 728–734.

Pollard, T. D. (2007). Regulation of Actin Filament Assembly by Arp2/3 Complex and Formins. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, *36*(1), 451–477.

Pratap Sahi, V., Cifrová, P., García-González, J., Kotannal Baby, I., Mouillé, G., Gineau, E., ... Schwarzerová, K. (2017). Arabidopsis thaliana plants lacking the ARP2/3 complex show defects in cell wall assembly and auxin distribution. *Annals of Botany*, (January), 1–13.

Quader, H., Herth, W., Ryser, U., & Schnefp, E. (1987). Cytoskeletal elements in cotton seed hair development in vitro: Their possible regulatory role in cell wall organization. *Protoplasma*, *137*, 56–62.

Reed, J. W., Elumalai, R. P., & Chory, J. (1998). Suppressors of an Arabidopsis thaliana phyB mutation identify genes that control light signaling and hypocotyl elongation. *Genetics*, *148*(3), 1295–1310.

Ridley, B. L., O'Neill, M. A., & Mohnen, D. (2001). *Pectins: Structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. Phytochemistry*, *57*.

Richmond, T. A., & Somerville, C. R. (2000). The Cellulose Synthase Superfamily. *Plant Physiology*, *124*(2), 495–498.

Richmond, T., Pear, J., Kawagoe, Y., Schreckengost, W., Delmer, D., Stalker, D., ... Kudlicka, K. (2000). Higher plant cellulose synthases. *Genome Biology*, *1*(4).

Robert, S., Mouille, G., & Höfte, H. (2004). The mechanism and regulation of cellulose synthesis in primary walls: lessons from cellulose-deficient Arabidopsis mutants. *Cellulose*, *11*(3/4), 351–364.

Robinson, D. G., White, R. K., & Preston, R. D. (1972). Fine structure of swarmers of Cladophora and Chaetomorpha. II. The chloroplast. *Journal of Cell Science*, *10*(2), 307–314.

Rogers, L. A., Dubos, C., Surman, C., Willment, J., Cullis, I. F., Mansfield, S. D., & Campbell, M. M. (2005). Comparison of lignin deposition in three ectopic lignification mutants. *New Phytologist*, *168*(1), 123–140.

Rotty, J. D., Wu, C., & Bear, J. E. (2013). New insights into the regulation and cellular functions of the ARP2/3 complex. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *14*(1), 7–12.

Roudier, F., Fernandez, A. G., Fujita, M., Himmelspach, R., Borner, G. H. H., Schindelman, G., ... Benfey, P. N. (2005). COBRA, an Arabidopsis Extracellular Glycosyl-Phosphatidyl Inositol-Anchored Protein, Specifically Controls Highly Anisotropic Expansion through Its Involvement in Cellulose Microfibril Orientation. *The Plant Cell*, *17*(6), 1749 LP-1763.

Saedler, R., Mathur, N., Srinivas, B. P., Kernebeck, B., Hülskamp, M., & Mathur, J. (2004). Actin control over microtubules suggested by DISTORTED2 encoding the Arabidopsis ARPC2 subunit homolog. *Plant and Cell Physiology*, *45*(7), 813–822.

Salmén, L. (2004). Micromechanical understanding of the cell-wall structure. *Comptes Rendus - Biologies*, *327*(9–10), 873–880.

Sampathkumar, A., Gutierrez, R., McFarlane, H. E., Bringmann, M., Lindeboom, J., Emons, A.-M., ... Persson, S. (2013). Patterning and Lifetime of Plasma Membrane-Localized Cellulose Synthase Is Dependent on Actin Organization in Arabidopsis Interphase Cells. *Plant Physiology*, *162*(2), 675–688.

Sampathkumar, A., Lindeboom, J. J., Debolt, S., Gutierrez, R., Ehrhardt, D. W., Ketelaar, T., & Persson, S. (2011). Live Cell Imaging Reveals Structural Associations between the Actin and Microtubule Cytoskeleton in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *23*(6), 2302–2313.

Sato, S. S., Kato, T., Kakegawa, K., Ishii, T., Liu, Y., Awano, T., ... Shibata, D. (2001). Role of the Putative Membrane-Bound Endo-1,4 β -Glucanase KORRIGAN in Cell Elongation and Cellulose Synthesis in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol*, *42*(3), 251–263.

Saxena, I. M., Lin, F. C., & Brown, R. M. (1990). Cloning and sequencing of the cellulose synthase catalytic subunit gene of *Acetobacter xylinum*. *Plant Molecular Biology*, *15*(5), 673–683.

Seagull, R. W. (1983). The role of the cytoskeleton during oriented microfibril deposition. I. Elucidation of the possible interaction between microtubules and cellulose synthetic complexes. *Journal of Ultrastructure Research*, *83*(2), 168–175.

Seagull, R. W. (1990). The effects of microtubule and microfilament disrupting agents on cytoskeletal arrays and wall deposition in developing cotton fibers. *Protoplasma*, *159*(1), 44–59.

Sethaphong, L., Haigler, C. H., Kubicki, J. D., Zimmer, J., Bonetta, D., DeBolt, S., & Yingling, Y. G. (2013). Tertiary model of a plant cellulose synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(18), 7512–7517.

Scheible, W.-R., Eshed, R., Richmond, T., Delmer, D., & Somerville, C. (2001). Modifications of cellulose synthase confer resistance to isoxaben and thiazolidinone herbicides in *Arabidopsis* *Ixr1* mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(18), 10079–10084.

Schindelman, G., Morikami, A., Jung, J., Baskin, T. I., Carpita, N. C., Derbyshire, P., ... Benfey, P. N. (2001). COBRA encodes a putative GPI-anchored protein, which is polarly localized and necessary for oriented cell expansion in *Arabidopsis*. *Genes and Development*, *15*(9), 1115–1127.

Schneider, B., & Herth, W. (1986). Distribution of plasma membrane rosettes and kinetics of cellulose formation in xylem development of higher plants. *Protoplasma*, *131*(2), 142–152.

Schneider, R., Hanak, T., Persson, S., & Voigt, C. A. (2016). Cellulose and callose synthesis and organization in focus, what's new? *Current Opinion in Plant Biology*, *34*, 9–16.

Schwab, B., Mathur, J., Saedler, R., Schwarz, H., Frey, B., Scheidegger, C., & Hülskamp, M. (2003). Regulation of cell expansion by the DISTORTED genes in *Arabidopsis thaliana*: Actin controls the spatial organization of microtubules. *Molecular Genetics and Genomics*, *269*(3), 350–360.

Smole, M. S., Kreže, T., Strnad, S., Kleinschek, K. S., & Hribernik, S. (2005). Characterisation of grass fibres. *Journal of Materials Science*, *40*(20), 5349–5353.

Somerville, C. (2006). Cellulose Synthesis in Higher Plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *22*(1), 53–78.

Speicher, T. L., Li, P. Z., & Wallace, I. S. (2018). Phosphoregulation of the Plant Cellulose Synthase Complex and Cellulose Synthase-Like Proteins. *Plants*, *7*(3), 1–18.

Stork, J., Harris, D., Griffiths, J., Williams, B., Beisson, F., Li-Beisson, Y., ... DeBolt, S. (2010). CELLULOSE SYNTHASE9 Serves a Nonredundant Role in Secondary Cell Wall Synthesis in Arabidopsis Epidermal Testa Cells. *Plant Physiology*, 153(2), 580–589.

Sugimoto, K., Himmelspach, R., Williamson, R. E., & Wasteneys, G. O. (2003). Mutation or drug-dependent microtubule disruption causes radial swelling without altering parallel cellulose microfibril deposition in Arabidopsis root cells. *The Plant Cell*, 15(6), 1414–1429.

Szyjanowicz, P. M. J., McKinnon, I., Taylor, N. G., Gardiner, J., Jarvis, M. C., & Turner, S. R. (2004). The irregular xylem 2 mutant is an allele of korrigan that affects the secondary cell wall of Arabidopsis thaliana. *Plant Journal*, 37(5), 730–740.

Szymanski, D. B. (2009). Plant cells taking shape: new insights into cytoplasmic control. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(6), 735–744.

Takahashi, J., Rudsander, U. J., Hedenström, M., Banasiak, A., Harholt, J., Amelot, N., ... Mellerowicz, E. J. (2009). KORRIGAN1 and its aspen homolog PttCel9A1 decrease cellulose crystallinity in Arabidopsis stems. *Plant and Cell Physiology*, 50(6), 1099–1115.

Tang, G. Q., & Sturm, A. (1999). Antisense repression of sucrose synthase in carrot (*Daucus carota* L.) affects growth rather than sucrose partitioning. *Plant Molecular Biology*, 41(4), 465–479.

Taylor, N. G. (1999). The irregular xylem3 Locus of Arabidopsis Encodes a Cellulose Synthase Required for Secondary Cell Wall Synthesis. *The Plant Cell Online*, 11(5), 769–780.

Taylor, N. G. (2007). Identification of cellulose synthase AtCesA7 (IRX3) in vivo phosphorylation sites - A potential role in regulating protein degradation. *Plant Molecular Biology*, 64(1–2), 161–171.

Taylor, N. G., Howells, R. M., Huttly, A. K., Vickers, K., & Turner, S. R. (2003). Interactions among three distinct CesA proteins essential for cellulose synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(3), 1450–1455.

Taylor, N. G., Laurie, S., & Turner, S. R. (2000). Multiple Cellulose Synthase Catalytic Subunits Are Required for Cellulose Synthesis in Arabidopsis. *Plant Cell*, 12(12), 2529–2539.

Thomas, L. H., Forsyth, V. T., Sturcova, A., Kennedy, C. J., May, R. P., Altaner, C. M., ... Jarvis, M. C. (2013). Structure of Cellulose Microfibrils in Primary Cell Walls from Collenchyma. *Plant Physiology*, 161(1), 465–476.

Timmers, J., Vernhettes, S., Desprez, T., Vincken, J. P., Visser, R. G. F., & Trindade, L. M. (2009). Interactions between membrane-bound cellulose synthases involved in the synthesis of the secondary cell wall. *FEBS Letters*, 583(6), 978–982.

Turner, S. R. (1997). Collapsed Xylem Phenotype of Arabidopsis Identifies Mutants Deficient in Cellulose Deposition in the Secondary Cell Wall. *The Plant Cell Online*, 9(5), 689–701.

Vain, T., Crowell, E. F., Timpano, H., Biot, E., Desprez, T., Mansoori, N., ... Vernhettes, S. (2014). The Cellulase KORRIGAN Is Part of the Cellulose Synthase Complex. *Plant Physiology*, 165(4), 1521–1532.

Vandavasi, V. G., Putnam, D. K., Zhang, Q., Petridis, L., Heller, W. T., Nixon, B. T., ... O'Neill, H. (2016). A Structural Study of CESA1 Catalytic Domain of Arabidopsis Cellulose Synthase Complex: Evidence for CESA Trimers. *Plant Physiology*, 170(1), 123–135.

Vergara, C. E., & Carpita, N. C. (2001). Beta-D-glycan synthases and the CesaA gene family: lessons to be learned from the mixed-linkage (1-->3),(1-->4)beta-D-glucan synthase. *Plant Molecular Biology*, 47(1–2), 145–160.

Wang, J., Zhang, Y., Wu, J., Meng, L., & Ren, H. (2013). At FH16, an Arabidopsis Type II Formin, Binds and Bundles both Microfilaments and Microtubules, and Preferentially Binds to Microtubules. *Journal of Integrative Plant Biology*, 55(11), 1002–1015.

Wang, T., & Hong, M. (2016). Solid-state NMR investigations of cellulose structure and interactions with matrix polysaccharides in plant primary cell walls. *Journal of Experimental Botany*, 67(2), 503–514.

Wasteneys, G. O. (2004). Progress in understanding the role of microtubules in plant cells. *Current Opinion in Plant Biology*, 7, 651–680.

Wasteneys, G. O., & Collings, D. A. (2004). Expanding beyond the Great Divide: The Cytoskeleton and Axial Growth. In Hussey, P. J. (ed.) *The Plant Cytoskeleton in Cell Differentiation and Development* (83–115). Victoria: Blackwell.

Wightman, R., & Turner, S. R. (2008). The roles of the cytoskeleton during cellulose deposition at the secondary cell wall. *Plant Journal*, 54(5), 794–805.

Wightman, R., Marshall, R., & Turner, S. R. (2009). A cellulose synthase-containing compartment moves rapidly beneath sites of secondary wall synthesis. *Plant and Cell Physiology*, 50(3), 584–594.

Williamson, R. E., Burn, J. E., & Hocart, C. H. (2002). Towards the mechanism of cellulose synthesis. *Trends in Plant Science*, 7(10), 1360–1385.

Williamson, R. E., Burn, J. E., Birch, R., Baskin, T. I., Arioli, T., Betzner, A. S., & Cork, A. (2001). Morphology of rsw1, a cellulose-deficient mutant of Arabidopsis thaliana. *Protoplasma*, 215(1–4), 116–127.

Wong, H. C., Fear, A. L., Calhoon, R. D., Eichinger, G. H., Mayer, R., Amikam, D., ... Emerick, A. W. (1990). Genetic organization of the cellulose synthase operon in

Acetobacter xylinum. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(20), 8130–8134.

Xiong, G., Li, R., Qian, Q., Song, X., Liu, X., Yu, Y., ... Zhou, Y. (2010). The rice dynamin-related protein DRP2B mediates membrane trafficking, and thereby plays a critical role in secondary cell wall cellulose biosynthesis. *Plant Journal*, 64(1), 56–70.

Yamaoka, S., Shimono, Y., Shirakawa, M., Fukao, Y., Kawase, T., Hatsugai, N., ... Hara-Nishimura, I. (2013). Identification and Dynamics of Arabidopsis Adaptor Protein-2 Complex and Its Involvement in Floral Organ Development. *The Plant Cell*, 25(8), 2958–2969.

Yanagisawa, M., Alonso, J. M., & Szymanski, D. B. (2018). Microtubule-Dependent Confinement of a Cell Signaling and Actin Polymerization Control Module Regulates Polarized Cell Growth. *Current Biology*, 28(15), 2459–2466.

Yanagisawa, M., Desyatova, A. S., Belteton, S. A., Mallery, E. L., Turner, J. A., & Szymanski, D. B. (2015). Patterning mechanisms of cytoskeletal and cell wall systems during leaf trichome morphogenesis. *Nature Plants*, 1(3).

Yanagisawa, M., Zhang, C., & Szymanski, D. B. (2013). ARP2/3-dependent growth in the plant kingdom: SCARs for life. *Frontiers in Plant Science*, 4(June), 1–12.

Yang, C., Svitkina, T., & Vasp, E. (2011). Focus on the Arp2 / 3 complex and formins Filopodia initiation. *Cell Adhesion and Migration*, 5(5), 402–408.

Zhai, Z., Jung, H., & Vatamaniuk, O. K. (2009). Isolation of Protoplasts from Tissues of 14-day-old Seedlings of *Arabidopsis thaliana*; *Journal of Visualized Experiments*, (30), 15–17.

Zhang, C., Mallery, E. L., Schlueter, J., Huang, S., Fan, Y., Brankle, S., ... Szymanski, D. B. (2008). Arabidopsis SCARs Function Interchangeably to Meet Actin-Related Protein 2/3 Activation Thresholds during Morphogenesis. *The Plant Cell Online*, 20(4), 995–1011.

Zhang, Y., Nikolovski, N., Sorieul, M., Velloso, T., McFarlane, H. E., Dupree, R., ... Dupree, P. (2016). Golgi-localized STELLO proteins regulate the assembly and trafficking of cellulose synthase complexes in Arabidopsis. *Nature Communications*, 7.

Zhao, Y., Pan, Z., Zhang, Y., Qu, X., Zhang, Y., Yang, Y., ... Guo, Y. (2013). The Actin-Related Protein2/3 Complex Regulates Mitochondrial-Associated Calcium Signaling during Salt Stress in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 25(11), 4544–4559.

Zhong, R., Burk, D. H., Morrison, W. H., & Ye, Z.-H. (2002). A Kinesin-Like Protein Is Essential for Oriented Deposition of Cellulose Microfibrils and Cell Wall Strength. *The Plant Cell Online*, 14(12), 3101–3117.

Zhong, R., Kays, S. J., Schroeder, B. P., and Ye, Z. H. (2002). Mutation of a Chitinase-Like Gene Causes Ectopic Deposition of Lignin, Aberrant Cell Shapes, and Overproduction of Ethylene. *The Plant Cell Online*, 14(1), 165–179.

Zhu, X., Li, S., Pan, S., Xin, X., & Gu, Y. (2018). CSII, PATROL1, and exocyst complex cooperate in delivery of cellulose synthase complexes to the plasma membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(24), 201800182.