Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Experimentální biologie rostlin

Bc. Štěpánka Kebrlová

Role aktinového cytoskeletu při umísťování auxinových přenašečů v plazmatické membráně

The role of actin cytoskeleton in the targeting of auxin carriers to the plasma membrane

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Jan Petrášek, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Judith García-González

Praha, 2022

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, 11.8.2022

Podpis

Poděkování

V první řadě děkuji svému školiteli Janu Petráškovi za vřelý přístup, trpělivost a všechen věnovaný čas v průběhu tvorby této diplomové práce. Děkuji Judith García-González za konzultace a veškerou pomoc s vyhodnocením dat.

Dále děkuji Katarině Kurtović a Erice Bellinvia za pomoc s genotypováním. Děkuji Aničce Kampové za pomoc s pěstováním rostlin. Také děkuji Matyáši Fendrychovi za rady a poskytnutí fluorescenčních barev.

Děkuji rodičům za poskytnutí zázemí při psaní této práce. Nesmírně děkuji svému bratrovi Janovi za poskytnutí jeho vynikajících programovacích schopností a za nespočetné hodiny práce a konzultací při vytváření systému pro vyhodnocování dat. Nakonec děkuji Danielu Launovi za poskytování opory a udržení chladné hlavy při častých stresujících chvílích.

Abstrakt

Auxin hraje významnou morfogenní roli ve vývoji rostlin, zejména díky jeho účinku na genovou expresi, ale i řadu rychlejších dějů, které jsou přímo závislé na jeho koncentraci. Proto je v mnoha rostlinných pletivech směrovaný transport auxinu, zajišťovaný specifickými přenašeči v plazmatické membráně, důležitý pro koordinaci morfogenních stimulů. Množství auxinových přenašečů v plazmatické membráně přímo ovlivňuje výslednou koncentraci auxinu uvnitř buňky. Ačkoliv se dá předpokládat, že lokalizace auxinových přenašečů a jejich množství v plazmatické membráně jsou určovány především aktinovým cytoskeletem a jeho zapojením v procesech váčkového transportu, není v současné době tento vztah stále vyjasněn. Proto nás v této práci zajímalo, jak je lokalizace a funkce auxinových přenašečů ovlivněna v případě, že je v daném buněčném typu postižena funkce aktinového cytoskeletu. K tomuto účelu byla studována lokalizace auxinových přenašečů PIN3, PIN4, PIN7 a AUX1 v pokožkových buňkách velmi mladých děložních listů *Arabidopsis thaliana*, jejichž morfogeneze byla postižena mutacemi v podjednotkách aktinového nukleačního komplexu ARP2/3. Byly připraveny kříženci mutantů v podjednotkách komplexu ARP2/3 s markerovými liniemi nesoucí fluorescenčně označené auxinové přenašeče a sensory auxinem řízené genové exprese, provedena mikroskopická pozorování a zaveden kvantitativní postup hodnocení lokalizace auxinových přenašečů a auxinových gradientů pomocí obrazové analýzy, umožňující i hodnotit tyto parametry pro jednotlivé velikostní kategorie buněk. Výsledky ukázaly, že množství auxinových přenašečů na plazmatické membráně pokožkových buněk bylo u mutantů sníženo, stejně tak i v případě aplikace aktinové drogy latrunkulinu B. Současně se v mutantech, které se vyznačují poškozenou morfogenezí projevila celkově snížená genová exprese, ale větší auxinem-řízená genová exprese. Výsledky ukazují, že aktinová dynamika je zásadní nejen pro procesy související s genovou expresí, ale je specificky i pro zajištění umisťování auxinových přenašečů v plazmatické membráně, které je klíčové při ustavení auxinových gradientů.

Klíčová slova: auxin, auxinové přenašeče, aktinový cytoskelet, ARP2/3, plazmatická membrána, *Arabidopsis thaliana*

Abstract

Auxin plays an important morphogenic role in plant development, mainly through its effect on gene expression, but also through a number of faster processes that are directly dependent on its concentration. Therefore, in many plant tissues, directional auxin transport using specific transporters in the plasma membrane, is important for the coordination of morphogenic stimuli. The amount of auxin carriers in the plasma membrane directly affects the resulting auxin concentration inside the cell. Although the localization of auxin transporters and their abundance in the plasma membrane could be determined primarily by the actin cytoskeleton and its involvement in vesicle transport processes, this relationship is currently still unclear. Therefore, in this study, we were interested in how the localization and function of auxin transporters is affected when the function of the actin cytoskeleton is affected in a given cell type. To this end, the localization of the auxin transporters PIN3, PIN4, PIN7, and AUX1 was studied in epidermal cells of cotyledons in young seedlings of *Arabidopsis thaliana* whose morphogenesis was affected by mutations in subunits of the actin nucleation complex ARP2/3. Crosses of mutants in the ARP2/3 complex subunits with marker lines carrying fluorescently labeled auxin carriers and auxin-driven gene expression sensors were prepared, microscopic observations were made, and a quantitative procedure was established to assess the localization of auxin carriers and auxin gradients by image analysis, allowing also to assess these parameters for different cell size categories. The results showed that the amount of auxin carriers on the plasma membrane of epidermal cells was reduced in mutants, as well as in the case of the actin drug latrunculin B treatments. Mutants exhibiting defective morphogenesis showed overall reduced gene expression but increased auxin-driven gene expression. These results indicate that actin dynamics is not only essential for processes related to gene expression, but it is also specifically involved in the positioning of auxin carriers in the plasma membrane, which is crucial in the establishment of auxin gradients.

Key words: auxin, auxin carriers, actin cytoskeleton, ARP2/3, plasma membrane, *Arabidopsis thaliana*

Obsah

1 Úvod a cíle práce 1
2 Literární přehled 2
2.1 Rostlinný cytoskelet 2
2.1.1 Aktinová filamenta 2
2.2 Komplex ARP2/3 4
2.2.1 Stavba komplexu 4
2.2.2 Mechanismus fungování a regulace aktivity komplexu 5
2.2.3 Funkce komplexu ve vývoji rostlin 6
2.3 Auxin 8
2.3.1 Auxinové přenašeče 11
2.3.2 Auxinová signalizace 12
2.4 Role aktinového cytoskeletu v auxinovém transportu 14
2.4.1 Transport váčků s přenašeči auxinu 15
2.4.2 Umisťování auxinových přenašečů v plazmatické membráně 17
2.4.3 Vliv narušení aktinového cytoskeletu 18
3 Materiál a metody 20
3.1 Rostlinný materiál 20
3.2 Kultivace rostlin 20
3.3 Příprava linií křížením 21
3.4 Selekce 22
3.5 Genotypování 22
3.5.1 Izolace DNA 23
3.5.2 PCR 24
3.5.3 Separace DNA pomocí elektroforézy 26
3.6 Narušení aktinového cytoskeletu pomocí latrunkulinu B 26
3.7 Vizualizace membránového systému v pokožkových buňkách děložních listů pomocí FM4-64 26
3.8 Mikroskopie 27
3.9 Obrazová analýza 28
3.10 Grafické zpracování a statistické vyhodnocení dat 30
4 Výsledky 31

4.1 Příprava linií pro mikroskopická pozorování 31
4.2 Zavedení kvantitativní metody vyhodnocení lokalizace auxinových přenašečů a auxinem řízené genové exprese pomocí obrazové analýzy 35
4.3 Analýza lokalizace auxinových přenašečů po narušení dynamiky aktinového cytoskeletu 36
4.3.1 Lokalizace PIN3 v pokožce děložních listů rostlin nesoucích mutace podjednotek komplexu ARP2/3 37
4.3.2 Lokalizace PIN3 v pokožce děložních listů rostlin po narušení aktinového cytoskeletu pomocí latrunkulinu B 42
4.3.3 Charakterizace vnitrobuněčné lokalizace auxinových přenašečů pomocí FM 4-64 44
4.3.4 Lokalizace PIN4 v pokožce děložních listů rostlin nesoucích mutace podjednotek komplexu ARP2/3 44
4.3.5 Lokalizace PIN7 v pokožce děložních listů rostlin nesoucích mutace podjednotek komplexu ARP2/3 48
4.3.6 Lokalizace AUX1 v pokožce děložních listů rostlin nesoucích mutace podjednotek komplexu ARP2/3 50
4.3.7 Analýza genové exprese řízené auxinem v pokožce děložních listů rostlin nesoucích mutace podjednotek komplexu ARP2/3 52
4.3.8 Míra auxinové signalizace v pokožce děložních listů rostlin nesoucích mutace podjednotek komplexu ARP2/3 hodnocená pomocí DII-VENUS a mDII-VENUS 52
4.3.9 Míra auxinové signalizace v pokožce děložních listů rostlin nesoucích mutace podjednotek komplexu ARP2/3 hodnocená pomocí R2D2 55
5 Diskuze 60
5.1 Mikroskopická pozorování 60
5.2 Zavedení kvantitativní metody vyhodnocení lokalizace auxinových přenašečů a auxinových gradientů pomocí obrazové analýzy 60
5.3 Analýza lokalizace auxinových přenašečů po narušení dynamiky aktinového cytoskeletu 61
5.4 Analýza genové exprese řízené auxinem v pokožce děložních listů nesoucích mutované podjednotky aktin nukleačního komplexu ARP2/3 62
6 Závěry 63
7 Seznam použité literatury 64

Seznam zkratek

AAPs - actin-associated proteins

ABCB/PGP - ATP-binding cassette subfamily B/P-glycoprotein

ABPs - actin-binding proteins

ARF - AUXIN RESPONSE FACTOR

ARF-GEF - ADP-ribosylation factor-guanine-nucleotide exchange factor

ARP2/3 - actin related protein 2/3

ARPC - actin related protein component

Aux/IAA - AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID

AUX1/LAX - AUXIN RESISTANT 1/LIKE AUX1

AuxREs - AUXIN RESPONSE ELEMENTs

DAG - days after germination

DHFR - dihydrofolate reductase

DMSO - dimethylsulfoxide

DR5 - direct repeat 5

F-aktin - filamentous actin

FM4-64 - N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(diethylamino)phenyl)hexatrienyl) pyridinium dibromide

F-STS - fluorescein-5-(and-6)-Sulfonic Acid, Trisodium Salt

G-aktin - globular actin

GFP - green fluorescent protein

IAA - indole-3-acetic acid

IBA - indole-3-butyric acid

IPA - indole-3-pyruvate

LatB - latrunkulin B

LB - left border

NLS - nuclear localization signal

NPFs - nucleation promoting factors

NRT1.1 - nitrate transporter 1.1

PAA - phenylacetic acid

PAT - polar auxin transport

Pi - anorganický fosfát

PIN - PIN-FORMED

PM - plazmatická membrána

PVC - prevacuolar compartment

RB - right border

RFP - red fluorescent protein

R2D2 - ratiometric version of 2 D2's

SCAR/WAVE - suppressor of cAR/WASP family verprolin-homologous protein

SCF - SKP1-CULLIN1-F-BOX

SDS-PAGE - sodium dodecyl sulfát – polyacrylamide gel electrophoresis

TAA - tryptophan aminotransferase of Arabidopsis

TGN - trans-Golgi network

TIR1/AFB - TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE1/AUXIN-SIGNALING F-BOX

YFP - Yellow fluorescent protein

WASP - Wiskott-Aldrich syndrome protein

4-Cl-IAA - 4-Chloroindole-3-acetic acid

1 Úvod a cíle práce

Morfogeneze rostlinných buněk a orgánů je vedle orientace osy buněčného dělení těsně spojena s regulací směrovaného růstu buněk. Během zvětšování buněk dochází k dynamické přestavbě struktury buněčných povrchů včetně plazmatické membrány, při které se účastní struktury cytoskeletu. V naší laboratoři se dlouhodobě zabýváme buněčnou biologií morfogenního účinku auxinu a jeho přenašečů. Řada funkcí auxinu je těsně spojena se specifickým umístěním jeho přenašečů v plazmatické membráně. Proto nás zajímalo, jak je jejich lokalizace a činnost ovlivněna v případě, že je v daném buněčném typu postižena funkce aktinového cytoskeletu. K této práci jsem si vybrala pokožkové buňky děložních listů semenáčků *Arabidopsis thaliana*, v jejichž tvaru se nejnápadněji projevuje poškození dynamiky aktinové sítě po vyřazení proteinů aktinového nukleačního komplexu ARP2/3. Tyto buňky nejsou schopny správné morfogeneze a na místo jejich typického dlaždicového uspořádání je u nich časná expanze převážně isodiametrická. Údaje o *in vivo* lokalizaci auxinových přenašečů v těchto buňkách jsou prozatím v literatuře velice kusé, stejně tak není známa dynamika auxinem řízené genové exprese v tomto pletivu. Hodnotila jsem, jak bude postiženo umístění auxinových přenašečů v případě porušení dynamiky aktinového cytoskeletu a jaký to bude mít také důsledek pro celkové nastavení auxinové signální dráhy v těchto buňkách.

Práce měla tyto tři hlavní cíle:

1. Připravit markerové linie a zavést kvantitativní postup hodnocení lokalizace auxinových přenašečů a auxinem řízené genové exprese pomocí obrazové analýzy.
2. Analyzovat lokalizaci auxinových přenašečů v pokožce děložních listů *Arabidopsis thaliana* po narušení aktinového cytoskeletu.
3. Analyzovat míru genové exprese řízenou auxinem v pokožce děložních listů rostlin nesoucích mutované podjednotky aktin nukleačního komplexu ARP2/3.

2 Literární přehled

2.1 Rostlinný cytoskelet

Cytoskelet (buněčná kostra) je tvořen dvěma hlavními složkami, tj. aktinovými filamenty a mikrotubuly, které v buňkách tvoří dynamickou trojrozměrnou síť. Obě tyto složky jsou tvořeny vláknitými polymery sestávajícími ze základních globulárních podjednotek molekul aktinu a tubulinu, které mají k sobě navázaný nukleotidtrifosfát (NTP). Tím je v případě aktinu adenosintrifosfát (ATP) a v případě tubulinu guanosintrifosfát (GTP). Jednotlivé monomery polymerují do podoby vláken za pomoci hydrolýzy navázaného NTP. Vlákna jsou prostorově polarizována, mají tzv. plus a minus konec. Aktinová filamenta i mikrotubuly mají schopnost rychlé polymerace a depolymerace, což z nich dělá vysoce dynamické struktury. Pro jejich funkci jsou zásadní proteiny s nimi asociované, které zajišťují polymeraci cytoskeletálních vláken a jejich využívání pro různé procesy v buňkách, shrnuto v (Pollard, 2016; Goodson a Jonasson, 2018). Cytoskelet prolínající se buňkami slouží jako transportní síť pro různé organely a váčky a je nezbytný pro důležité procesy jako např. dělení a morfogenezi buněk, shrnuto v (Hussey a kol., 2006; Petrásek a Schwarzerová, 2009; Szymanski, 2009; Lian a kol., 2021).

2.1.1 Aktinová filamenta

Aktinový cytoskelet se skládá z mikrofilament, vláken o průměru 6-9 nm. Základní podjednotkou mikrofilament jsou proteinové monomery glubulárního aktinu, G-aktinu (tzv. globular actin), s molekulovou hmotností 43 kDa. Podjednotky aktinu polymerují do podoby vláken filamentárního aktinu, F-aktinu (tzv. filamentous actin), ve tvaru pravotočivé dvoušroubovice.

U *Arabidopsis thaliana* se vyskytuje celkem 8 izoforem aktinu, které se dle svého expresního profilu v jednotlivých pletivech dají rozdělit na vegetativní a generativní (McDowell a kol., 1996). Mezi vegetativní izoformy aktinu patří ACT2, ACT7 a ACT8, mezi generativní patří ACT1, ACT3, ACT4, ACT11 a ACT12 (Meagher a kol., 1999). Mezi nejobecnější aktiny patří ACT2 A ACT7, které jsou v rostlině exprimovány téměř všude.

Polymerace aktinu probíhá ve dvou fázích. Po tzv. *de novo* nukleaci, tj. založení počátku nového vlákna ze tří monomerů G-aktinu, dochází ve druhé fázi k elongaci vzniklého vlákna.

Nukleaci aktinu zprostředkují specifické aktin-asociované proteiny (AAPs/ABPs; actin associated proteins/actin binding proteins). Zatímco molekuly forminů zajišťují nukleaci aktinových filament *de novo*, proteinový komplex ARP2/3 umožňuje větvení již existujících vláken (Li a kol., 2003; Michelot a kol., 2005). V buňkách dochází také ke štěpení stabilních vláken a vzniklé fragmenty pak mohou být využity jako počátek pro růst nových mikrofilament nebo dojde k jejich depolymeraci. Jen okolo 1-2 % aktinových filament vzniká nukleací *de novo*, zbytek je tvořen fragmentací stávajících vláken. Díky této možnosti může v buňkách docházet k dynamickým přestavbám a je tak umožněna tvorba různě husté sítě vláken podle momentální potřeby, shrnuto v (De La Cruz a Gardel, 2015). V podmínkách *in vitro* byla pozorována také samovolná polymerace aktinu bez přítomnosti nukleátorů, což ale v rostlinách *in vivo* neprobíhá. Elongace vznikajících filament je regulována pomocí malého asociovaného proteinu profilinu, který vyvazuje volný G-aktin 1:1 a zabraňuje tak samovolné polymeraci (Huang a kol., 1996).

Aktinové monomery mají ve své struktuře štěrbinu, do které se váže ATP. Konformace monomerů s navázaným ATP podporuje jejich polymeraci a jako kofaktor pro polymeraci slouží také navázané ionty Mg^{2+}. Jednotlivé monomery mají ATPázovou aktivitu, krátce po navázání totiž dochází k hydrolýze ATP na ADP + Pi. Po následné disociaci fosfátu se původní ATP-aktin mění na ADP-aktin. Ten má v důsledku konformačních změn menší afinitu k sousedícím podjednotkám ve vláknu, a tak dochází k destabilizaci a depolymeraci vlákna, shrnuto v (Pollard, 2007; Dominguez a Holmes, 2011). Aktinová filamenta jsou polarizovaná, mají plus a minus konec, a k jejich polymeraci dochází na plus konci, kam se připojují molekuly G-aktinu s navázaným ATP. Nově připojené podjednotky tvoří tzv. ATP čepičku, která sama o sobě chrání plus konec před okamžitým rozpadem. Kromě toho může plus konec stabilizovat také asociace s čepičkujícími proteiny (capping proteins). Na stárnoucím konci vlákna, minus konci, se hromadí podjednotky ADP-aktinu, což podporuje depolymeraci vlákna (Blanchoin a kol., 2000; Pollard, 2007).

Pro zkoumání role aktinového cytoskeletu se hojně využívají cytoskeletální drogy. Mezi nejpoužívanější patří latrunkuliny a cytochalasiny (Spector a kol., 1989). Latrunkuliny, látky izolované z mořské houby, se váží na aktin a narušují jeho organizaci a polymeraci (Spector a kol., 1983). Cytochalasiny jsou houbové metabolity, které způsobují depolymeraci aktinu a také inhibici jeho další polymerace (Carter, 1967; Spector a kol., 1989).

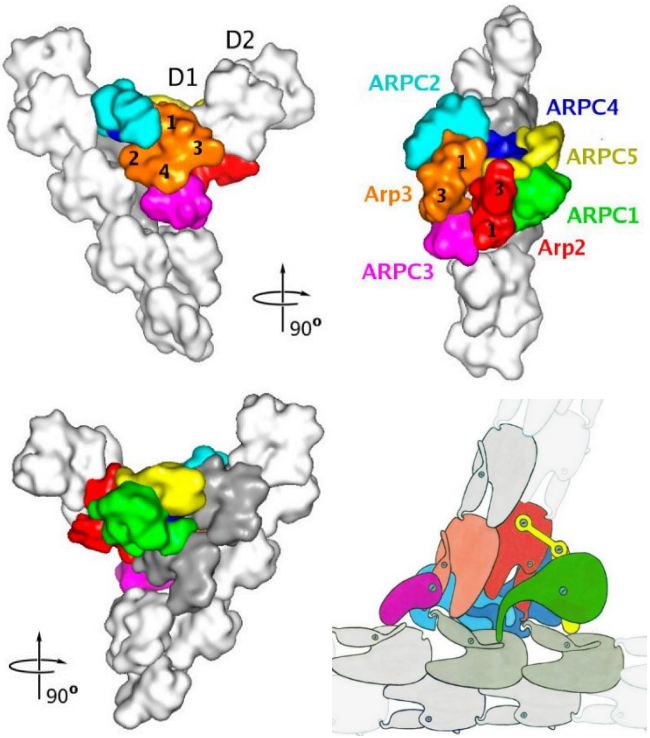
2.2 Komplex ARP2/3

2.2.1 Stavba komplexu

Hetero-heptamerický proteinový komplex ARP2/3 (Actin Related Protein 2/3) se skládá celkem ze 7 evolučně konzervovaných podjednotek s celkovou hmotností 220 kDa (Welch a kol., 1997). Poprvé byl izolován z měňavkovitého prvoka *Acanthamoeba castellanii* pomocí afinitní chromatografie na agaróze s aktin vazebným proteinem profilinem (Machesky a kol., 1994). Jednotlivé podjednotky mají u různých organismů odlišné označení, u rostlin je to ARP2, ARP3 a ARPC1-5, označené sestupně dle molekulové velikosti (Li a kol., 2003). Podjednotky ARP2 a ARP3 jsou strukturně podobné aktinu (Machesky a kol., 1994) a společně tvoří heterodimer, podobající se dvěma podjednotkám na konci aktinového filamenta, který slouží jako počátek pro vznik nového vlákna (Kelleher a kol., 1995; Volkmann a kol., 2001; Rouiller a kol., 2008).

Všechny podjednotky komplexu jsou v různé míře v kontaktu s mateřským filamentem. Podjednotky ARPC1-5 společně tvoří platformu pro kotvení komplexu s mateřským vláknem na jedné straně a s dceřiným vláknem, přes podjednotky ARP2 a 3, na straně druhé (Obrázek 1). Podjednotka ARPC1 je s mateřským vláknem pouze v minimálním kontaktu a zdá se, že její funkce by mohla být spíše regulační. ARPC3 tvoří můstek mezi mateřským vláknem a podjednotkou ARP3, což má zřejmě stabilizační vliv (Rouiller a kol., 2008). Podjednotka ARPC4 je umístěna v jádru komplexu a je zásadní pro vytvoření a stabilizaci komplexu, což podporují např. pokusy (Kotchoni a kol., 2009), ve kterých při mutaci ARPC4 došlo k rozpadu komplexu. ARPC4 spolu s podjednotkou ARPC2 tvoří heterodimer, který je důležitý pro interakci s mateřským vláknem – kontakt je zprostředkován hlavně přes ARPC2, a zároveň zajišťují také zakotvení podjednotky ARP3. ARPC5 je v kontaktu s mateřským vláknem a její N-konec je obtočen kolem podjednotky ARP2, což by mohlo naznačovat na účast při konformačních změnách během aktivace komplexu (Rouiller a kol., 2008).

Téměř všechny podjednotky jsou kódovány jedním genem kromě podjednotek ARPC1 a ARPC2, které jsou kódovány dvěma geny – *ARPC1a, ARPC1b* a *ARPC2a, ARPC2b* (Li a kol., 2003; Mathur a kol., 2003a).



Obrázek 1: Model komplexu ARP2/3 v interakci s mateřským aktinovým vláknem. Barevně jsou vyznačeny podjednotky komplexu. Šedivou barvou jsou znázorněny monomery aktinu, D1 a D2 jsou první dva monomery nově vznikajícího dceřiného vlákna. Převzato a upraveno podle (Rouiller a kol., 2008).

2.2.2 Mechanismus fungování a regulace aktivity komplexu

Sestavený komplex se váže na stranu aktinových filament a podjednotky ARP2 a ARP3 pak slouží jako základ pro polymeraci nového vlákna s úhlem větvení 70 ± 7° vzhledem k původnímu vláknu (Mullins a kol., 1998; Amann a Pollard, 2001; Rouiller a kol., 2008). Podjednotka ARP2 má na sobě vazebné místo pro profilin, což umožňuje kopolymerizaci s G-aktinem (Kelleher a kol., 1995; Mullins a kol., 1998).

Samotný komplex však nemá nukleační aktivitu a pro svou funkci vyžaduje specifické faktory podporující nukleaci, tzv. NPFs (nucleation promoting factors), které komplex aktivují. Po navázání faktoru dochází ke změně konformace podjednotek ARP2 a ARP3 z „otevřené“/neaktivní na „zavřenou“/aktivní, kdy se podjednotky k sobě přiblíží a získají tak schopnost fungovat jako nukleační počátek (Robinson a kol., 2001; Rouiller a kol., 2008).

NPFs existuje celá řada (Kollmar a kol., 2012). Prvními objevenými NPFs pro komplex ARP2/3 u různých organismů byla rodina proteinů zvaných WASP (Wiskott-Aldrich syndrome

protein) (Yarar a kol., 1999; Winter a kol., 1999; Rohatgi a kol., 1999). U rostlin byl dosud identifikován jen jediný aktivátor, proteinový komplex SCAR/WAVE (suppressor of cAR/WASP family verprolin-homologous protein) skládající se z 5 podjednotek ABI1, NAP1, PIR121, HSCP300 a SCAR/WAVE (Frank a kol., 2004; Basu a kol., 2005). Pro rostlinné homology podjednotek existují také další různé názvy: ABI1/ABIL1, NAP1/GRL/NAPP, PIR121/SRA1/KLK/PIRP, HSCP300/BRK1 a SCAR/WAVE /DIS3/SCAR2/ITB1 (Basu a kol., 2005).

Komplex SCAR/WAVE patří do skupiny NPF typu I, které mají charakteristickou VCA doménu (verprolin homology domain, WH2), dále centrální doménu (cofilin homology domain) a kyselou doménu, která váže ARP2/3 komplex a G-aktin. U živočichů bylo ukázáno, že komplex SCAR/WAVE je nejprve aktivován vazbou Rac GTPázy, což způsobí uvolnění VCA domény a následně dojde k aktivaci komplexu ARP2/3 a k jeho vazbě na mateřské aktinové vlákno, kde zahájí nukleaci nového vlákna. V případě skupiny NPF typu I tedy aktivace komplexu ARP2/3 zahrnuje ARP2/3 komplex, NPF a G-aktin (Robinson a kol., 2001; Welch a Mullins, 2002) a konečnou aktivační reakci pak indukuje vazba na mateřské vlákno (Marchand a kol., 2001).

Komplex ARP2/3 silně interaguje s buněčnými membránami, ale zřejmě pouze během svého sestavování. Analýzy mutantů naznačují, že pro interakci by mohla být důležitá podjednotka ARP2 (Kotchoni a kol., 2009). V pokožkových buňkách *Arabidopsis thaliana* byl nalezen pool komplexu v jádře a také na povrchu různých organel a většina takto asociovaných komplexů se zdá být neaktivní (Zhang a kol., 2013).

2.2.3 Funkce komplexu ve vývoji rostlin

Mutanti v některých podjednotkách komplexu ARP2/3 a komplexu SCAR/WAVE byli poprvé pozorováni v rámci sady tzv. *distorted* mutantů, známých díky typickému fenotypovému projevu špatně vyvinutých deformovaných trichomů (Obrázek 2). V původní práci bylo popsáno celkem 8 mutací v různých genech *Arabidopsis thaliana* označených jako *ALIEN*, *CROOKED*, *DISTORTED1*, *DISTORTED2*, *GNARLED*, *PIROGI*, *SPIRRIG*, *WURM* (Hülskamp a kol., 1994), které byly později identifikovány. Část mutantů byla přiřazena k odpovídajícím podjednotkám ARP2/3 komplexu takto: *DISTORTED1* – ARP3 (Le a kol., 2003; Mathur a kol., 2003a), *DISTORTED2* – ARPC2 (El-Din El-Assal a kol., 2004; Saedler a kol., 2004), *CROOKED* – ARPC5 (Mathur a kol., 2003b), *WURM* – ARP2 (Le a kol., 2003; Mathur a kol., 2003a). Zbylí mutanti byli přiřazeni k podjednotkám komplexu SCAR/WAVE (Schwab a kol., 2003; El-Din

El-Assal a kol., 2004; Basu a kol., 2004; Saedler a kol., 2009). Dále byli do skupiny *distorted* přidáni ještě další mutanti odpovídající jiným podjednotkám komplexu SCAR/WAVE – *DISTORTED3* (Basu a kol., 2005) a *BRICK1* (Le a kol., 2006). U *Arabidopsis thaliana* jsou nyní mutace v jednotlivých podjednotkách označovány obecně jako mutace *arp*. Komplex ARP2/3 je funkčně konzervovaný. Důkazem toho jsou pokusy s úspěšnou komplementací podjednotky ARP3 u mutantní kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (Le a kol., 2003) nebo při komplementaci mutanta v ARPC5 jeho lidským orthologem (Mathur a kol., 2003b).

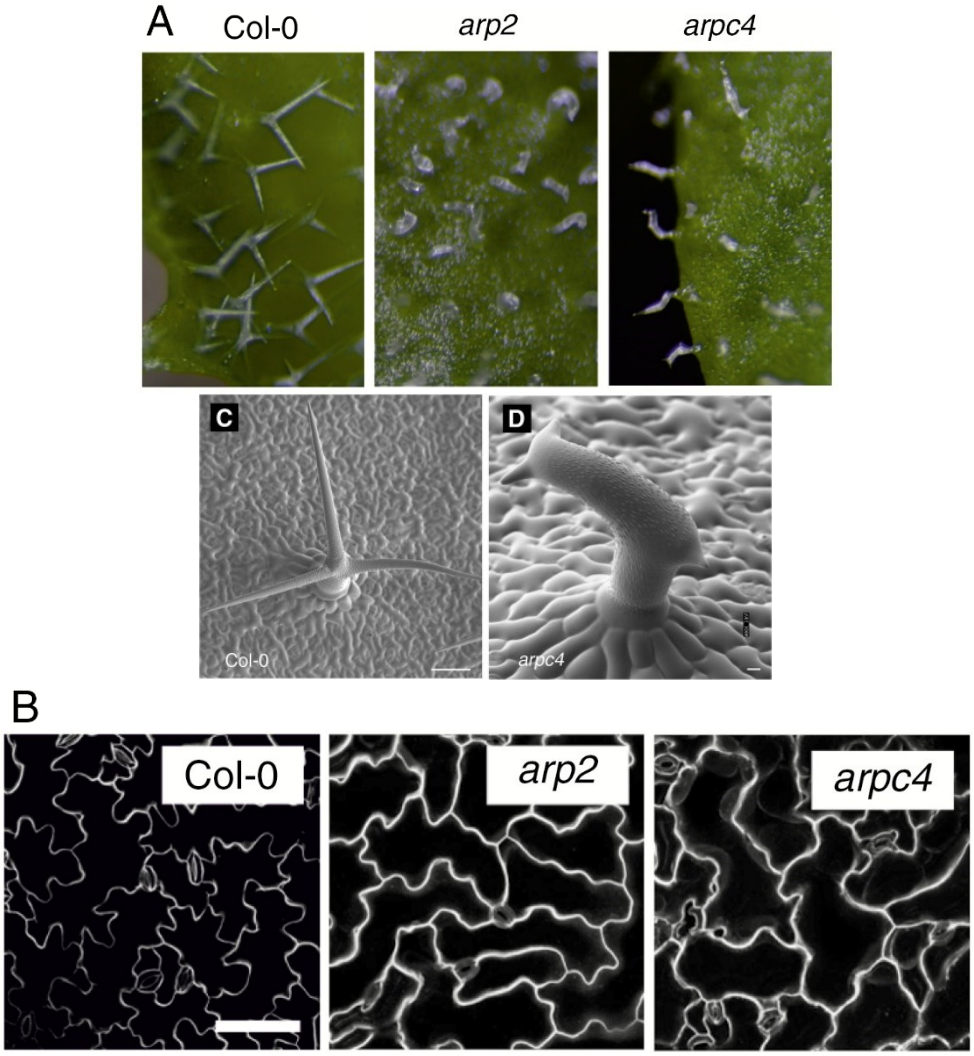
Mutace komplexu ARP2/3 a komplexu SCAR/WAVE nejsou pro rostliny letální. Mají podobné fenotypové projevy, a to i v případě dvojité mutace podjednotek obou komplexů, což ukazuje na jedinečnou důležitost SCAR/WAVE jako aktivačního faktoru ARP2/3 (Deeks a kol., 2004; El-Din El-Assal a kol., 2004; Basu a kol., 2005; Le a kol., 2006; Djakovic a kol., 2006).

Mutace podjednotek komplexu ARP2/3 však mají vliv na morfogenezi rostlinných buněk. Největší projevy lze pozorovat u buněk složitých tvarů, jako jsou již zmíněné trichomy, u kterých dochází k pokroucení (Obrázek 2), a také epidermální dlaždicové buňky, u kterých dochází ke zvýšení jejich cirkularity (Pratap Sahi a kol., 2018) (Obrázek 2). Bylo ukázáno, že mutace v podjednotkách komplexu narušují organizaci aktinového cytoskeletu u trichomů (Le a kol., 2003; Saedler a kol., 2004; Kotchoni a kol., 2009) i epidermálních dlaždicových buněk (Li a kol., 2003). Též byly pozorovány poruchy adheze epidermálních buněk etiolovaného hypokotylu, zvlněné kořenové vlásky a také fragmentace vakuoly (Mathur a kol., 2003a; Kotchoni a kol., 2009; García-González a kol., 2020). S narušenou morfogenezí buněk u mutantů komplexu ARP2/3 i SCAR/WAVE byly spojeny také změny ve stavbě a složení buněčné stěny (Dyachok a kol., 2008; Yanagisawa a kol., 2015; Pratap Sahi a kol., 2018).

Komplexy ARP2/3 i SCAR/WAVE také hrají důležitou roli při regulaci otevírání stomatálních buněk (Li a kol., 2014; Jiang a kol., 2012; Isner a kol., 2017). Byl též ukázán význam komplexu ARP2/3 pro reakci rostlin na solný stres (Zhao a kol., 2013). Funkce ARP2/3 byla též nově spojena s autofagií (Wang a kol., 2016) i degradací peroxisomů, tzv. pexofagií (Martinek a kol., 2022).

S ohledem na formování povrchu rostlinných buněk je zajímavé, že komplex ARP2/3 je zřejmě stěžejním prvkem koordinace v uspořádávání obou složek cytoskeletu. Již v práci (Schwab a kol., 2003) bylo navrženo, že aktin se zřejmě podílí na správné organizaci mikrotubulů během růstu buněk. Při studiu *distorted* trichomů u rostlin mutovaných v ARPC2 bylo též pozorováno narušení lokalizace aktinu a mikrotubulů, které byly zároveň

lokalizovány v blízkosti u sebe, což naznačuje přítomnost interakce (Saedler a kol., 2004). Přímá interakce podjednotky ARPC2 s mikrotubuly pak byla ukázána v práci (Havelková a kol., 2015).



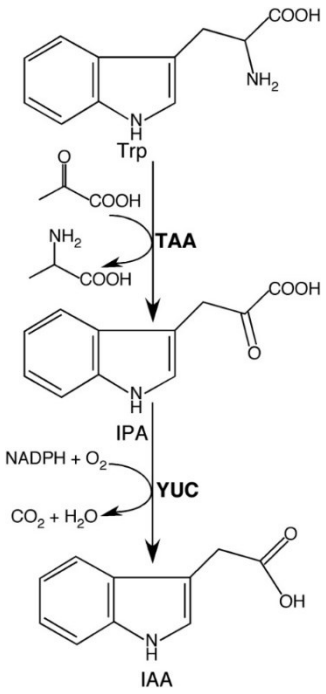
Obrázek 2: Ukázka fenotypových projevů mutací v podjednotkách komplexu ARP2/3. (A, C a D) Deformované *distorted* trichomy, převzato z (Pratap Sahi a kol., 2018); (Kotchoni a kol., 2009). (B) Dlaždicové buňky děložních listů se zvýšenou cirkularitou, převzato z (Pratap Sahi a kol., 2018). Měřítko = 10 µm (C a D), 100 µm (B).

2.3 Auxin

Auxin patří mezi nejdéle studované rostlinné hormony, tzv. fytohormony. Fytohormony jsou molekuly vznikající v nízkých koncentracích v primárním metabolismu rostlin a ovlivňující

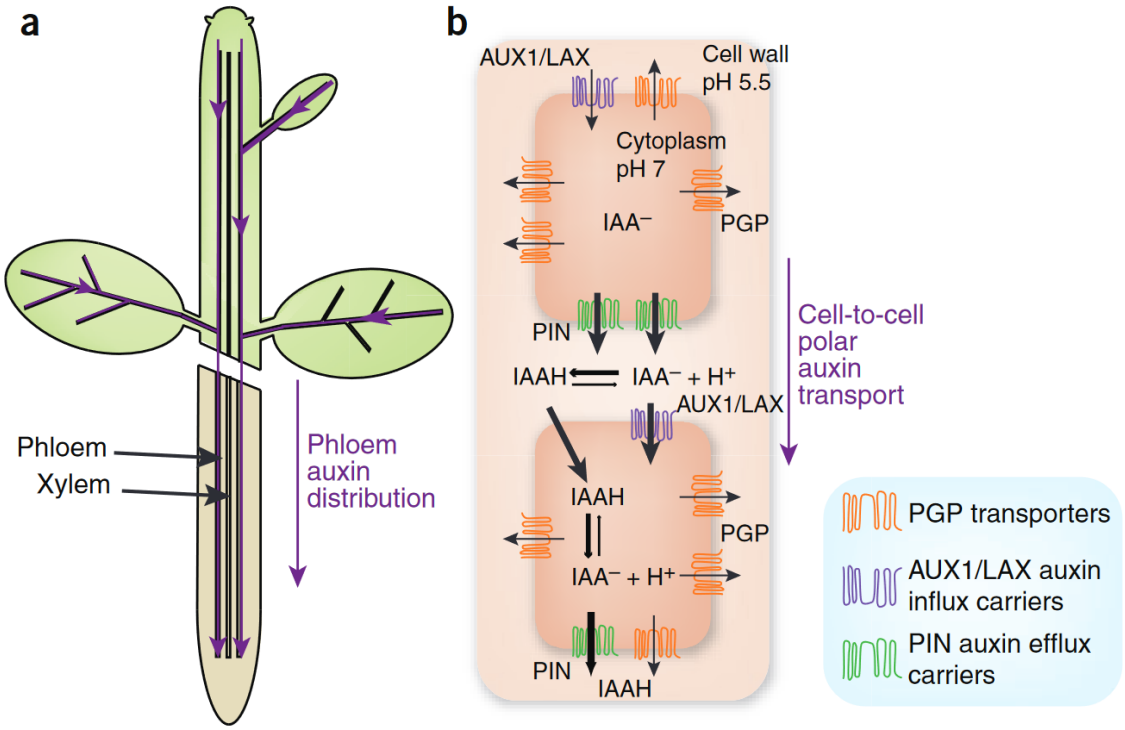
různé fyziologické procesy. Auxin byl prvním objeveným fytohormonem a díky jeho vlivu na prodlužovací růst koleoptilí ovsa byl pojmenován podle řeckého slova *auxein*, což znamená v překladu růst, prodlužovat se (Went, 1926). Auxiny hrají zásadní roli v regulaci rostlinného růstu a vývoje již od časné embryogeneze.

Biosyntéza auxinu probíhá drahami závislými i nezávislými na tryptofanu (Trp), shrnuto v (Gomes a Scortecci, 2021). Dráha závislá na tryptofanu je zásadní a vzniká v ní hlavní přirozeně se vyskytující auxin, kyselina indol-3-octová (IAA) (Obrázek 3) (Mashiguchi a kol., 2011; Won a kol., 2011). Dalšími přirozenými látkam is auxinovou aktivitou jsou kyselina 4-chlorindol-3-octová (4-Cl-IAA) a kyselina fenyloctová (PAA). Často se sem řadí také kyselina indol-3-máselná (IBA), prekurzor IAA, shrnuto v (Damodaran a Strader, 2019). V praktických aplikacích a též v základním výzkum use hojně využívají syntetické auxiny kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová (2,4-D) a kyselina α-naftyloctová (NAA).



Obrázek 3: Dráha biosyntézy auxinu závislá na tryptofanu. První krok syntézy je katalyzován pomocí tryptofan aminotransferázy (TAA), která přenese amino skupinu z Trp na alfa keto kyselinu jako pyruvát za vzniku indol-3-pyruvátu (IPA). Druhý krok je katalyzován pomocí YUC flavinové monooxygenázy za vzniku indol-3-octové kyseliny (IAA). Převzato ze (Zhao, 2012).

K biosyntéze IAA u *Arabidopsis thaliana* dochází hlavně v mladých nadzemních částech rostliny, tj. v mladých listech a v oblastech meristémů (Aloni a kol., 2003). Odtud je auxin transportován na větší vzdálenosti floémem (Obrázek 4). Mezi buňkami se pohybuje z části prostou difuzí, z většiny pak ale směrovaně pomocí auxinových přenašečů umístěných na plazmatické membráně (Goldsmith a kol., 1977). Směrování toku auxinu je umožněno díky asymetrické distribuci přenašečů na plazmatické membráně a označuje se jako polární auxinový transport (PAT). Mechanismus auxinového transportu mezi buňkami byl popsán jako chemiosmotická hypotéza (Rubery a Sheldrake, 1974) (Obrázek 4). Auxiny jsou slabé kyseliny a v relativně kyselém prostředí apoplastu, udržovaném pomocí H^+-ATPáz, dochází z části k jejich protonaci. Protonovaný auxin IAAH může do buňky difundovat volně skrze plazmatickou membránu díky jeho zvýšené lipofilitě. Neprotonovaný IAA^- je z apoplastu transportován aktivně pomocí auxinových přenašečů rodiny AUX1/LAX symportem s H^+ (Sabater a Rubery, 1987). Bylo však ukázáno, že na importu auxinu do buňky se z části podílejí také další přenašeče – minimálně dva přenašeče rodiny ABCB/PGP (Terasaka a kol., 2005; Kubeš a kol., 2012; Kamimoto a kol., 2012) a přenašeč nitrátu NRT1.1 (Krouk a kol., 2010). V neutrálním prostředí cytoplazmy dochází k disociaci IAAH na IAA^- a H^+, IAA^- se pak může ven z buňky dostat pouze aktivním transportem pomocí auxinových přenašečů rodin PIN nebo ABCB/PGP.



Obrázek 4: Transport auxinu floémem (a) a chemiosmotický model polárního auxinového transportu (b). Převzato z (Robert a Friml, 2009).

2.3.1 Auxinové přenašeče

Aktivní pohyb auxinu mezi buňkami je zprostředkován transportem pomocí přenašečových proteinů umístěných v plazmatické membráně. U rostlin byly v případě auxinu popsány v podstatě tři hlavní skupiny přenašečů.

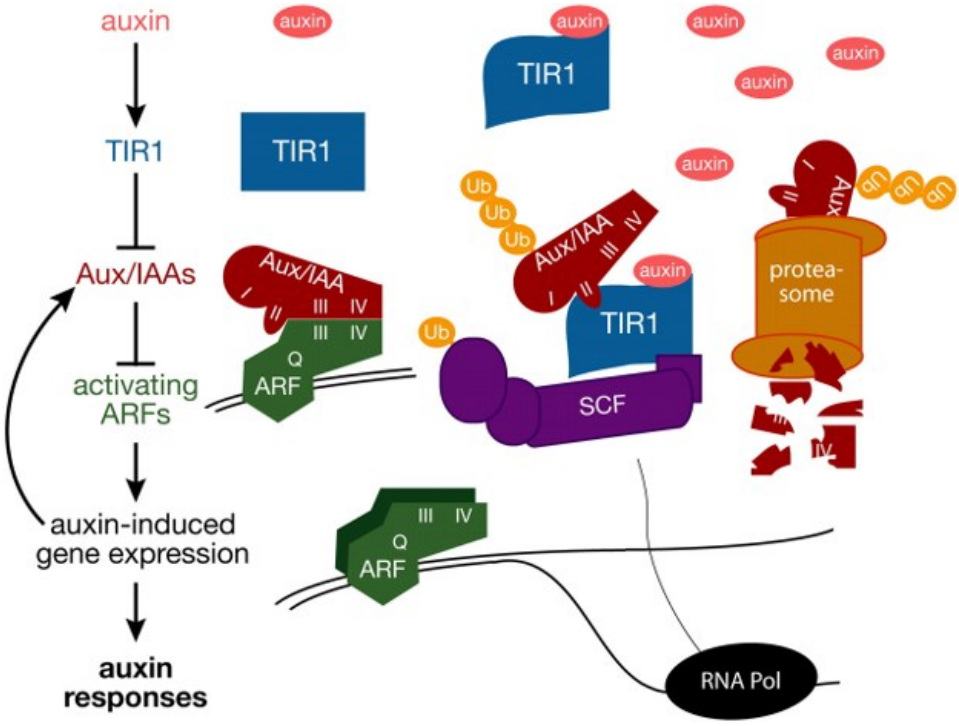
Transport auxinu směrem do buňky zajišťují přenašeče rodiny AUX1/LAX, a to symportem s vodíkovými protony (Sabater a Rubery, 1987). U *Arabidopsis thaliana* byly nalezeny celkem 4 proteiny z této rodiny, AUX1 a LAX1-3 (Bennett a kol., 1996; Péret a kol., 2012). Nejvíce prostudovaný je protein AUX1, který v rámci pletiv není vždy polárně lokalizován. V protofloému kořene se však nachází ve zvýšené míře na apikální straně buněk v kontrastu proti bazálně lokalizovanému PIN1, přenašeči auxinu ven z buňky, což podporuje směrování auxinu z floému do kořenové špičky (Swarup a kol., 2001; Kleine-Vehn a kol., 2006).

Proteiny z rodiny PIN zprostředkují transport auxinu z buněk. Do této rodiny se u *Arabidopsis thaliana* řadí celkem 8 proteinů, PIN1-8. Ty fungují zřejmě na principu tzv. gradientové pumpy a nevyžadují tak pro svou funkci ATP, což je výhodné hlavně v rostoucích pletivech, kde je ATP nedostatek (Zazímalová a kol., 2010). PIN proteiny se rozdělují na dvě skupiny podle délky hydrofilní smyčky v prostřední části jejich polypeptidového řetězce. První skupinou jsou kanonické tzv. dlouhé PINy (PIN1-4 a 7), jejichž cytosolická smyčka je dlouhá a které jsou umístěné na plazmatické membráně. Jsou hlavními hráči při polárním auxinovém transportu, jelikož jejich asymetrické rozložení určuje směr toku auxinu (Wisniewska a kol., 2006). Lokalizace těchto přenašečů a regulace jejich množství na plazmatické membráně probíhá díky dynamickému váčkovému transportu mezi PM a endozomálními kompartmenty (Geldner a kol., 2001). Druhou skupinou jsou nekanonické proteiny PIN (PIN5, 6 a 8), které jsou tzv. krátké, protože mají do různé míry redukovanou hydrofilní smyčku. Na rozdíl od dlouhých PINů jsou lokalizovány hlavně v membráně endoplazmatického retikula (Mravec a kol., 2009).

Další skupinou přenašečů jsou proteiny rodiny ABCB/PGP. Nachází se na plazmatické membráně, kde jsou rozmístěny apolárně a transport auxinu zprostředkují za hydrolýzy ATP. Zástupci této rodiny se podílejí na transportu auxinu z buňky i do buňky (Cho a Cho, 2013). Nejlépe popsané jsou přenašeče ABCB1, 4 a 19, s transportem auxinu pak byly spojeny také přenašeče ABCB14, 15 (Kaneda a kol., 2011) a ABCB21 (Kamimoto a kol., 2012). Směr transportu auxinu pomocí ABCB4 je závislý na koncentraci auxinu v buňce a probíhá po koncentračním spádu (Cho a kol., 2007; Kubeš a kol., 2012). ABCB1 a 19 transportují auxin ven z buněk (Geisler a kol., 2005).

2.3.2 Auxinová signalizace

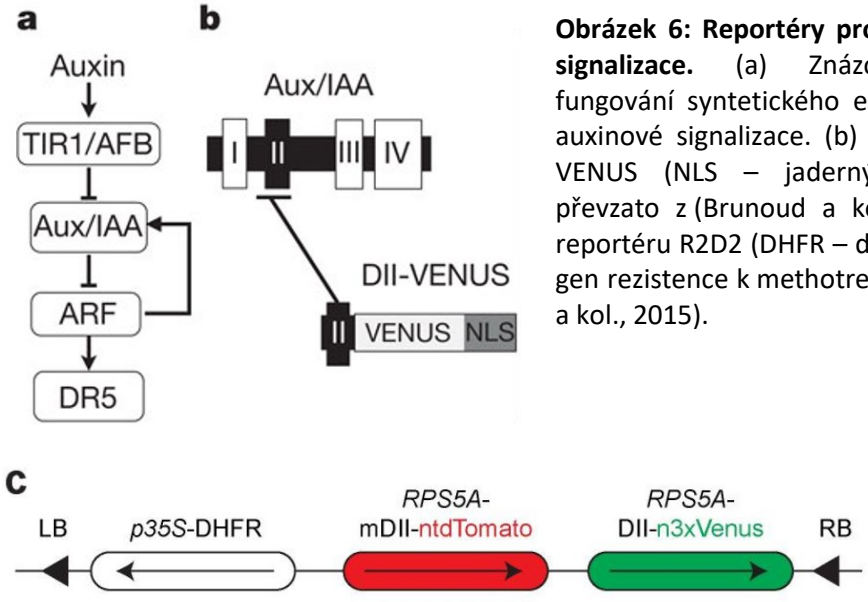
Auxin je signální molekulou, která se podílí na řízení růstu a vývoje rostlin a také na jejich odpovědi na environmentální vlivy. Díky své chemické povaze je IAA schopna prakticky okamžitě stimulovat řadu procesů souvisejících s regulací potenciálu na plazmatické membráně, ustavením cytosolické koncentrace vápenatých iontů a postranslačními modifikacemi proteinů, shrnuto v (Dubey a kol., 2021). Vedle těchto rychlých účinků auxinu, je však jeho funkce ve vývoji rostlin spojena s regulací genové exprese. Odpověď na IAA je zprostředkována skrze tzv. TIR1 dráhu (Obrázek 5). Ta začíná vazbou auxinu na jeho receptor umístěný v jádře, protein z rodiny TIR1/AFB, který je podjednotkou SCF (SKP1-CULLIN1-F-BOX) komplexu E3 ubiquitinové ligázy (Ruegger a kol., 1998; Kepinski a Leyser, 2005; Dharmasiri a kol., 2005). Substrátem této ligázy jsou transkripční represory Aux/IAAs (Gray a kol., 2001), které působí represi proteinů ARF (Auxin Response Factors). Při vazbě auxinu na TIR1/AFB dochází ke zvýšení afinity ligázy k Aux/IAA (Tan a kol., 2007), čímž dojde k jeho degradaci a tím pádem k uvolnění ARF z represe. Proteiny ARF jsou transkripční faktory rozpoznávající úseky DNA zvané AuxREs (Auxin Response Elements) (Ulmasov a kol., 1997a), které se nachází v promotorových oblastech genů regulovaných auxinem a obsahují specifickou regulační sekvenci TGTCTC (Ulmasov a kol., 1995).



Obrázek 5: Znázornění dráhy odpovědi na auxin skrze auxinový receptor TIR1. Převzato z (Woodward a Bartel, 2005).

Pro studium auxinové signalizace se hojně využívá syntetický promotor DR5 složený ze 7-9 opakování sekvence AuxRE (TGTCTC), oddělených od sebe vždy 5 bázemi (Ulmasov a kol., 1997b). Tento promotor je pak základem různých genových konstruktů pro vizualizaci míst transkripční auxinové odpovědi (tzv. „output sensor“), a to např. pomocí β-glukuronidázy, DR5::GUS (Ulmasov a kol., 1997b) nebo fluorescenčních proteinů jako např. DR5::GFP (Friml a kol., 2003). Byla též vyvinuta forma se zvýšenou citlivostí k auxinu, tzv. DR5v2 (Liao a kol., 2015).

Dalším hojně využívaným reportérem auxinové signalizace je DII-VENUS, který je sensorem TIR1/AFB-závislé degradace proteinů a představuje tzv. auxin input sensor. VENUS je rychle maturující forma YFP, která byla připojena k doméně II (DII) degradačního boxu represoru Aux/IAA a vzniklý genový konstrukt byl exprimován pod konstitutivním promotorem 35S (Brunoud a kol., 2012). V odpovědi na auxin pak dochází k rychlé degradaci DII-VENUS, která se projevuje pohasínáním fluorescenčního signálu, což umožňuje sledování dynamických změn v hladinách auxinu během různých vývojových procesů. Pro přesnější vyhodnocení signálu byla navíc vytvořena verze mDII-VENUS nesoucí mutaci v sekvenci domény DII, což vede k zablokování auxinem indukované degradace (Brunoud a kol., 2012). Signál mDII-VENUS tedy na rozdíl od DII-VENUS nepohasíná a ukazuje tak hladinu exprese v pozorovaných buňkách. Tyto dvě linie však neumožňují přesné porovnání hladin auxinu pro jednotlivé buňky v jedné rostlině a každé jednotlivé buňce, a proto byl vytvořen nový reportér zvaný R2D2. Ten kombinuje DII-n3xVenus a mDII-ntdTomato, oba exprimované pod RPS5A promotorem (Liao a kol., 2015). Vzhledem k tomu, že RPS5A je silně exprimován



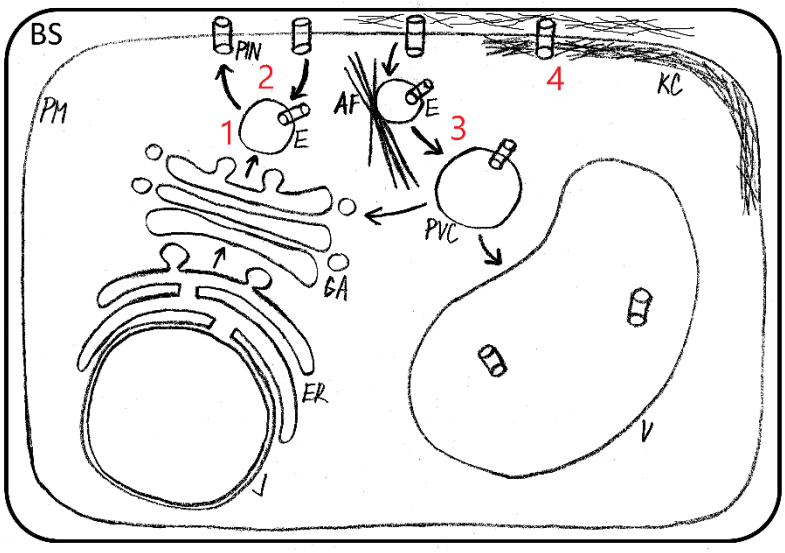
Obrázek 6: Reportéry pro vizualizaci auxinové signalizace. (a) Znázornění mechanismu fungování syntetického elementu DR5 v dráze auxinové signalizace. (b) Design reportéru DII-VENUS (NLS – jaderný lokalizační signál), převzato z (Brunoud a kol., 2012). (c) Design reportéru R2D2 (DHFR – dihydrofolát reduktáza, gen rezistence k methotrexátu), převzato z (Liao a kol., 2015).

především v aktivně se dělících buňkách (Weijers a kol., 2001), je reportér R2D2 vhodný spíše pro pozorování mladých částí rostlin s buňkami s dělivou aktivitou.

2.4 Role aktinového cytoskeletu v auxinovém transportu

Auxinové přenašeče jsou integrální membránové proteiny v buňce jsou tedy dopravovány pomocí membránových váčků putujících podél aktinových filament. Pohyb váčků po vláknech aktinu probíhá díky molekulárním motorům myozinům. Takto je pak zajištěn transport přenašečů do plazmatické membrány (Obrázek 7–1) a také tzv. cyklování váčků s přenašeči mezi PM a endozomálními kompartmenty, které zahrnuje procesy endocytózy a exocytózy (Geldner a kol., 2001; Geldner a kol., 2003; Dhonukshe a kol., 2007; Kleine-Vehn a Friml, 2008) (Obrázek 7-2). Aktinový cytoskelet se tedy podílí na umisťování přenašečů do PM, na jejich asymetrické distribuci v buňkách (Muday a kol., 2000; Kleine-Vehn a kol., 2006; Kleine-Vehn a kol., 2008a) a byla ukázána také účast v degradační dráze přenašečů (Kleine-Vehn a kol., 2008b) (Obrázek 7-3).

Vlákna aktinu spolu s mikrotubuly tvoří pod plazmatickou membránou síť tzv. kortikálního cytoskeletu, která má zřejmě vliv na pohyblivost auxinových přenašečů v membráně (Obrázek 7-4). Dokonce byla navržena role kortikálních mikrotubulů při polárním umisťování auxinových přenašečů do PM (Boutté a kol., 2006; Kleine-Vehn a kol., 2008a).



Obrázek 7: Schématické znázornění role aktinového cytoskeletu v životním cyklu auxinových přenašečů PIN. (1) Transport váčků s přenašeči do PM. (2) Cyklování váčků s přenašeči mezi PM a endozomálními kompartmenty. (3) Transport váčků s přenašeči v degradační dráze, případná recyklace přenašečů. (4) Správná lokalizace a udržování přenašečů v PM. Zkratky (zleva): BS - buněčná stěna, PM - plazmatická membrána, J - jádro, ER - endoplazmatické retikulum, GA - Golgiho aparát, E - endozom, PIN - přenašeč auxinu z buňky, AF - aktinová filamenta, PVC - prevakuolární kompartment, V - vakuola, KC - kortikální cytoskelet.

Důležitost aktinového cytoskeletu pro procesy spojené s transportem auxinu je studována pomocí cytoskeletálních drog jako je latrunkulin B a cytochalasin D, které způsobují narušení aktinové sítě (Spector a kol., 1989).

2.4.1 Transport váčků s přenašeči auxinu

Plazmatická membrána je velice dynamickou strukturou, jejíž složení se neustále mění na základě vnějších podnětů. Proteiny plazmatické membrány prochází tzv. metabolickým obratem (turnover), kdy dochází nejprve k jejich transportu do PM pomocí exocytózy a následně k jejich internalizaci pomocí endocytózy. Transport váčků do a z PM během interfáze probíhá podél aktinových filament a tuto dráhu využívají také přenašeče auxinu (Geldner a kol., 2001).

Přenašečové proteiny jsou do plazmatické membrány dopravovány pomocí exocytózy (Obrázek 7-1). Přenašečové proteiny PIN jsou umisťovány do tzv. polárních domén na PM, kde dochází k omezení jejich laterární pohyblivosti. Na okrajích těchto domén jsou pak proteiny uvolňovány a dochází k jejich internalizaci pomocí endocytózy závislé na obalovém proteinu klatrinu (Dhonukshe a kol., 2007; Kleine-Vehn a kol., 2011). Endocytóza v rostlinách zajišťuje internalizaci a případnou recyklaci složek plazmatické membrány. Dominantní dráha internalizace membránových proteinů je zprostředkovaná přes endocytózu zajištěnou právě klatrinem (Adamowski a kol., 2018) a tato dráha je zřejmě pro proteiny PIN hlavním způsobem jejich internalizace (Dhonukshe a kol., 2007).

Ačkoliv je toto stále předmětem debat, přenašeče PIN zřejmě procházejí procesem konstitutivního cyklování do a z PM prostřednictvím, tohoto procesu se účastní pochody závislé na aktinovém cytoskelet (Geldner a kol., 2001; Paciorek a kol., 2005; Dhonukshe a kol., 2007) (Obrázek 7-2). Endozomální váčkový transport je regulován pomocí membránově asociovaných GDP/GTP výměnných faktorů pro malé G proteiny ARF (ADP-ribosylační faktory), tzv. ARF-GEF (Steinmann a kol., 1999; Geldner a kol., 2003). Mezi tyto faktory patří protein GNOM, který hraje roli při pučení váčků a výběru jejich nákladu a zřejmě také reguluje strukturu a funkci endozomů. Aktivita GNOM je nutná pro pro váčkový transport přenašečů PIN (Steinmann a kol., 1999, Geldner a kol., 2003), díky své povaze však ovlivňuje řadu dalších procesů, včetně auxinové signalizace (Verna a kol., 2019).

Podobně jako u proteinů PIN, také intracelulární dynamika přenašečů AUX1 je závislá na aktinovém cytoskeletu (Kleine-Vehn a kol., 2006). Váčkový transport AUX1 se odlišuje od

transportu přenašečů PIN a zřejmě je regulován jiným druhem ARF-GEF (Kleine-Vehn a kol., 2006). Právě procesy intracelulárního dopravování proteinů mohou být důležitým místem zásahu regulačních drah a takto je následně ovlivněn auxinový transport. V tomto ohledu je důležité si uvědomit, že i auxin samotný může mít řadu účinků na procesy dopravování membránových váčků v buňkách. Původně byl jeho účinek popsán jako inhibiční na procesy endocytózy (Paciorek a kol., 2005), ale následné studie ukazují, že účinek auxinu na celý membránový systém buňky je potřeba chápat mnohem komplexněji. Může totiž zasahovat jak do procesů *de novo* biogeneze membránovách přenašečů (Jásik a kol., 2016), jeho účinek je značně závislý na typu auxinu a může účinkovat i na strukturu endozomů a TGN (Narasimhan a kol., 2021). Proto stále zůstává otázkou jak cíleně a jakým mechanismem je auxin zapojen do regulace umísťování jeho vlastních přenašečů (Schwechheimer a kol., 2021). Jednou z možností je i recentně objevený rychlý účinek IAA na specifickou fosforylaci molekul myosinu XI (Han a kol., 2021).

Přenašeče rodiny ABCB/PGP mají též specifické mechanismy jejich vnitrobuněčného transportu, ačkoliv tyto nejsou tak dobře prostudovány (Titapiwatanakun a kol., 2009; Cho a kol., 2012). Například přenašeč ABCB4 je v porovnání s proteiny PIN velice stabilní na PM. I jeho buněčný transport je pomalejší než u přenašečů PIN, ale bylo ukázáno, že je také závislý na aktinovém cytoskeletu (Cho a kol., 2012).

Pro degradaci auxinových přenašečů je využívána dráha cílená do lytické vakuoly přes prevakuolární kompartment (Obrázek 7-3). Signálem k degradaci mohou být různé vývojové či environmentální faktory, například gravitace nebo množství světla (Friml a kol., 2002; Laxmi a kol., 2008; Kleine-Vehn a kol., 2008b). Pokusy s aktinovou drogou latrunkulinem B ukázaly, že váčkový transport přenašeče PIN2 do lytické vakuoly je závislý na aktinovém cytoskeletu (Kleine-Vehn a kol., 2008c). Proteiny PIN2 určené k degradaci jsou nejprve vytříděny v endozomu pomocí specifického ARF-GEF, který se uplatňuje v degradační dráze směřující do lytické vakuoly přes prevakuolární kompartment (PVC) (Kleine-Vehn a kol., 2008c). Další třídění nákladu pak probíhá také v PVC. U rostlin byly identifikovány podjednotky tzv. retromerního komplexu, které se účastní třídění (Jaillais a kol., 2006; Kleine-Vehn a kol., 2008b) a tento komplex zřejmě hraje roli v návratu přenašečů PIN z PVC pravděpodobně do trans-Golgi sítě (TGN) (Kleine-Vehn a kol., 2008c) (Obrázek 7-3). Takovýto systém třídění pak umožňuje regulaci množství přenašečů auxinu a tím pádem i regulaci toku auxinu (Kleine-Vehn a kol., 2008c).

2.4.2 Umisťování auxinových přenašečů v plazmatické membráně

Již v rámci chemiosmotické hypotézy byla navržena důležitost lokalizace auxinových přenašečů pro polární auxinový transport (Rubery a Sheldrake, 1974). Proteiny PIN jsou v určitých buněčných typech polárně umisťovány na plazmatickou membránu a jejich správná lokalizace je zásadní pro směrování toku auxinu (Wisniewska a kol., 2006).

Během buněčného dělení jsou přenašeče PIN v časných fázích formování buněčné přepážky umístěny nejprve rovnoměrně mezi obě nově vznikající membrány a teprve následně je ustavena polarita s větším množstvím přenašeče jen na jedné dceřinné přepážce v procesu, který je závislý na sterolovém složení membrán (Men a kol., 2008). Jak bylo ukázáno v epidermálních kořenových buňkách pro PIN2, tento post-cytokinetický proces je zřejmě řízen vnitřním buněčným mechanismem zahrnujícím *de novo* biosyntézu a endocytózu, ale ne transcytózu přenašečových molekul (Glanc a kol., 2018). Ačkoliv byla závislost nastolení polární lokalizace auxinových výtokových přenašečů na aktinovém cytoskeletu navržena pro umisťování na bazální i apikální stranu buněk (Muday a kol., 2000; Kleine-Vehn a kol., 2008b), polarizace molekul PIN2 v kořenové epidermis je možná i v podmínkách, kdy je cytoskelet narušen cytoskeletálními drogami (Glanc a kol., 2019).

Jak bylo ukázáno v kořenové epidermis, v interfázových buňkách jsou přenašeče PIN cíleny do tzv. polárních domén na PM, kde dochází k omezení jejich laterální pohyblivosti částečně způsobené tvorbou shluků proteinů. Na okraji těchto domén pak dochází k internalizaci PIN pomocí endocytózy závislé na klatrinu (Kleine-Vehn a kol., 2011). Pro cyklování přenašečů PIN je potřebný ARF-GEF GNOM, a to obzvlášť pro bazální lokalizaci proteinu PIN1, která je zakládána již v průběhu embryogeneze (Steinmann a kol., 1999). Cílení PIN na apikální stranu PM je zřejmě zajišťováno odlišným ARF-GEF, což ukazuje na regulační funkci (Kleine-Vehn a kol., 2008b). Konstitutivní cyklování přenašečů PIN skrze různé regulační mechanismy tak může umožňovat rychlé změny v jejich polaritě při odpovědi na různé environmentální podněty (Friml a kol., 2002; Dhonukshe a kol., 2007; Kleine-Vehn a kol., 2008a).

Polární umisťování přenašeče AUX1 na plazmatickou membránu není zřejmě tolik závislé na mikrotubulech, ale zato ukazuje větší závislost na nepoškozeném aktinovém cytoskeletu než přenašeč PIN1 (Kleine-Vehn a kol., 2006). Přenašeč ABCB19 je v plazmatické membráně lokalizován převážně nepolárně a v porovnání s PIN a AUX1 je jeho umístění více stabilní, a dokonce má stabilizační vliv na přenašeč PIN1 při jejich společném výskytu

v mikrodoménách plazmatické membrány (Titapiwatanakun a kol., 2009; Yang a kol., 2013). Přenašeč ABCB4 je také stabilně umístěn v PM (Cho a kol., 2012).

Laterární pohyblivost auxinových přenašečů v plazmatické membráně mimo jiné částečně ovlivňují interakce s cytoskeletem (Obrázek 7-4). Největší omezení je však zřejmě způsobeno skrze interakce polárních domén proteinů se složkami buněčné stěny z důvodu jejich těsné blízkosti zapříčiněné turgorovým tlakem (Feraru a kol., 2011; Martinière a kol., 2012). Nejdůležitější je pro tyto interakce nejspíše celulóza, která má roli v regulaci buněčné polarity a také polarity přenašečů PIN (Feraru a kol., 2011).

2.4.3 Vliv narušení aktinového cytoskeletu

Váčky nesoucí auxinové přenašeče putují po „kolejích" tvořených aktinovými filamenty. Pro lokalizaci přenašečů a určování toku auxinu je tedy zásadní správná organizace aktinové sítě. V mnoha studiích byl zkoumán vliv narušení aktinového cytoskeletu na transport auxinu. Bylo ukázáno, že při nedostatku fosfátu v buňkách dochází ke změnám v síti aktinových vláken, což způsobuje redukci váčkového transportu s vlivem na polární lokalizaci přenašečů PIN v plazmatické membráně (Kumar a kol., 2015). Při pokusech s rostlinným alkaloidem narciklasinem došlo k narušení organizace aktinového cytoskeletu a také váčkového transportu přenašečů PIN a AUX1 (Hu a kol., 2015). Také bylo ukázáno, že neporušený aktinový cytoskelet je vyžadován pro lokalizaci PIN1 při tvorbě auxinové kanalizace pro vznik vaskulatury (Mazur a kol., 2020).

Roli aktinového cytoskeletu v auxinovém transportu dále podporují studie mutantů v podjednotkách aktin nukleačního komplexu ARP2/3. Narušení lokalizace proteinů PIN během gravitropické odpovědi u mutantů v ARP3 *(dis1-1) Arabidopsis thaliana* naznačuje možnou roli ARP2/3 komplexu v umísťování přenašečů PIN (Zou a kol., 2016). V rostlinách nesoucích mutace v několika podjednotkách tohoto komplexu byla též pozorována narušená lokalizace přenašečů PIN1 a PIN3 a také změny v množství auxinu v buňkách (García-González a kol., 2020). I jiná pozorování mutantů v komplexu ARP2/3 ukázala narušení auxinového transportu a také vliv na expresi přenašečů AUX1 (Pratap Sahi a kol., 2018).

Zdá se, že samotný auxin dokáže ovlivňovat svůj vlastní transport. Při uměle vyvolaném svazkování aktinových filament došlo k poruchám v dělení buněk a narušen byl také gravitropismus a transport auxinu. Přidáním auxinu pak byla obnovena normální organizace

aktinových vláken, což naznačuje, že auxin by mohl regulovat vlastní transport skrze ovlivňování reorganizace aktinu (Maisch a Nick, 2007; Nick a kol., 2009). Bylo navrženo, že transport auxinu skrze přenašeč AUX1 dokáže rychle spustit procesy vedoucí právě ke změnám v množství a reorganizaci aktinových filament (Arieti a Staiger, 2020), v tomto kontextu jsou též již výše zmíněná recentní data, ukazující rychlý účinek IAA na specifickou fosforylaci molekul myosinu XI (Han a kol., 2021). Dále se ukázalo, že auxin stimuluje expresi podjednotek ARPC3 a ARPC4 komplexu ARP2/3, což odkrývá další možný mechanismus regulace organizace aktinu (García-González a kol., 2020). Vedle účinku IAA na expresi vlastních přenašečů má auxin též vliv také na expresi genů pro aktin (Vieten a kol., 2005; Zhu a Geisler, 2015).

3 Materiál a metody

3.1 Rostlinný materiál

Pro veškerou práci byly použity rostliny *Arabidopsis thaliana*, ekotyp Columbia (Col-0), kromě linií nesoucích reportér R2D2, který byl vytvořen v ekotypu Columbia-Utrecht (Liao a kol., 2015). Markerové a mutantní linie použité v této práci jsou uvedené v tabulkách 1 a 2. Markerové linie nesoucí mutace v jednotlivých podjednotkách komplexu ARP2/3, které byly použity pro mikroskopické pozorování, jsou uvedené v tabulce 9, kapitola 3.8.

Tabulka 1: Seznam použitých markerových linií *Arabidopsis thaliana*.

Označení linie	**Zdroj**
pPIN3::PIN3:YFP	(Zádníková a kol., 2010)
pPIN4::PIN4:GFP	(Blilou a kol., 2005)
pPIN7::PIN7:GFP	(Blilou a kol., 2005)
pPIN7::PIN7:mRFP1	Sibu Simon, nepublikováno
pAUX1::AUX1:YFP	(Swarup a kol., 2004)
pPGP1::PGP1:GFP	(Mravec a kol., 2008)
pPGP19::PGP19:GFP	(Mravec a kol., 2008)
pGIIM/ RPS5A::mDII:ntdTomato-RPS5A::DII:n3Venus (R2D2)	(Liao a kol., 2015)
DII-Venus	(Brunoud a kol., 2012)
mDII-Venus	(Brunoud a kol., 2012)
WT ΔpH (apo-pHusion)	(Gjetting a kol., 2012)
PIP2-GFP	(Cutler a kol., 1999)

Tabulka 2: Seznam použitých mutantních linií *Arabidopsis thaliana*.

Označení mutantní linie	**Označení genu (lokus)**	**Zdroj**
arpc1a/arpc1b	AT2G30910, AT2G31300	CRISPR mutant (stop codon 56, Erica Bellinvia, 2018, nepublikováno)
arpc4	AT4G14147	SALK_013909.27.65
arpc5	AT4G01710	SALK_123936.41.55
act2-3	AT3G18780	SALK_048987.53.40
act3	AT3G53750	SALK_144260.48.95
act7	AT5G09810	SALK_131610C
act12	AT3G46520	SALK_125307C.36.95
myoXI3KO – XI-K/XI-1/XI-2	AT5G20490, AT1G17580, AT5G43900	(Peremyslov a kol., 2010)

3.2 Kultivace rostlin

Semena byla vždy před kultivací sterilizována třepáním v mikrozkumavce spolu s 1 ml 50% roztoku SAVA (Chlornan sodný 4,7g/100 ml H_2O) po dobu 10 minut. Pro zachování sterility

probíhala následující práce ve flowboxu (laminárním boxu). Roztok SAVA byl odpipetován a semena byla poté 4-5x propláchnuta sterilní destilovanou vodou. V mikrozkumavce byl nakonec ponechán 1 ml sterilní destilované vody.

Pro potřebu *in vitro* kultivace bylo nejprve připraveno médium *Arabidopsis* minimální (ARA min). Na přípravu 1 l média bylo použito: 2,2 g MS solí (Sigma M5519); 10 g sacharózy (Penta); 8 g agaru (Duchefa Biochemie); pH 5,7 (úprava pomocí KOH, případně HCl). Médium bylo následně sterilizováno v autoklávu (121 °C; 1,3 bar; 20 min) a poté bylo rozlito do čtvercových Petriho misek (120 x 120 mm). Připravená semena byla ihned po sterilizaci vyseta na misku, která byla nakonec uzavřena parafilmem a přenesena na 48 h do 4 °C pro dosažení stratifikace semen. Miska byla následně přenesena do kultivační místnosti určené pro kultivaci rostlin *in vitro* (teplota 23 °C; fotoperioda 16 h světlo, 8 hodin tma).

Pro potřebu výsevu na rašelinové pelety (Jiffy) byla připravená sterilizovaná semena ve zkumavce stratifikována v lednici při teplotě 4 °C po dobu minimálně dvou dnů. Jiffy byly před výsevem hydratovány v roztoku hnojiva Krystalon (1 g/l). Jiffy s nasetými semeny byly přeneseny do arasystému (www.arasystem.com) a umístěny do kultivační místnosti s teplotou 23 °C a fotoperiodou 16 h světlo, 8 h tma.

Semenáčky určené k selekci po křížení byly pěstovány nejprve *in vitro* a po selekci byly přeneseny jednotlivě na jiffy do arasystému. První hydratace rašelinových pelet probíhala jako výše. Celý tác byl překryt průsvitnou fólií a umístěn do kultivační místnosti (teplota 23 °C; fotoperioda 16 h světlo, 8 hodin tma). Fólie byla ponechána na tácu po dobu několika dnů, aby mladé semenáčky nevyschly z důvodu snížení vzdušné vlhkosti.

3.3 Příprava linií křížením

Rostliny určené pro křížení byly pěstovány v kultivační místnosti na rašelinových jiffách umístěných v arasystému. Pro křížení byly použity mladé čerstvě nakvetlé rostliny. Jako mateřské rostliny byli použiti zástupci od obou vzájemně křížených linií pro získání obou variant rodičovské kombinace.

Z květního stvolu mateřské rostliny byly nůžkami odstraněny vzniklé šešule, starší a otevřené květy. Dále byl pod stereolupou pomocí hodinářské pinzety odstraněn také vzrostný vrchol s nejmladšími poupaty. Zbylo 1-6 vhodných poupat, která byla zbavena kališních a korunních lístků a tyčinek. Rostliny s připravenými poupaty byly zajištěny pomocí špejle a přeneseny zpět do kultivační místnosti na dobu 2-3 dnů. Poté následovalo opylení zralých blizen pod stereolupou pomocí již otevřených květů otcovské rostliny s prasklými prašnými pouzdry.

Opylené rostliny byly řádně označeny popiskami, a nakonec opět navráceny do kultivační místnosti, dokud šešule nedozrály. Ještě zavřené zralé šešule byly opatrně sklizeny do mikrozkumavek, které byly ponechány otevřené na několik dnů, aby šešule plně vyschly.
Celkem bylo provedeno 5 časově na sobě nezávislých křížení. V případě, že nebylo z prvního křížení daných linií získáno dostatečné množství semen nebo nebyla získána semena z obou rodičovských kombinací, bylo v některých případech provedeno opětovné křížení těchto linií v pozdějším nezávislém termínu. Veškeré kombinace křížených linií jsou uvedené v kapitole 4.1 – Tabulka 11. Sloupec „počet vytvořených linií“ uvádí počty linií vzniklých z dané mateřské rostlin, v závorce je uveden počet linií přepěstovaných z různých semen F1 generace dané mateřské rostliny.

3.4 Selekce

Vysušená semena F1 generace byla vyseta a přepěstována do F2 generace. Semena F2 generace byla vyseta na médium (ARA min) a kultivována *in vitro* přibližně jeden týden, dokud se neobjevily první pravé listy. Následovala selekce semenáčků na požadované znaky. K selekci na mutace podjednotek komplexu ARP2/3 byla využita nejprve stereolupa, rozhodujícím znakem pro selekci byly tzv. distorted trichomy na prvním pravém listu. Poté následovala selekce na přítomnost požadovaného markeru, pro kterou byl použit fluorescenční mikroskop Olympus Provis AX 70. Vždy bylo vyselektováno pokud možno 6 semenáčků nesoucích oba znaky pro danou kombinaci rodičovských linií.

3.5 Genotypování

K ověření homozygotní povahy mutantních populací linií *act2* a *act7* evdených v laboratorní databázi bylo provedeno genotypování těchto rostlin. Genotypování mutantů *act2* a *act7* probíhalo zvlášť v různých termínech a za použití odlišných postupů. Byly vybrány mladé nakvétající rostliny. V případě mutantů *act2* byla genotypována pouze jedna rostlina. Jako kontrola byla použita vypůjčená izolovaná cDNA z WT rostliny (Judith García-González). V případě mutantů *act7* byly vybrány 3 rostliny vypěstované z původních semen uložených v laboratorní databázi a 2 rostliny následující generace z přepěstovaných semen. Dále byly jako kontrola vybrány 2 rostliny linie PIP2-GFP x *arpc5* (F1 generace), které byly k dispozici jako čerstvý materiál a neměly by obsahovat danou zjišťovanou mutaci.

3.5.1 Izolace DNA

Pro izolaci DNA z mutantní rostliny *act2* byly nejprve připraveny dvě zkumavky, každá se zhruba osmi skleněnými kuličkami o průměru 1 mm. Do každé zkumavky bylo odebráno zhruba 0,03 g mladých listů z jedné rostliny a vzorky byly ponořeny do tekutého dusíku. Po zmražení byly zkumavky umístěny do vibračního mlýnku (Retsch MM 301) s frekvencí kmitu 30 Hz na dobu 5 minut. Do zkumavek bylo poté přidáno 400 µl extrakčního pufru (200mM Tris-HCl pH=7,5; 250mM NaCl; 25mM EDTA; 0,5% SDS) a celý obsah byl poté přepipetován do nových sterilních zkumavek. Pro následné kroky extrakce byl využit DNeasy Plant Mini Kit (cat. Nos. 69104 and 69106). Extrakce probíhala přesně podle návodu přiloženého v balení kromě kroku 2, kde nedošlo k přidání RNázy A, která nebyla v tomto případě potřeba. Kvalita vzorků byla nakonec ověřena ve spektrofotometru NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) a vzorky byly zamrazeny.

Pro izolaci DNA z mutantních rostlin *act7* a z rostlin sloužících jako kontrola (PIP2-GFP x *arpc5*) byly nejprve připraveny zkumavky, každá se zhruba osmi skleněnými kuličkami o průměru 1 mm. Z každé vybrané rostliny byl odebrán vždy jeden větší list o přibližné hmotnosti 0,02 g. Zkumavky se vzorky byly následně zmrazeny v tekutém dusíku a umístěny do vibračního mlýnku (Retsch MM 301) s frekvencí kmitu 30 Hz na dobu 5 minut. Do každé zkumavky bylo přidáno 400 µl extrakčního pufru (200mM Tris-HCl pH=7,5; 250mM NaCl; 25mM EDTA; 0,5% SDS) a dále také 400 µl chloroformu. Zkumavky byly poté umístěny na vortex (Vortex Genie 2 – Scientific Industries) na dobu 1 minuty a následovala centrifugace po dobu 3 minut při 16 100 g a teplotě 21 °C (Eppendorf 5415R Refrigerated Centrifuge). Zkumavky byly opatrně vyjmuty a umístěny do stojánku. Do nových zkumavek bylo přepipetováno vždy 400 µl horní fáze z každého vzorku. Dále bylo opět ke každému vzorku přidáno 400 µl chloroformu, protřepáno na vortexu a centrifugováno. Poté bylo odebráno 300 µl směsi opět do nových zkumavek. K extraktu bylo přidáno 300 µl isopropanolu a zkumavky byly k promíchání ručně několikrát otočeny. Následovala centrifugace na dobu 5 minut při 16 100 g a 21 °C. Veškerá tekutina byla odsáta pipetou a zkumavky byly při pokojové teplotě ponechány v obrácené orientaci 1 minutu, aby zbylá tekutina vytekla ven. Zkumavky pak byly umístěny do laboratorní vakuové sušárny s teplotou 37 °C na dobu 35 minut. Do vzorků bylo nakonec přidáno 50 µl vody a zkumavky byly opatrně proklepány. Následovala kontrola kvality vzorků ve spektrofotometru NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Vzorky byly uchovány v lednici.

3.5.2 PCR

Pro polymerázovou řetězovou reakci vzorků připravených ke genotypování byly využity primery uvedené v tabulce 3.

Tabulka 3: Sekvence primerů použitých pro zjištění přítomnosti T-DNA inzerce v PCR reakci.

act2	RP	5'- ACGACCTTAATCTTCATGCTG -3'
	LP	5'- GTGTGACAATGGTACCGGTAT -3'
act7	RP	5'- ATTCTTCTCGCTTCTGTCGAT -3'
	LP	5'- TCACCAGAATCGAGCACAATA -3'
Lbb1		5'- GCGTGGACCGCTTGCTGCACC -3'

V případě vzorků mutanta *act2* a příslušné kontroly byla nejprve namíchána společná směs pro dvě reakce podle tabulky 4 (sloupec mix). Jednotlivé složky byly přidány podle pořadí uvedeného v tabulce. Vzorky DNA byly přidány až nakonec do příslušných zkumavek.

Tabulka 4: Složení reakční směsi pro genotypování mutanta *act2*

Reakční směs [µl]	**WT**	***act2***	**mix**
H_2O	17,75	17,75	35,5
Pufr pro Dream Taq DNA polymerázu	2,5	2,5	5
dNTP (10 mM)	1	1	2
F LB	1	1	2
R RB	1	1	2
LBB	1	1	2
Dream Taq Polymeráza	0,25	0,25	0,5
DNA	0,5	0,5	-
Konečné množství	25	25	50 (49)

Polymerázová řetězová reakce byla poté provedena v termocycleru MJResearch PTC-200 podle protokolu uvedeného v tabulce 5.

Tabulka 5: Program PCR reakce, 26 cyklů

Počáteční denaturace (Initial denaturation)	94 °C	3 min
Denaturace	94 °C	30 s
Hybridizace (Annealing)	58 °C	1 min
Elongace (Extension)	72 °C	1 min
Konečná elongace (Final extension)	72 °C	10 min
Hold	4 °C	∞

V případě DNA izolované z mutantních rostlin *act7* a z rostlin sloužících jako kontrola byly namíchány dvě reakční směsi, každá na 8 reakcí, podle tabulky 8. Pro všechny vzorky získané DNA byly připraveny vždy 2 reakce, tj. „WT reakce" obsahující primery pro vznik kontrolních WT produktů, a „mutantní reakce" obsahující primery pro vznik produktů v případě přítomnosti mutace. Jednotlivé složky směsi byly přidány podle pořadí uvedeného v tabulce 7. Zásobní primery LP a RP byly před použitím nejprve zředěny vodou v poměru 1:9 (10 µl primeru a 90 µl vody). Pro každou reakci bylo odebráno 24 µl reakční směsi, a nakonec byl přidán 1 µl příslušné DNA.

Tabulka 6: Složení reakční směsi pro genotypování mutanta *act7*

Reakční směs [µl]	**WT mix**	***act7* mix**
H_2O	158	158
Pufr pro Dream Taq DNA polymerázu	20	20
dNTP (10 mM)	4	4
F LB	4	-
R RB	4	4
LBB	-	4
Dream Taq Polymeráza	2	2
DNA	8x1	8x1
Celkové množství	200	200

Polymerázová řetězová reakce byla poté provedena v termocycleru MJResearch PTC-200 podle protokolu uvedeného v tabulce 7. Velikosti očekávaných produktů vzniklých PCR reakcí jsou uvedeny v tabulce 8.

Tabulka 7: Program PCR reakce, 32 cyklů

Počáteční denaturace (Initial denaturation)	95 °C	10 min
Denaturace	95 °C	45 s
Hybridizace (Annealing)	57 °C	30 s
Elongace (Extension)	72 °C	2 min
Konečná elongace (Final extension)	72 °C	2 min
Hold	4 °C	∞

Tabulka 8: Velikosti produktů vzniklých v PCR reakci

act2	RP+LP: 1041 bp
	BP+LP: 820-1120 bp
act7	RP+LP: 988 bp
	BP+LP: 468-768 bp

3.5.3 Separace DNA pomocí elektroforézy

Pro elektroforézu byl použit předpřipravený 1,2% agarózový gel s 0,5x TBE pufrem (54 g Tris base; 27,5 g kyseliny borité; 20 ml 0,5M EDTA; destilovaná voda doplněná do objemu 1 l). Pro elektroforézu *act2* byly do každého PCR produktu přidány 3 µl 6x koncentrované DNA Loading Dye (Fermentas). Do připraveného gelu bylo poté přidáno 10 µl od každého obarveného vzorku. Dále byl použit jako marker 3 µl GeneRuler 100 bp (Fermentas). Separace vzorků probíhala 50 minut při napětí 80 V. V případě act7 byly do každého vzorku přidány 4 µl 6x koncentrované DNA Loading Dye (Fermentas) a vzorek jemně promíchán pipetou tak, aby nevznikly ve vzorku bublinky. Poté byly vzorky naneseny na gel tak, aby byla jamka vždy plná. Nakonec bylo přidáno 0,65 µl GeneRuler 100 bp a dále také 0,65 µl GeneRuler 1 kb (Fermentas). Separace vzorků probíhala při napětí 130 V po dobu 30 minut.

3.6 Narušení aktinového cytoskeletu pomocí latrunkulinu B

Pro narušení aktinového cytoskeletu byl použit latrunkulin B (koncentrace zásobního roztoku v DMSO 2,53 mM). Latrunkulin B byl přidán do sterilizovaného rozpuštěného média ARA min na výslednou koncentraci 1µM. Připravené médium bylo nalito do kulaté Petriho misky (průměr 100 mm), pro kontrolní linii byla připravena miska s ARA min médiem bez přídavků. Po ztuhnutí byla na médium ihned vyseta sterilizovaná semena. Misky byly přeneseny do lednice pro stratifikaci semen při teplotě 4 °C po dobu 2,5 dnů a následně přeneseny do *in vitro* kultivační místnosti (23 °C, fotoperioda 16 h světlo a 8 hodin tma).

3.7 Vizualizace membránového systému v pokožkových buňkách děložních listů pomocí FM4-64

Pro studium umístění auxinového přenašeče PIN3 v liniích pPIN3::PIN3:YFP a pPIN3::PIN3:YFP x *arpc5* byla sledována kolokalizace signálu fluorescenční barvy FM4-64 (Molecular Probes, T13320) a PIN3-YFP. Sterilizovaná semena byla ve flowboxu napipetována do 24jamkové kultivační destičky s 0,5 ml tekutého ARA min média (stejné jako ARA min, ale bez agaru) na jednu jamku, víčko bylo utěsněno parafilmem. Miska byla umístěna do lednice pro stratifikaci semen při 4 °C na dobu 2 dnů. Poté byla miska přenesena do *in vitro* kultivační místnosti (23 °C, fotoperioda 16 h světlo a 8 hodin tma) na horizontální

třepačku. Po 36 h kultivace bylo přidáno FM4-64 ve výsledné koncentraci 4µM (bylo přidáno 0,1 µl barvy do každé jamky obsahující 0,5 ml média). Miska byla překryta hliníkovou fólií (kvůli fotosenzitivitě barvy) a navrácena zpět do kultivační místnosti na třepačku, kde byla ponechána přes noc. Následující ráno byla provedena mikroskopie mladých semenáčků, tzn. po dvou dnech kultivace neboli 1 DAG.

3.8 Mikroskopie

Byly vybrány homogenní populace kříženců (uvedené v tabulce 13) a tyto použity pro mikroskopická pozorování (seznam v tabulce 9). Pro mikroskopii byly použity semenáčky staré 1-1,5 DAG kultivované *in vitro*. Jako kontrolní linie byly využity linie rostlin s fluorescenčně označenými proteiny. Dále byly pozorovány shodné linie rostlin zároveň nesoucí mutaci v jednom z genů pro podjednotky aktin nukleačního komplexu ARP2/3, a to pro podjednotky arpc4 nebo arpc5.

Tabulka 9: Linie kříženců použitých pro mikroskopická pozorování.

Markerová linie	Mutantní linie	Označení markerové linie nesoucí danou mutaci	Autor
pPIN3::PIN3:YFP	*arpc4*	I1	Kateřina Schwarzerová
	arpc5	H1, G1	Kateřina Schwarzerová
	arpc5	l.27	Innu Kotannal Baby
pPIN4::PIN4:GFP	*arpc4*	1-1, 2-1, 3-1	Innu Kotannal Baby
	arpc5	1-1, 2-1, 3-1	Innu Kotannal Baby
pPIN7::PIN7:GFP	*arpc4*	L1	Štěpánka Kebrlová
pAUX1::AUX1:YFP	*arpc4*	3-2	Judith García-González
	arpc4	l. 3-3, l. 3-4	Innu Kotannal Baby
	arpc5	A1, B1	Kateřina Schwarzerová
	arpc5	1-3	Judith García-González
pGIIM/ RPS5A::mDII:ntdTomato - RPS5A::DII: n3Venus (R2D2)	*arpc4*	L1-1, L1-2	Štěpánka Kebrlová
	arpc5	L1, L2	Štěpánka Kebrlová
DII-Venus	*arpc4*	L1, L2	Štěpánka Kebrlová
	arpc5	L2, L3	Štěpánka Kebrlová
mDII-Venus	*arpc4*	M1, M2	Štěpánka Kebrlová
	arpc5	M2, M3	Štěpánka Kebrlová

Pro pozorování byl využit konfokální mikroskop Zeiss LSM880. Celé semenáčky byly přeneseny z média do kapky destilované vody na podložní sklo a jednotlivě překryty krycím sklíčkem. Pro veškerá snímání byl použit objektiv C-Apochromat 63×/1.2 W Corr FCS. Snímání probíhalo pomocí softwaru ZEN black (CLSM acquisition, Zeiss). Pozorována byla adaxiální strana děložních listů semenáčků. Pro každou rostlinu byl pořízen 2x soubor řezů (Z-Stack) z jednoho děložního listu. Nastavení optické dráhy mikroskopu pro jednotlivé pozorované linie je uvedeno v tabulce 10.

Tabulka 10: Nastavení konfokálního mikroskopu pro pozorované linie.

Linie	Fluorescenční marker	Laser	Excitační vlnová délka	Nastavení emisních filtrů	Dělič svazků (beam splitter)
pPIN3::PIN3:YFP x *arpc4* / LatB	YFP	Argon	488 nm	499-552 nm	MBS: MBS 488 MBS_InVis: Plate
pPIN3::PIN3:YFP x *arpc5*	YFP	Argon	488 nm	499-552 nm	MBS: MBS 488 MBS_InVis: Plate
pPIN3::PIN3:YFP x *arpc5*	YFP FM4-64	Argon	488 nm	499-554 nm 579-686 nm	MBS: MBS 488 MBS_InVis: Plate
pAUX1::AUX1:YFP	YFP	Argon	488 nm	499-561 nm	MBS: MBS 488 MBS_InVis: Plate
pPIN4::PIN4:GFP pPIN7::PIN7:GFP	GFP	Argon	488 nm	499-552 nm	MBS: MBS 488 MBS_InVis: Plate
DII-Venus mDII-Venus	Venus	Argon	514 nm	526-553 nm	MBS: MBS 458/514
R2D2	mDII: ntdTomato DII: n3Venus	Argon; DPSS 561-10	514 nm 561 nm	526-552 nm 570-632 nm	MBS: MBS 458/514; MBS 488/561 MBS_inVis: MBS -405

3.9 Obrazová analýza

Pro analýzu všech snímků pořízených na konfokálním mikroskopu byl použit volně dostupný program Fiji (Schindelin a kol., 2012). Pro částečnou automatizaci a urychlení kvantifikace obrazované analýzy byla v rámci této práce vytvořena sada maker pro program Fiji a také sada skriptů pro program Python (Python 3.10, www.python.org). Veškerá dokumentace byla umístěna na server Github a je dostupná ke stažení na https://github.com/kebrles/auxin-analysis-fiji. Pro jednotlivé kroky analýzy byla zvlášť vytvořena makra, aby byla umožněna průběžná kontrola a zároveň také manuální vyřazení nežádoucích objektů (buněk či jader). Po změření byly všechny hodnoty pro každou fotografii automaticky zapsány do vlastního csv. souboru. Za použití skriptů v programu

Python pak byly jednotlivé csv. soubory pro každou linii daného pozorování zapsány dohromady do jednoho souboru s vytvořenou tabulkou obsahující pouze požadované hodnoty. Také byly automaticky vypočítány poměry hodnot („PM/vnitrobuněčný signál“ nebo „mDII:ntdTomato/DII:n3Venus“). Pro lepší orientaci v datech, a hlavně pro vytvoření kategorií buněk podle velikosti, byly použity kontingenční tabulky v programu Microsoft Excel.

Pro analýzu lokalizace auxinových přenašečů PIN3 a PIN7 byla nejprve ke každému Z-Stacku vytvořena maska v podobě kostry zvýrazňující jednotlivé buňky. V případě přenašeče PIN3 v kombinaci s mutací v podjednotce arpc5 byla celá analýza v programu provedena manuálně. Byly vybrány buňky vhodné pro analýzu a ty byly v ROI manageru zařazeny do jednotlivých řezů s největší ostrostí. Následovalo změření intenzity signálu v podobě „mean gray value“ nejprve pro oblast uvnitř dlaždicových buněk a poté pro oblast „pod čarou“ reprezentující plazmatickou membránu. Tloušťka měřené oblasti („čáry“) byla nastavena na 2 pixely. Nakonec byl v programu Microsoft Excel vytvořen také poměr obou naměřených hodnot („PM/vnitrobuněčný signál“). Pro všechny ostatní pozorované kombinace s přenašeči PIN3 a PIN7 byl použit stejný postup jako výše, který byl ale z většiny automatizován díky vytvořené sadě maker.

Pro analýzu lokalizace přenašeče PIN4 v kombinaci s mutací v podjednotce arpc4 byly nejprve buňky manuálně obtaženy pomocí nástroje Polygon selections a uloženy do ROI manageru. Následné kroky analýzy, shodné s postupem výše, byly provedeny opět pomocí připravené sady maker.

Analýza linií s markery DII-Venus, mDII-Venus a R2D2 proběhla za použití dalších vytvořených sad maker. V případě DII-Venus a mDII-Venus došlo k automatickému nalezení oblastí jednotlivých jader, zařazení jader do nejostřejšího řezu, a nakonec k naměření intenzity signálu jako „mean gray value“ celé oblasti jádra. Pro R2D2 došlo k automatickému nalezení jader v „červeném“ kanálu (mDII:ntdTomato), který měl vyšší intenzitu signálu. Stejné ROIe pak byly použity pro naměření hodnot v „zeleném“ kanálu (DII:n3Venus), který byl výrazně slabší. Pro linii R2D2 v kombinaci s mutací v podjednotce arpc4 byly dále manuálně obtaženy jednotlivé buňky, k nimž patřila vybraná jádra. Buňky byly označeny roztažením jednotlivých ROIů jader pomocí Selection Brush Tool, jako vodítko sloužily korespondující fotografie ze světelného kanálu. Následné měření hodnot proběhlo opět za pomoci vytvořených maker.

3.10 Grafické zpracování a statistické vyhodnocení dat

Výsledná data z obrazové analýzy byla zpracována pomocí volně dostupné webové aplikace PlotsOfData, dostupné na adrese: https://huygens.science.uva.nl/PlotsOfData/. Data byla nahrána v podobě souboru s formátem XLSX (Excel), uspořádána v tzv. širokém (wide) formátu v podobě tabulky, kde každý sloupec představuje jednu linii.

Pro sumarizaci a znázornění distribuce dat byl použit tzv. houslový graf (violin plot) s horizontální linií znázorňující medián. Pro statistické vyhodnocení dat byl použit 95CI (95 % confidence interval) znázorněný v grafu jako chybové úsečky (error bars). 95CI byl v aplikaci vypočítán automaticky pomocí metody bootstrapping (1000 vzorků) a určením 95CI z 2,5. a 97,5. percentilu (Wood, 2004). Hodnoty příslušné k daným grafům se dají sledovat v automaticky vytvořené tabulce. Když se 95CI dvou nezávislých skupin dat nepřekrývají, je to silný indikátor statistického rozdílu mezi těmito skupinami (Cumming a Finch, 2005).

4 Výsledky

4.1 Příprava linií pro mikroskopická pozorování

Pro účely této práce byly na začátku práce nejprve navrženy vyhovující kombinace markerových a mutantních linií rostlin *Arabidopsis thaliana*. Cílem bylo získat rostliny, které by umožnily mikroskopicky posoudit do jaké míry bude postižena lokalizace auxinových přenašečů v buňkách rostlin nesoucích mutace v podjednotkách ARP2/3. Tyto rostliny mají nápadně postižený vývoj tvaru pokožkových buněk děložních listů. Vybrány byly přenašeče s přirozenou expresí v těchto typech buněk a příslušné markerové linie nesoucí fluorescenční fúze těchto přenašečů pod jejich přirozenými promotory. Všechny markerové a mutantní linie byly k dispozici v laboratorní databázi semen, u některých kombinací bylo možné navázat na předchozí práci kolegyně Innu Kotannal Baby. Mým cílem bylo vytvořit chybějící kombinace linií pomocí křížení a pro mikroskopická pozorování připravit homozygotní linie F3 generace. Přehled těchto linií je uveden v tabulce 11 a jejich označení využité dále v práci v tabulce 12.

V průběhu práce byla také provedena křížení dalších, doplňkových linií, u kterých většinou nebyla plně dokončena selekce z časových důvodů. Veškeré kombinace nakřížených linií a dosažená úroveň jejich selekce jsou uvedeny v tabulce 13. Z aktinových mutantů byly pro práci vybrány linie *act2* a *act7*. K ověření homozygotní povahy mutantních populací těchto linií obdržených v minulosti z veřejné databáze a dále vedených v laboratorní databázi bylo provedeno genotypování rostlin použitých pro křížení. Bohužel se však ukázalo, že populace je štěpící, ačkoliv jsme předpokládali její homozygotní stav. Z důvodu časové náročnosti selekce pro přípravu homozygotních linií, byly přesto kříženci vytvořeni a rostliny prozatím ponechány ve stádiu F1 generace.

Tabulka 11: Přehled použitých linií. Linie, které již byly k dispozici, jsou označeny ✓. Nově vytvářené linie jsou označeny X.

Mutace	Fluorescenčně označené přenašeče				Markery auxinové signalizace		
	PIN3	PIN4	PIN7	AUX1	R2D2	DII-VENUS	mDII-VENUS
arpc1a/arpc1b	X	X	X	X	X	X	X
arpc4	✓	✓	X	✓	X	X	X
arpc5	✓	✓	X	✓	X	✓	X
act2	X	X	X	X	X	X	X
act7	X	X	X	X	X	X	X

Tabulka 12: Označení linií kříženců použitých pro mikroskopická pozorování

Mutace	Fluorescenčně označené přenašeče				Markery auxinové signalizace		
	PIN3	PIN4	PIN7	AUX1	R2D2	DII-VENUS	mDII-VENUS
arpc4	I1	1-1 2-1 3-1	L1	3-2 l. 3-3 l. 3-4	L1-1 L1-2	L1 L2	M1 M2
arpc5	H1 G1 l.27	1-1 2-1 3-1		A1 B1 1-3	L1 L2	L2 L3	M2 M3

Tabulka 13: Seznam vytvořených kříženců *Arabidopsis thaliana*

Markerová linie	Mutantní linie	Číslo křížení	Dosažená generace	Rodičovské kombinace (mateřská rostlina)	Počet vytvořených linií
pPIN3::PIN3:YFP	*arpc1a/arpc1b*	1	F3	♀ PIN3	1 (3)
				♀ *arpc1a/arpc1b*	1 (3)
		2	F2	♀ PIN3	2
				♀ *arpc1a/arpc1b*	2
	arpc4	1	F2	♀ PIN3	2
				♀ *arpc4*	2
	arpc5	1	F3	♀ PIN3	1 (2) + 1 (4)
	act2	1	F1	♀ PIN3	2
				♀ *act2*	2
	act3	1	F1	♀ PIN3	2
				♀ *act3*	1
	act7	1	F1	♀ PIN3	2
				♀ *act7*	1
	act12	1	F1	♀ PIN3	1
	myoXI3KO	1	F1	♀ PIN3	1
				♀ *myoXI3KO*	1
pPIN4::PIN4:GFP	*arpc1a/arpc1b*	1	F3	♀ PIN4	1 (2)
				♀ *arpc1a/arpc1b*	1 (2)
			F2	♀ PIN4	1
				♀ *arpc1a/arpc1b*	1
	act12	1	F1	♀ *act12*	2
pPIN7::PIN7:GFP	*arpc1a/arpc1b*	1	F3	♀ PIN7	1 (2)
				♀ *arpc1a/arpc1b*	1 (2)
			F2	♀ PIN7	1
			F1	♀ *arpc1a/arpc1b*	1
	arpc4	1	F3	♀ PIN7	1 (2)
		2	F2	♀ PIN7	1
				♀ *arpc4*	1
			F1	♀ PIN7	3
				♀ *arpc4*	2
	arpc5	1	F3	♀ *arpc5*	1 (2)
			F2	♀ PIN7	1
				♀ *arpc5*	1

		2	F2	♀ PIN7	2
				♀ *arpc5*	2
			F1	♀ PIN7	1
pPIN7::PIN7:mRFP1	*arpc1a/arpc1b*	1	F1	♀ PIN7	2
				♀ *arpc1a/arpc1b*	2
pAUX1::AUX1:YFP	*arpc1a/arpc1b*	1	F3	♀ *arpc1a/arpc1b*	1 (3) + 1 (3)
		2	F2	♀ AUX1	1
pPGP1::PGP1:GFP	*arpc5*	1	F3	♀ *arpc5*	1 (2)
pPGP19::PGP19:GFP	*arpc1a/arpc1b*	1	F2	♀ *arpc1a/arpc1b*	1
pGIIM/ RPS5A::mDII:ntdTomato - RPS5A::DII:n3Venus (R2D2)	*arpc1a/arpc1b*	1	F3	♀ R2D2	1
				♀ *arpc1a/arpc1b*	1 (2)
		2	F1	♀ *arpc1a/arpc1b*	3
	arpc4	1	F3	♀ R2D2	1 (3) + 1 (2)
		2	F1	♀ R2D2	4
				♀ *arpc4*	3
	arpc5	1	F3	♀ R2D2	1 (4) + 1
		2	F1	♀ *arpc5*	4
	act2	1	F1	♀ R2D2	2
				♀ *act2*	2
	act7	1	F1	♀ R2D2	2
				♀ *act7*	1
DII-Venus	*arpc1a/arpc1b*	1	F3	♀ DII-Venus	1 (2)
				♀ *arpc1a/arpc1b*	3
			F1	♀ *arpc1a/arpc1b*	1
	arpc4	1	F3	♀ DII-Venus	2
				♀ *arpc4*	2
			F1	♀ DII-Venus	1
				♀ *arpc4*	1
	arpc5	1	F3	♀ DII-Venus	2
				♀ *arpc5*	2
			F1	♀ DII-Venus	1
				♀ *arpc5*	2
mDII-Venus	*arpc1a/arpc1b*	1	F3	♀ mDII-Venus	1 (2)
				♀ *arpc1a/arpc1b*	1 (2)
			F2	♀ mDII-Venus	1
				♀ *arpc1a/arpc1b*	1
	arpc4	1	F3	♀ mDII-Venus	2
				♀ *arpc4*	2
			F1	♀ mDII-Venus	1
				♀ *arpc4*	1
	arpc5	1	F3	♀ *arpc5*	1 (2)
		2	F3	♀ mDII-Venus	1
				♀ *arpc5*	1 (2)
			F1	♀ *arpc5*	1
WT ΔpH (apo-pHusion)	*arpc5*	1	F2	♀ apo-pHusion	2 (3)

PIP2-GFP	*arpc1a/arpc1b*	1	F2	♀ PIP2	2
				♀ *arpc1a/arpc1b*	2
			F1	♀ PIP2	1
				♀ *arpc1a/arpc1b*	2
	arpc4	1	F2	♀ PIP2	2
				♀ *arpc4*	2
			F1	♀ PIP2	1
				♀ *arpc4*	1
	arpc5	1	F2	♀ PIP2	2
				♀ *arpc5*	2
			F1	♀ PIP2	1
				♀ *arpc5*	1

Množství použitých linií v jednotlivých pozorováních se liší vzhledem k dostupnosti v době pozorování. Jak je patrné z tabulky 12, u většiny linií se podařilo dokončit mikroskopická pozorování ve 3 nebo alespoň dvou nezávisle vzniklých kříženců, ve dvou případech jsem pracovala s populacemi rostlin pouze z jednoho křížení. Pro každou sadu kontrolní markerové linie s příslušnými liniemi nesoucími určitou mutaci bylo pozorování provedeno vždy minimálně ve třech biologických opakováních. Markerová linie přenašeče PIN3 v kombinaci s mutací *arpc5* byla pozorována v semenáčcích jeden den po vyklíčení (1 DAG). Ostatní linie byly poté pozorovány mezi 1 a 1,5 DAG, kdy je délka nadzemní části okolo 2 mm a dělohy nemají více než 0,5 mm (Obrázek 8).

Právě v časném stádiu vývoje děložních listů v období do 2 DAG dochází k důležitým krokům morfogeneze jako je zakládání laloků pokožkových buněk (Zhang a kol., 2011; Armour a kol., 2015; Wu a kol., 2016).

V této práci nevyužité linie, jejichž míra selekce je uvedena v tabulce 12, jsou k dispozici pro další využití členy naší laboratoře. Mohu vyzdvihnout například vytvořenou unikátní sadu linií nesoucích mutace v obou genech podjednotky ARPC1 aktin nukleačního komplexu ARP2/3 – *arpc1a/arpc1b* připravené právě v naší laboratoři (Erica Bellinvia, nepublikováno).

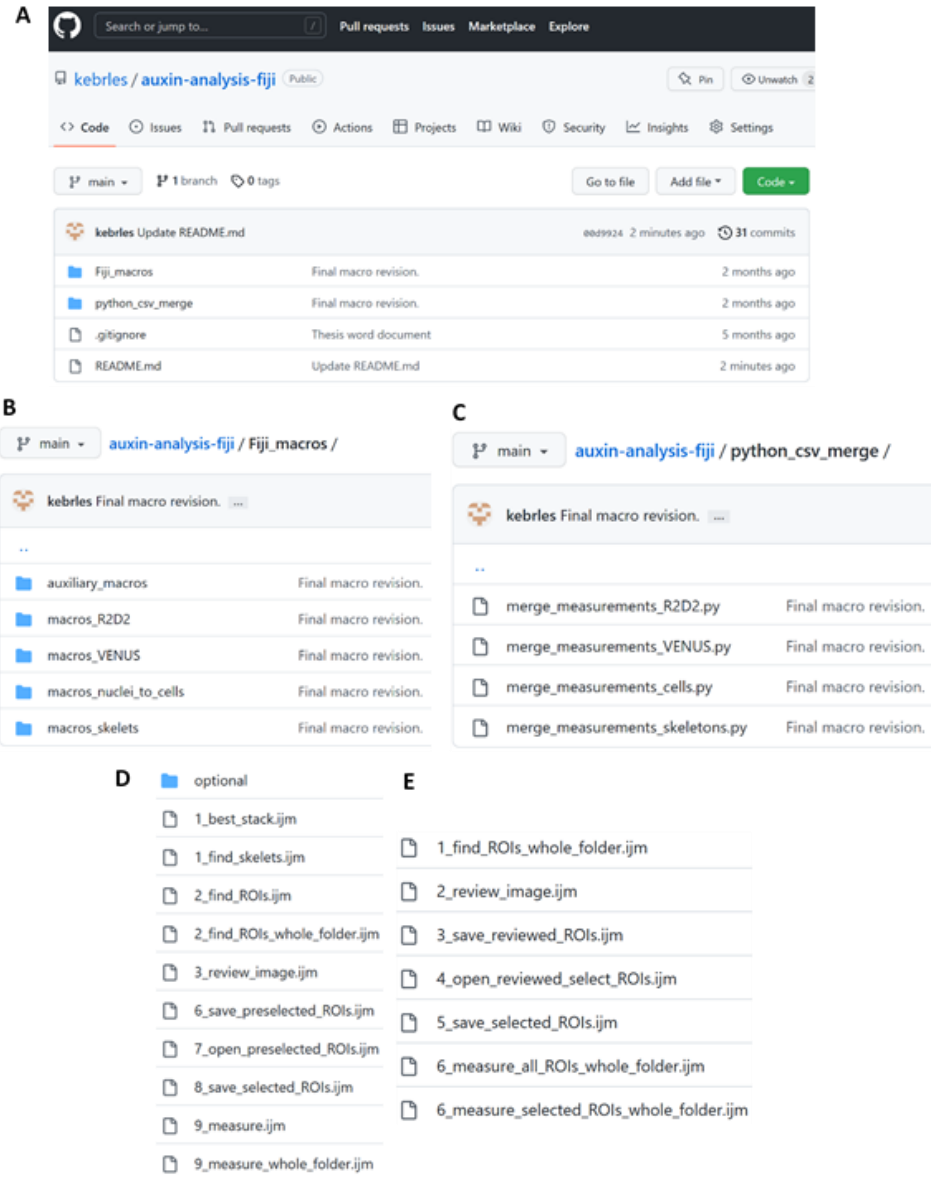
Obrázek 8: Rostlina *Arabidopsis thaliana* ve stáří 1,5 DAG. Takto velké rostliny byly využity v mikroskopii.

4.2 Zavedení kvantitativní metody vyhodnocení lokalizace auxinových přenašečů a auxinem řízené genové exprese pomocí obrazové analýzy

Hodnocení množství auxinových přenašečů či míry genové exprese řízené auxinem pomocí fluorescenčních reportérů je velice vhodné vzhledem k možnosti studovat dané procesy v živém materiálu. Výsledné snímky je však potřeba kvantitativně vyhodnotit a posoudit tak, jak signifikantně se daný znak odlišuje v kontrolních a mutovaných rostlinách. V průběhu své práce jsem tak pořídila u mladých semenáčků velké množství mikroskopických snímků, pro které bylo nutné zavést novou kvantitativní metodu vyhodnocení dat. Využila jsem postupy obrazové analýzy s cílem zautomatizovat co možno největší část postupu analýzy. Ke zjednodušení a zrychlení analýzy jsme vytvořila sadu maker pro použití ve volně dostupném programu Fiji a také sadu skriptů napsaných v programovacím jazyce Python. Veškerá dokumentace a makra byla umístěna do veřejně přístupného Git repozitáře (Obrázek 9A) dostupného na webové adrese: https://github.com/kebrles/auxin-analysis-fiji.

Vytvořená makra jsou rozdělena do příslušných složek (Obrázek 9B). Sada obsahuje pomocná makra „auxiliary_macros“, která jsou vyžadována pro funkci ostatních maker. Dále sada obsahuje makra pro analýzu auxinových gradientů, tj. „macros_R2D2“ a „macros_VENUS“, makra použitá při měření velikosti buněk v liniích R2D2, tj. „macros_nuclei_to_cells“, a makra pro analýzu lokalizace auxinových přenašečů v buňkách „macros_skelets“ (Obrázek 9B). Jednotlivé skripty k použití v programu Python slouží pro finální sjednocení uložených naměřených dat z jednotlivých mikroskopických snímků (Obrázek 9C).

Jednotlivá makra jsou očíslována podle pořadí jejich použití v průběhu procesu analýzy a pojmenování odpovídá funkci při jejich použití (Obrázek 9). Vzhled maker pro analýzu lokalizace auxinových přenašečů v buňkách, složka „macros_skelets“, je ukázán na Obrázku 9D, příklad sady maker pro analýzu linií R2D2, tj. složka „macros_R2D2“ je ukázán na Obrázku 9E. Bližší informace o postupu použití maker a skriptů jsou uvedené v souboru „README“ v online repozitáři.



Obrázek 9: Vytvořená makra a skripty uložené na veřejně přístupném serveru GitHub. (A) Vzhled repozitáře s uloženými složkami maker pro analýzu v programu Fiji **(B)** a s uloženými skripty pro použití v programu python **(C)**. Jednotlivá makra pro analýzu lokalizace auxinových přenašečů v buňkách **(D)**. Jednotlivá makra pro analýzu gradientů auxinu v liniích R2D2 (E).

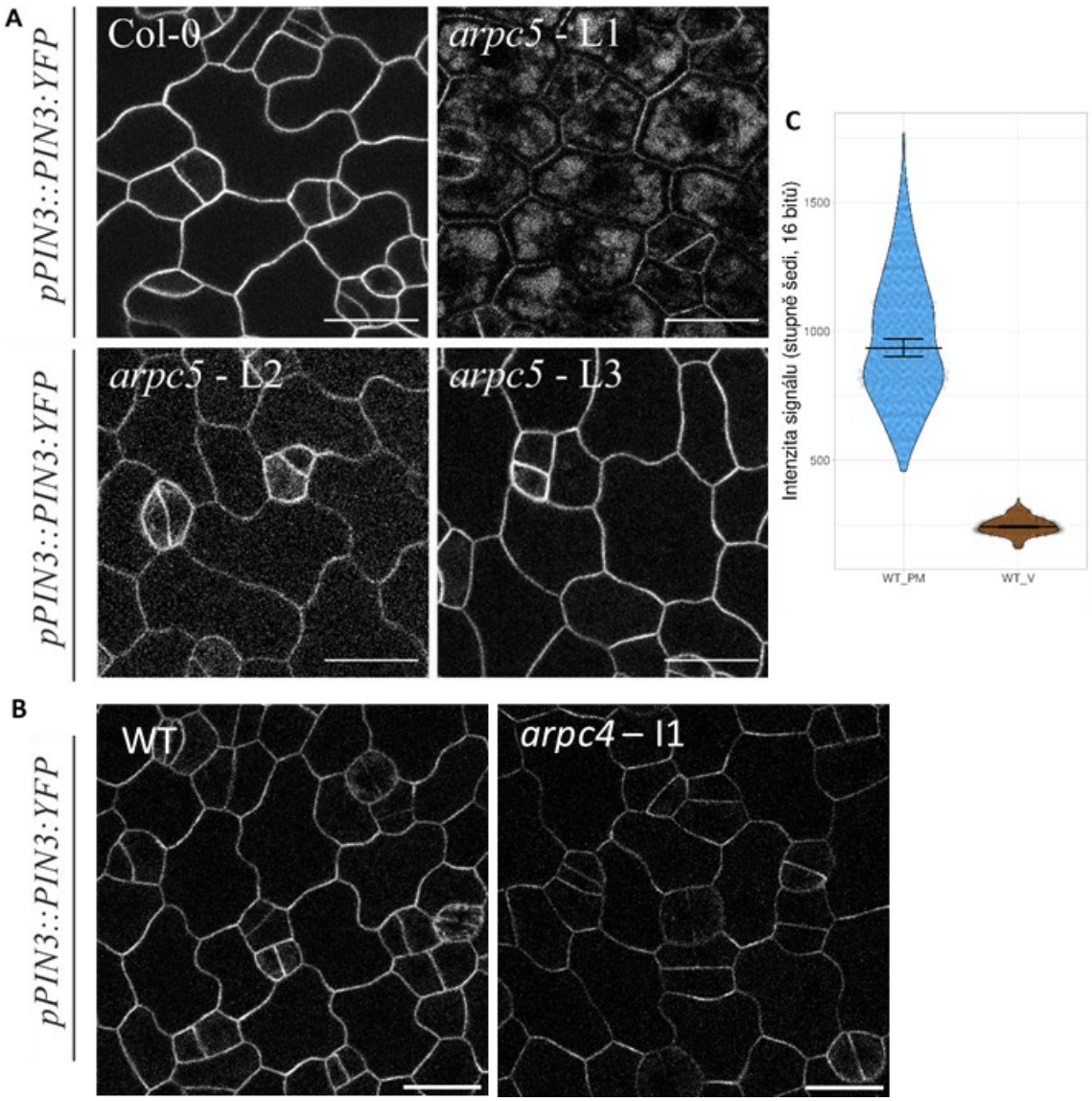
4.3 Analýza lokalizace auxinových přenašečů po narušení dynamiky aktinového cytoskeletu

V pokožkových buňkách děložních listů byla mikroskopicky pozorována lokalizace fluorescenčně označených auxinových přenašečů PIN3, PIN4, PIN7 a AUX1 po narušení aktinové dynamiky. Přítomnost těchto přenašečů v pokožkových buňkách děložních lístů *Arabidopsis thaliana* byla potvrzena již dříve (Belteton a kol., 2018; Grones a kol., 2020). Zkoumány byly linie nesoucí mutace v podjednotkách ARPC4 a ARPC5 aktin nukleačního

komplexu ARP2/3, jejichž označení je uvedeno v tabulce 10. U přenašeče PIN3 byl k porovnání zvolen také farmakologický přístup. Pro vyloučení malých buněk, patřících do stomatální linie, byla u PIN3/*arpc5* výsledná data omezena spodní velikostní hranicí rozsahu plochy 150 μm^2. Většina dat z testů linií PIN3/*arpc5* jsou součástí publikované práce, kde jsem spoluautorkou (García-González a kol., 2020). Pro pozorování dalších auxinových přenašečů bylo stanoveno rozmezí velikostí buněk na 200-900 μm^2, díky čemuž bylo možné i přesněji posuzovat výsledky mezi jednotlivými liniemi. Přesné stanovení velikostních kategorií buněk umožnilo se efektivně soustředit pouze na buňky epidermální linie, jejichž morfogeneze je primárně ovlivněna činností aktinového nukleačního komplexu ARP2/3.

4.3.1 Lokalizace PIN3 v pokožce děložních listů rostlin nesoucích mutace podjednotek komplexu ARP2/3

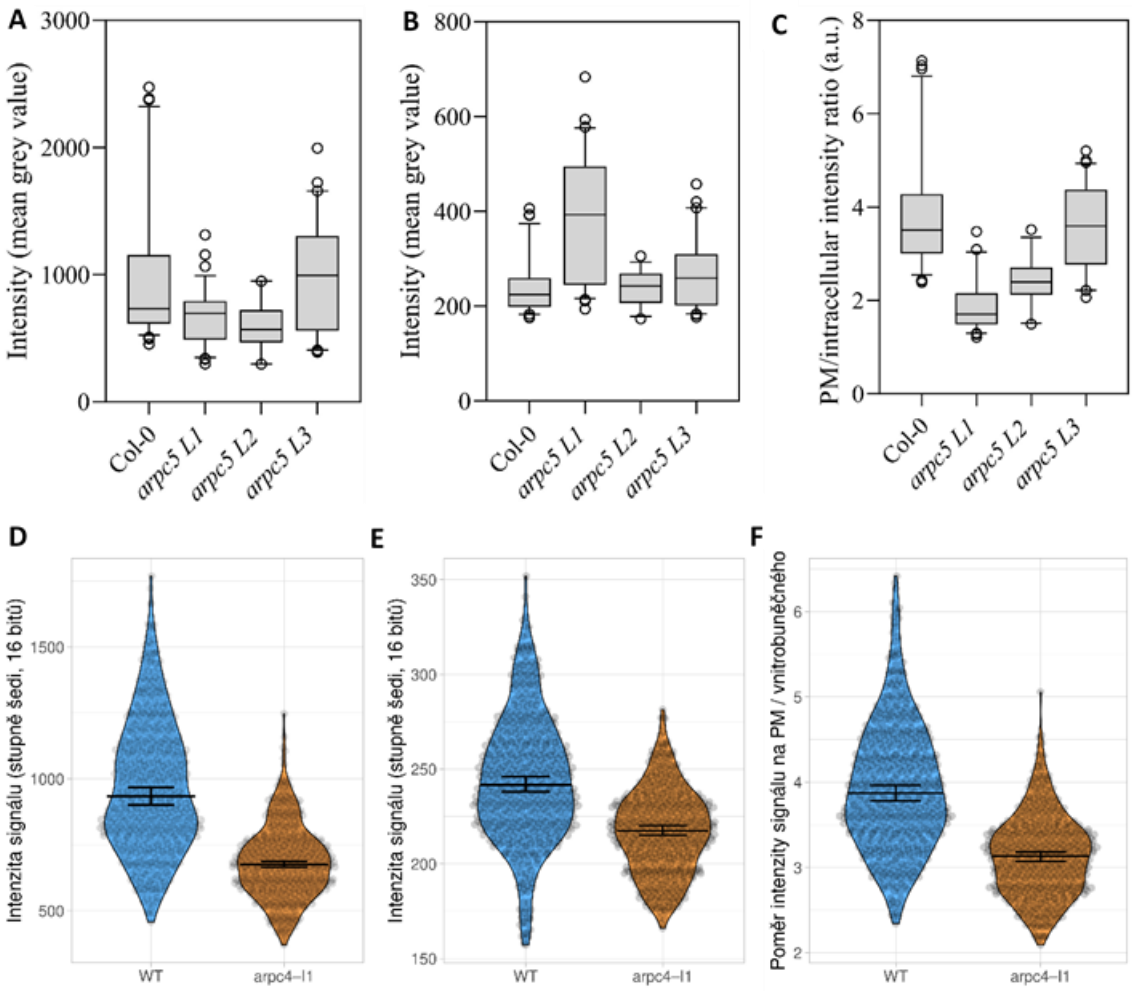
Lokalizace přenašeče PIN3 byla pozorována v jedné linii nesoucí mutaci *arpc4* a ve třech nezávislých liniích s mutací *arpc5*. U kontrolní linii PIN3::PIN3:GFP bylo jasně vidět, že přenašeče byly lokalizovány převážně na PM, což bylo potvrzeno i kvantifikací signálu na PM a uvnitř buněk (Obrázek 10). U mutantních linií pak byly vidět změny v lokalizaci přenašečů (Obrázek 10A, B) projevující se jako snížení signálu na PM a zvýšenou přítomností signálu ve vakuolách a dalších vnitrobuněčných kompartmentech.



Obrázek 10: Změna lokalizace PIN3 v pokožkových buňkách rostlin nesoucích mutace v podjednotkách komplexu ARP2/3. (A) Lokalizace PIN3::PIN3:YFP v mutantech *arpc5* (L1 - l.27; L2 – l.G1; L3 – l.H1), dle (García-González a kol., 2020). Měřítko = 20 µm. **(B)** Lokalizace PIN3::PIN3:YFP v linii *arpc4*. Měřítko = 20 µm. **(C)** Intenzita signálu na PM (WT_PM) a uvnitř buněk (WT_V) u kontrolní linie PIN3::PIN3:YFP, *n* = 531 (Bootstrapping, 95% interval spolehlivosti pro WT_PM = 898,96- 971,3, pro WT_V = 237,97-245,84).

Pozorování ukázalo, že rozsah vlivu mutace na lokalizaci přenašečů u jednotlivých linií kolísá a liší se distribuce přenašečů mezi PM a vnitrobuněčným prostorem (Obrázky 10A a 11A, B, C). Poměr intenzity signálu mezi PM a vnitrobuněčným prostorem byl u mutantních linií snížený (Obrázek 11C), což bylo zřejmě způsobeno snížením množství přenašečů PIN3 na PM (Obrázek 11A) a zvýšením jejich množství uvnitř buněk (Obrázek 11B). Tyto výsledky již byly publikovány (García-González a kol., 2020).

U linií pPIN3::PIN3:YFP x *arpc4* byl poměr hodnot také snížený (Obrázek 11F), lze ale pozorovat, že toto bylo dáno především poklesem množství přenašečů na PM (Obrázky 10B a 11D, E).

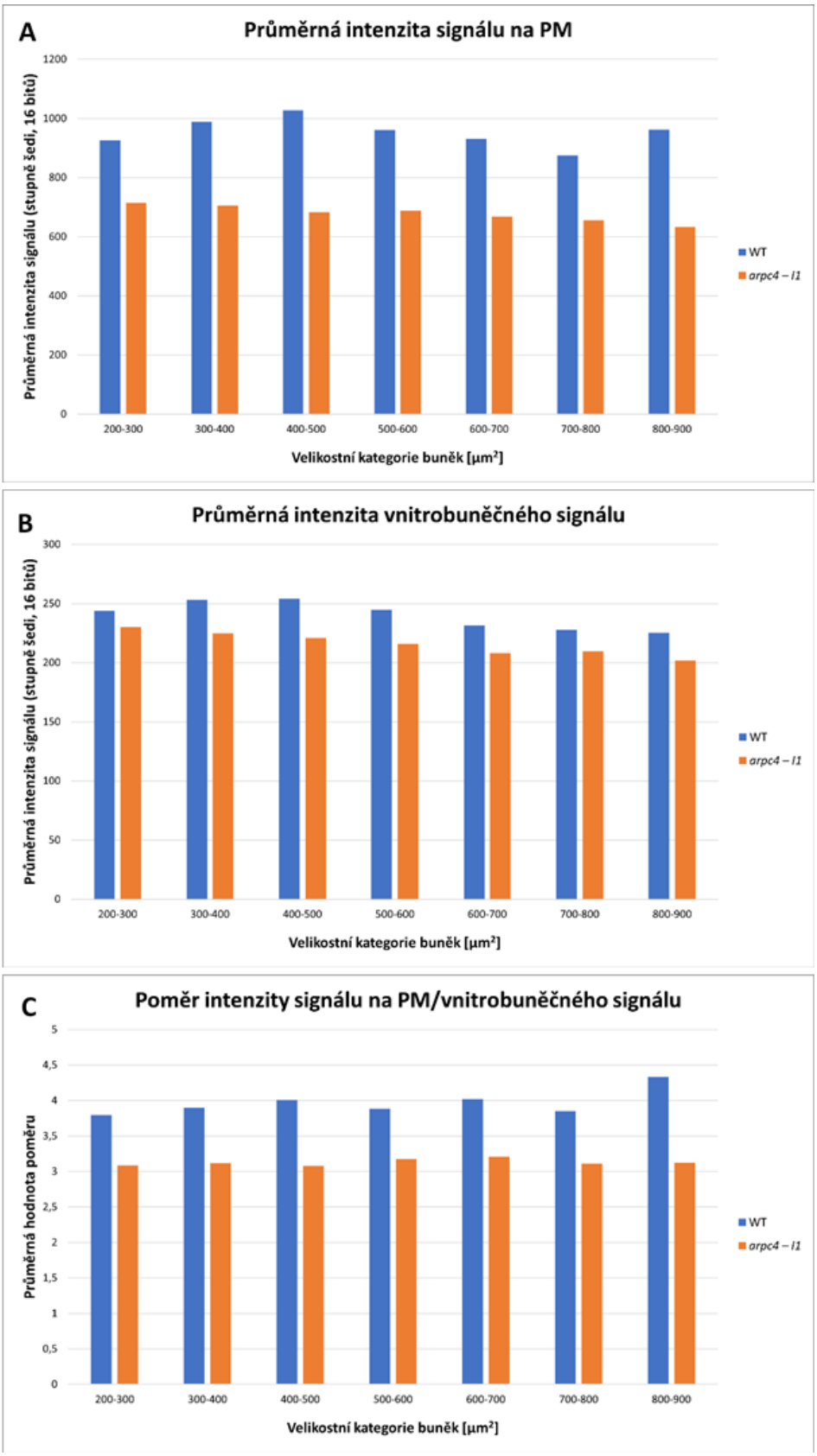


Obrázek 11: Kvantifikace změn v lokalizaci PIN3 v pokožkových buňkách rostlin nesoucích mutace v podjednotkách komplexu ARP2/3. (A-C) PIN3::PIN3:YFP v mutantech *arpc5* (L1 - l.27; L2 – l.G1; L3 – l.H1), dle (García-González a kol., 2020). Intenzita signálu na PM **(A)**, ve vnitrobuněčných oblastech **(B)** a poměr intenzity signálu na PM a vnitrobuněčného signálu **(C)**. *n* = 45-70 (Tukey, p < 0,001). **(D-F)** PIN3::PIN3:YFP v mutantu *arpc4* (l.1). *n* (WT) = 531; *n* (*arpc4*-l1) = 542 (Bootstrapping, 95% interval spolehlivosti, **(D)** WT = 901,07-967,53; *arpc4*-l1 = 665,27-687,12; **(E)** WT = 238,04-245,93; *arpc4*-l1 = 215,13-220,14; **(F)** WT = 3,78-3,96; *arpc4*-l1 = 0,07-3,18.

Dále mě zajímalo, zda se množství signálu PIN3:PIN3:YFP nějakým způsobem mění s velikostí buněk. Proto jsem provedla pro linii PIN3::PIN3:YFP v kombinaci s mutací *arpc4* rozdělení hodnot do kategorií podle velikosti příslušných buněk. Z výsledků vyplývá, že mutantní linie má ve všech velikostních kategoriích sníženou průměrnou intenzitu signálu jak na PM, tak

i uvnitř buněk (Obrázek 12). Hodnoty signálu na PM v případě kontrolní linie různě kolísají, zatímco u mutanta *arpc4* se téměř nemění (Obrázek 12A). Intenzita vnitrobuněčného signálu se v případě kontrolní i mutantní linie pohybuje podobně v závislosti na velikosti buněk (Obrázek 12B). A z porovnání poměru intenzity signálu na PM a vnitrobuněčného signálu vyplývá, že největší rozdíl mezi kontrolní a mutantní linií je pozorovatelný v poslední velikostní kategorii (Obrázek 12C).

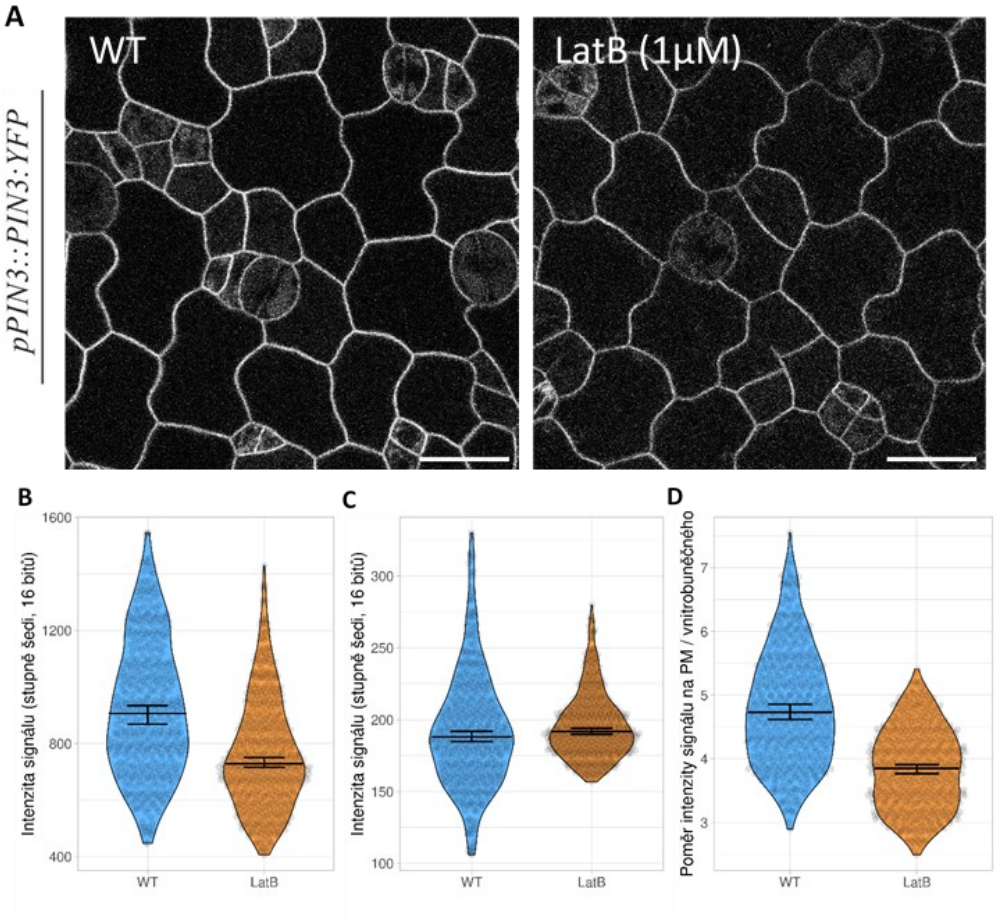
Z výsledků vyplývá, že obě mutace podjednotek komplexu ARP2/3, tj. *arpc4* i *arpc5*, mají za následek změny v lokalizaci přenašečů PIN3. Podrobná analýza přítomnosti PIN3 v jednotlivých velikostních kategoriích pokožkových buněk navíc naznačuje, že mutanty *arpc4* nejsou schopny během růstu buněk měnit množství auxinového přenašeče PIN4 na PM, jako je tomu u WT. Komplex ARP2/3 je tedy v časném stádiu vývoje děložních listů důležitý pro správnou lokalizaci přenašečů PIN3 do PM dlaždicových buněk.



Obrázek 12: Průměrná intenzita signálu PIN3::PIN3:YFP v jednotlivých velikostních kategoriích v pokožkových buňkách rostlin nesoucích mutaci v ARPC4-l.1. (A) PM **(A)**, vnitrobuněčné oblasti **(B)** a poměr intenzity signálu na PM a vnitrobuněčného signálu **(C)**.

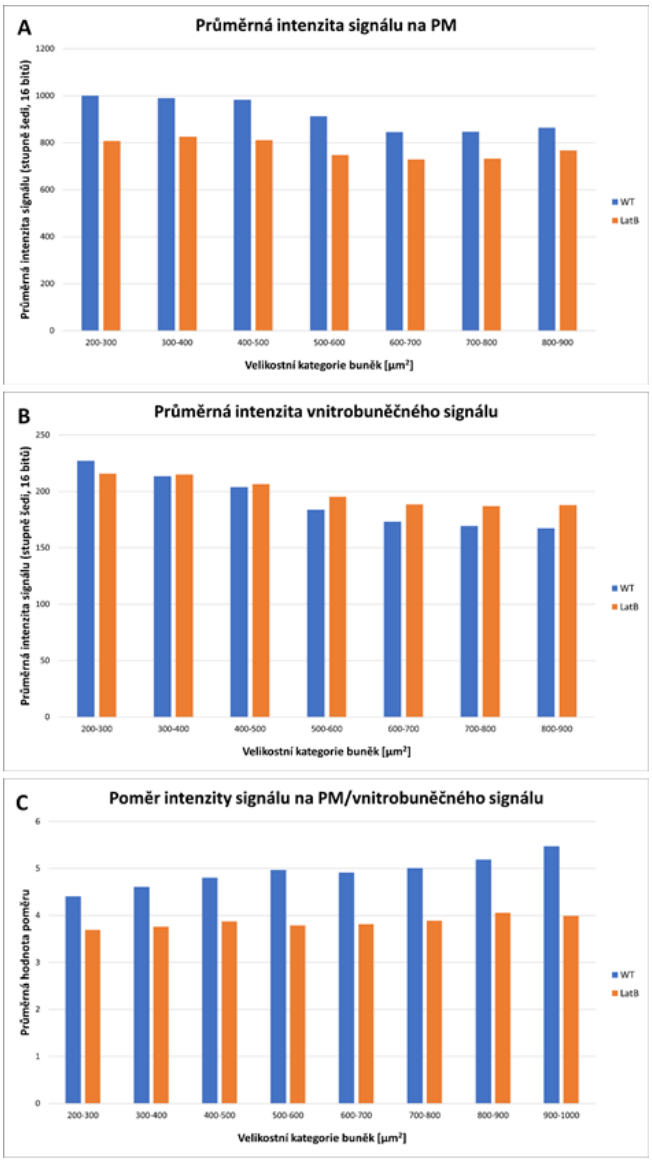
4.3.2 Lokalizace PIN3 v pokožce děložních listů rostlin po narušení aktinového cytoskeletu pomocí latrunkulinu B

Důležitost aktinového cytoskeletu pro správnou lokalizaci přenašečů PIN3 byla dále testována pomocí aplikace inhibitoru aktinové polymerace latrunkulinu B. Semena markerové linie pPIN3::PIN3:YFP byla vyseta přímo na médium obsahující 1 µM latrunkulin. Cílem bylo narušit dynamiku aktinového cytoskeletu a farmakologicky tak napodobit podmínky, které byly testovány v ARP2/3 mutantech.



Obrázek 13: Změna lokalizace PIN3 v pokožkových buňkách rostlin po narušení aktinového cytoskeletu latrunkulinem B. (A) Lokalizace PIN3::PIN3:YFP v kontrolní linii (vlevo) a po použití 1 µM latrunkulinu B (vpravo). Měřítko = 20 µm. **(B-D)** Kvantifikace změn v lokalizaci signálu. Intenzita signálu na PM **(B)**, ve vnitrobuněčných oblastech **(C)** a poměr intenzity signálu na PM a vnitrobuněčného signálu **(D)**. *n* (WT) = 422; *n* (LatB) = 549 (Bootstrapping, 95% interval spolehlivosti, **(B)** WT = 859,85-934,69; LatB = 715,38-749,45; **(C)** WT = 184,71-191,88; LatB = 189,86-194,41; **(D)** WT = 4,62-4,86; LatB = 3,74-3,9.

Mikroskopická pozorování provedená opět po 1,5 DAG ukázala, že poměr signálu PIN3::PIN3:YFP mezi PM a vnitrobuněčným prostorem je po použití latrunkulinu snížený (Obrázek 13D), což je jasně způsobeno sníženou přítomností na PM (Obrázek 13A, B), uvnitř buňky je oproti mutantům arpc5 a arpc4 signál nezměněn (Obrázek 13A, C).



Obrázek 14: Průměrná intenzita signálu PIN3::PIN3:YFP v jednotlivých velikostních kategoriích v pokožkových buňkách rostlin ošetřených latrunkulinem B (A) PM **(A)**, vnitrobuněčné oblasti **(B)** a poměr intenzity signálu na PM a vnitrobuněčného signálu **(C)**.

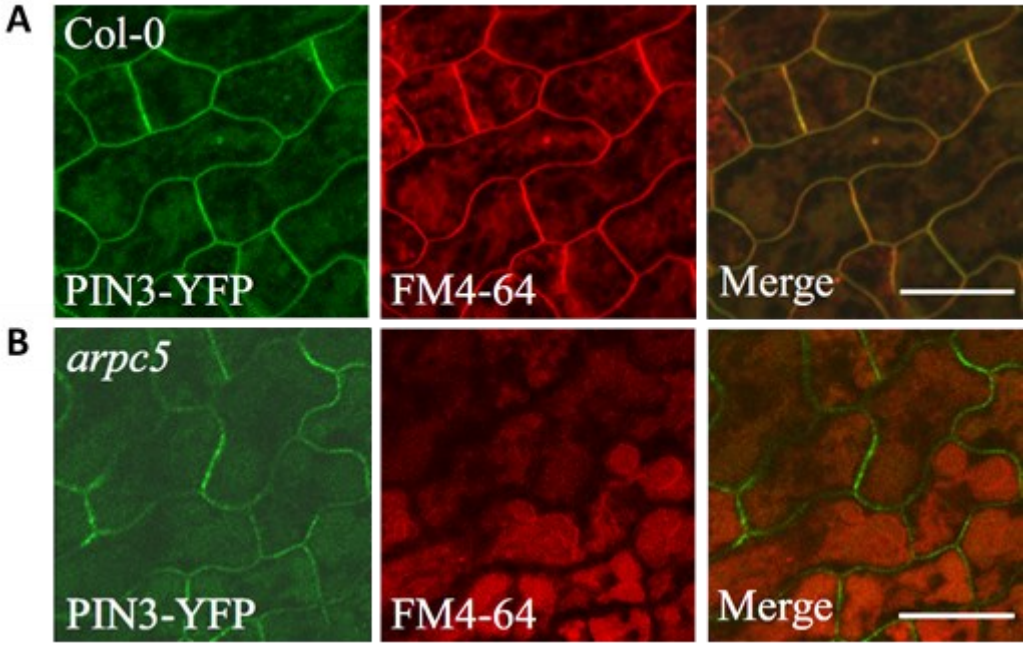
Rozdělení intenzit signálu do kategorií podle velikostí buněk ukázalo, že průměrná intenzita signálu PIN3::PIN3:YFP na PM s velikostí buněk kolísá a po použití latrunkulinu je intenzita oproti kontrole snížená ve všech velikostních kategoriích (Obrázek 14A). Průměrná intenzita vnitrobuněčného signálu se také s velikostí buněk snižuje, ale po použití latrunkulinu není snižování tolik výrazné (Obrázek 14B). Poměr mezi intenzitou signálu na PM a vnitrobuněčného signálu se tak s velikostí u kontrolní linie zvyšuje více než po použití latrunkulinu B (Obrázek 14C).

Narušení aktinového cytoskeletu latrunkulinem B tedy vedlo k velmi obdobnému projevu jako u *arpc5* mutantů, tj. snížené přítomnosti auxinových přenašečů PIN3 na PM a zvýšené

přítomnosti uvnitř buněk. Tyto výsledky tak podporují důležitost aktinového cytoskeletu pro správné umisťování přenašečů PIN3 na PM.

4.3.3 Charakterizace vnitrobuněčné lokalizace auxinových přenašečů pomocí FM 4-64

K identifikaci povahy lokalizace a umístění auxinových přenašečů s vnitrobuněčnou lokalizací v liniích pPIN3::PIN3:YFP byla použita styrylová barva FM 4-64, která je díky své povaze integrována do PM, endocytována a uvnitř buněk po delším čase (24h) označuje vakuolární systém. Z mikroskopického pozorování vyplynulo, že přenašeče PIN3 jsou uvnitř buňky lokalizovány do vakuoly (Obrázek 15), tato přítomnost je nápadnější u mutantů arpc5 (Obrázek 10). Tato část výsledků již byla také publikována (García-González a kol., 2020).

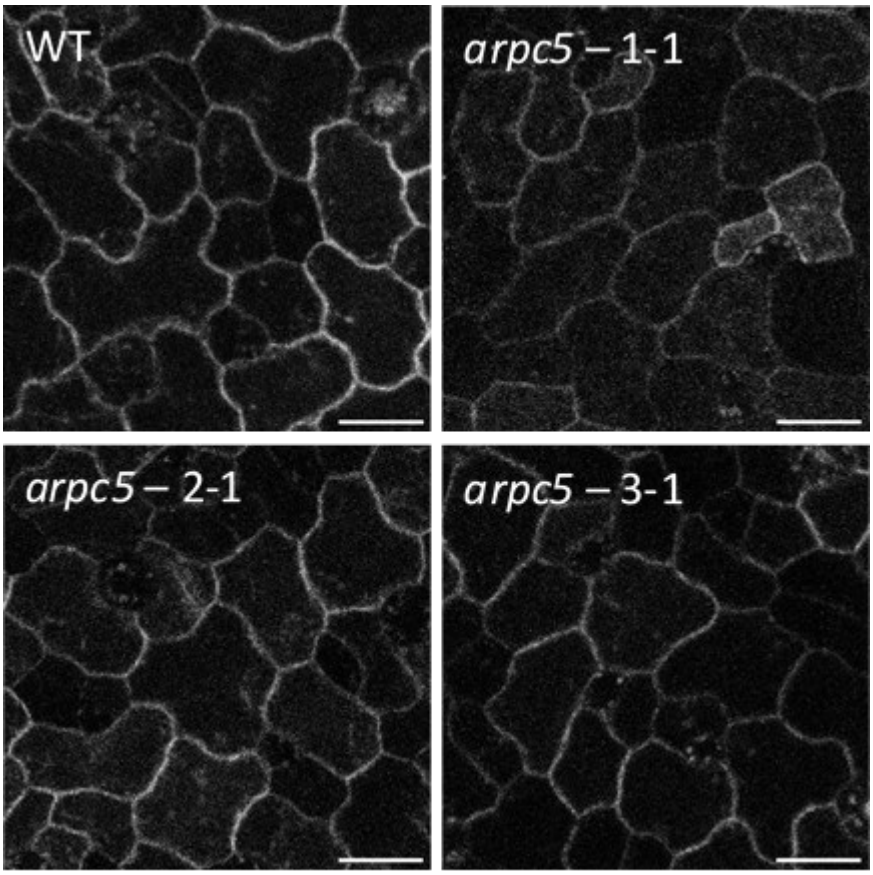


Obrázek 15: Vnitrobuněčná lokalizace PIN3::PIN3-YFP ve vakuole u kontrolní (A) a mutantní linie *arpc5* (B). Měřítko = 20 µm. Podle (García-González a kol., 2020)).

4.3.4 Lokalizace PIN4 v pokožce děložních listů rostlin nesoucích mutace podjednotek komplexu ARP2/3

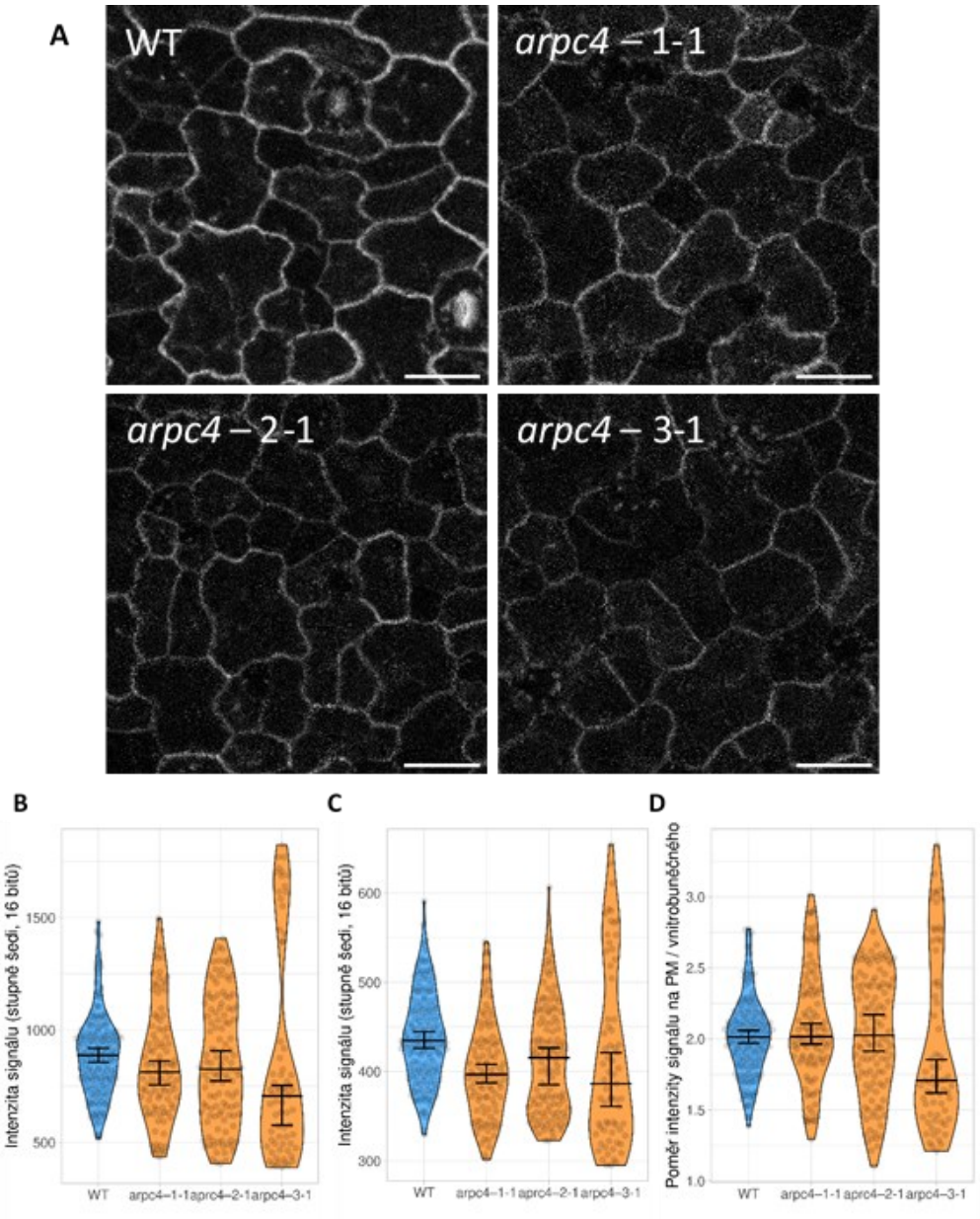
Lokalizace přenašeče PIN4 byla pozorována celkem u tří linií s mutací *arpc4* a u tří linií s mutací *arpc5*. Pro linie pPIN4::PIN4:GFP x *arpc5* bylo provedeno pozorování, obrazová analýza však nebyla z časových důvodů dokončena. Lokalizace PIN4 (Obrázky 16 a 17) byla v zásadě obdobná jako v případě PIN3, ačkoliv velice dramatické rozdíly v dynamice

přítomnosti PIN3 a PIN4 u kontrolních rostlin byly pozorovány v buňkách stomatální linie které ale nejsou předmětem této práce.



Obrázek 16: Lokalizace přenašečů v pokožkových buňkách rostlin nesoucích mutaci ARPC5 podjednotce komplexu ARP2/3. Reprezentativní snímky kontrolních rostlin (WT) a tří linií arpc5 l- 1-1, 2-1 a 3-1, měřítko = 20 µm.

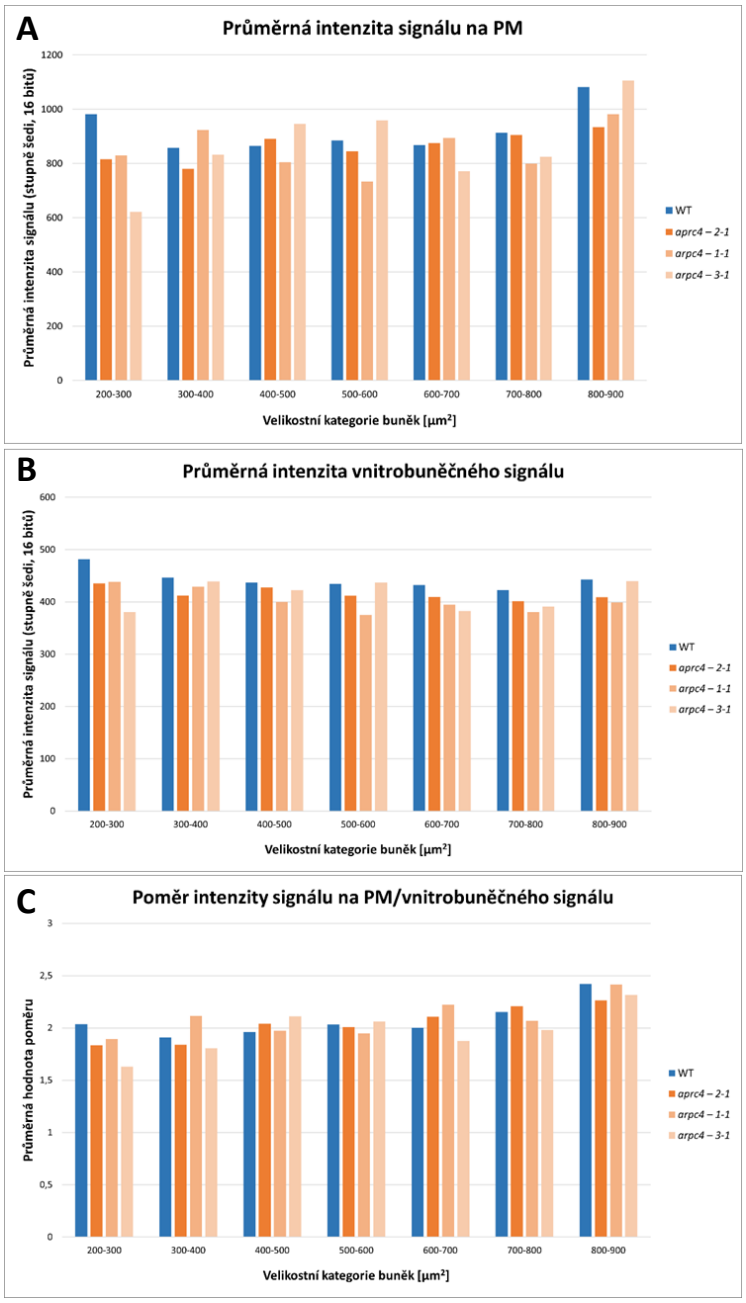
Pozorování distribuce pPIN4::PIN4:GFP x *arpc4* ukázalo, že rozsah vlivu mutace na lokalizaci přenašečů u jednotlivých linií kolísá (Obrázek 17) podobně, jako tomu je u linií pPIN3::PIN3:YFP x *arpc5* (viz Obrázek 10). Všechny linie včetně kontrolní měly signál PIN4-GFP na PM, ale též v intracelulárních oblastech, které u těchto mladých buněk mohou být i endomembránovým prostorem, ve kterém probíhá biogeneze auxinových přenašečů (Obrázek 17). Obrazová analýza ukázala, že snížení signálu na PM bylo signifikantně sníženo pouze v případě mutantní linie 3-1 (Obrázek 17B), stejně jako celkový poměr signálu mezi PM a vnitrobuněčným prostorem (Obrázek 17D). Avšak vnitrobuněčná lokalizace přenašečů byla signifikantně snížena u všech mutantních linií (Obrázek 17C).



Obrázek 17: Lokalizace přenašečů PIN4 v pokožkových buňkách rostlin nesoucích mutaci v v ARPC4 podjednotce komplexu ARP2/3. (A) Lokalizace PIN4:GFP v kontrolní linii a v mutantních liniích *arpc4* (linie 1-1, 2-1, 3-1). Měřítko = 20 µm. **(B-D)** Kvantifikace změn v lokalizaci signálu. Intenzita signálu na PM **(B)**, ve vnitrobuněčných oblastech **(C)** a poměr intenzity signálu na PM a vnitrobuněčného signálu **(D)**. *n* (WT) = 161; *n* (*arpc4* l. 1-1) = 104; *n* (*arpc4* l. 2-1) = 123; *n* (*arpc4* l. 3-1) = 69 (Bootstrapping, 95% interval spolehlivosti: **(B)** WT = 844,23-919,63; *arpc4* l. 1-1 = 755,9-858,12; *arpc4* l. 2-1 = 777,82-907,78; *arpc4* l. 3-1 = 576,26-753,07 **(C)** WT = 428,5-445,12; *arpc4* l. 1-1 = 385,64-408,36; *arpc4* l. 2-1 = 385,23-424,53; *arpc4* l. 3-1 = 360,87-421,13 **(D)** WT = 1,97-2,06; *arpc4* l. 1-1 = 1,96-2,12; *arpc4* l. 2-1 = 1,91-2,2; *arpc4* l. 3-1 = 1,63-1,85

Rozdělení výsledků do kategorií podle velikosti buněk ukázalo, že průměrná intenzita signálu PIN4:GFP na PM opět s velikostí buněk kolísá, a to u všech linií (Obrázek 18A). Průměrná intenzita vnitrobuněčného signálu se s velikostí buněk téměř nemění a u mutantních linií je téměř ve všech případech nižší než u linie kontrolní (Obrázek 18B). Poměr mezi intenzitou

signálu na PM a vnitrobuněčného signálu s velikostí buněk kolísá, ale celkově se spíše zvyšuje (Obrázek 18C).



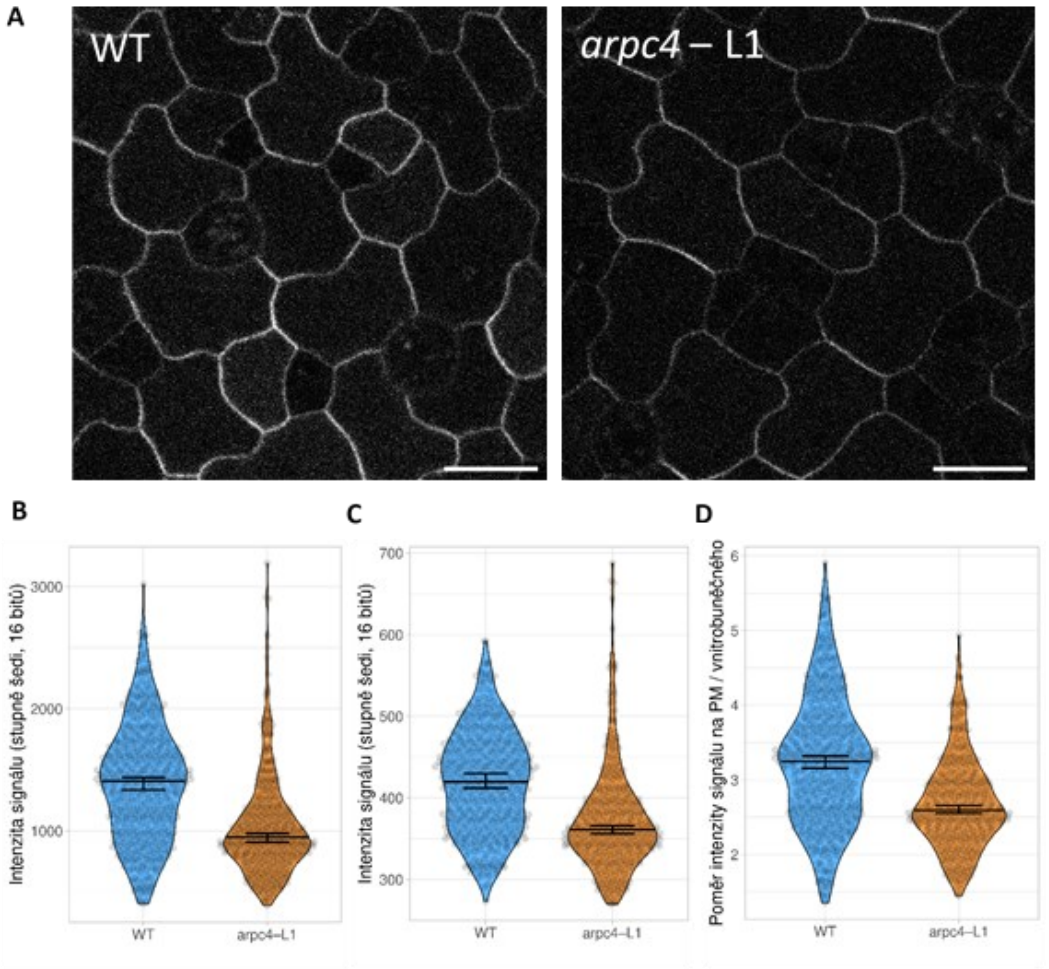
Obrázek 18: Průměrná intenzita signálu PIN4::PIN4:GFP v jednotlivých velikostních kategoriích v pokožkových buňkách rostlin nesoucích mutaci v ARPC4 – linie 1-1, 2-1, 3-1. PM **(A)**, vnitrobuněčné oblasti **(B)** a poměr intenzity signálu na PM a vnitrobuněčného signálu **(C)**.

Z výsledků vyplývá, že jednotlivé testované linie PIN4::PIN4:GFP nesoucí mutaci v ARPC4 vykazují celkem vysokou variabilitu v množství auxinového přenašeče PIN4 na PM pokožkových buněk děložních listů. Mutantní linie mají do různé míry sníženou lokalizaci přenašečů PIN4 na PM a signifikantně sníženou vnitrobuněčnou lokalizaci. Komplex ARP2/3

je tedy do určité míry důležitý pro správnou lokalizaci přenašečů PIN4 do PM pokožkových dlaždicových buněk.

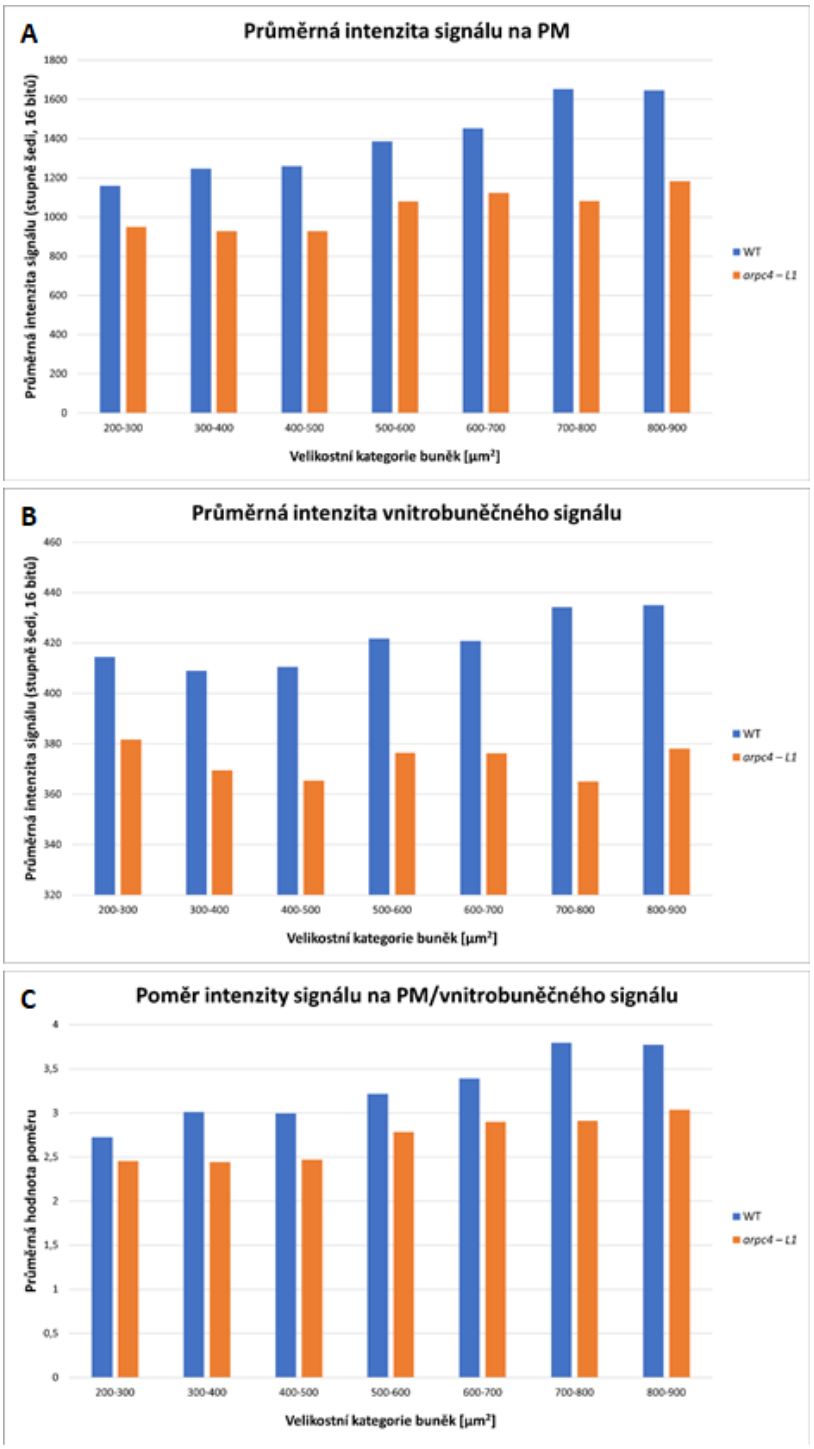
4.3.5 Lokalizace PIN7 v pokožce děložních listů rostlin nesoucích mutace podjednotek komplexu ARP2/3

Lokalizace přenašeče PIN7 byla pozorována pouze u jedné mutantní linie pPIN7::PIN7:GFP x *arpc4*. Mikroskopické pozorování ukázalo, že v mutantní linii je výrazně snížená hladina signálu PIN7::PIN7:GFP na PM (Obrázek 19A, B) i uvnitř buněk (Obrázek 19A, C). Poměr intenzity signálu mezi PM a vnitrobuněčným prostorem je v důsledku toho také výrazně snížený (Obrázek 19D).



Obrázek 19: Lokalizace PIN7 v pokožkových buňkách rostlin nesoucích mutaci v podjednotce ARPC4 komplexu ARP2/3. (A) Lokalizace PIN7::PIN7:GFP v kontrolní linii a mutantovi *arpc4* - L1. Měřítko = 20 µm. **(B-D)** Kvantifikace změn v lokalizaci signálu. Intenzita signálu na PM **(B)**, ve vnitrobuněčných oblastech **(C)** a poměr intenzity signálu na PM a vnitrobuněčného signálu **(D)**. *n* (WT) = 425; *n* (*arpc4* - L1) = 417 (Bootstrapping, 95% interval spolehlivosti: **(B)** WT = 1336,16-1438,07; *arpc4* - L1 = 912,66-984,61; **(C)** WT = 411,96-429,3; *arpc4* - L1 = 356,38-365,32; **(D)** WT = 3,15-3,32; *arpc4* - L1 = 2,55-2,66).

Rozdělení naměřených hodnot do kategorií podle velikosti buněk ukazuje, že mutantní linie má ve všech velikostních kategoriích sníženou průměrnou intenzitu signálu PIN7::PIN7:GFP jak na PM, tak i uvnitř buněk (Obrázek 20). Průměrná intenzita signálu na PM s velikostí buněk stoupá, a to ve zvýšené míře u kontrolní linie oproti mutantní (Obrázek 20A).



Obrázek 20: Průměrná intenzita signálu PIN7::PIN7:GFP v jednotlivých velikostních kategoriích v pokožkových buňkách rostlin nesoucích mutaci ARPC4, linie L-1. PM **(A)**, vnitrobuněčné oblasti **(B)** a poměr intenzity signálu na PM a vnitrobuněčného signálu **(C)**.

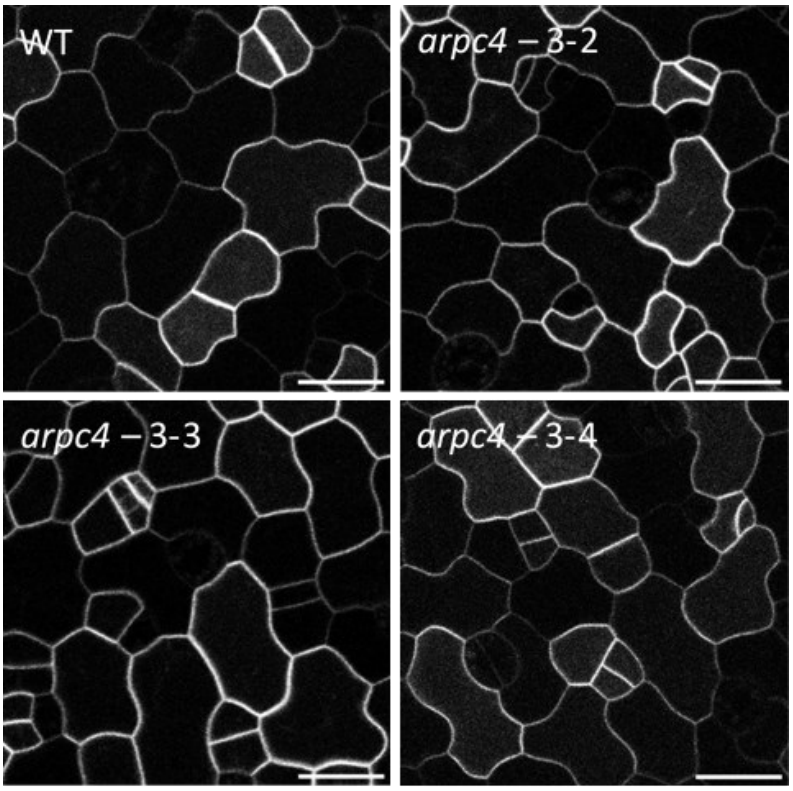
U kontrolní linie s velikostí buněk stoupá také průměrná intenzita vnitrobuněčného signálu, zatímco u mutanta pouze kolísá na stejné úrovni hodnot (Obrázek 20B). Celkový poměr hodnot se pak s velikostí buněk zvyšuje s tím, že největší rozdíl mezi kontrolní a mutantní linií lze pozorovat v posledních dvou velikostních kategoriích, kde dochází u mutanta k výraznému snížení intenzity signálu na PM i uvnitř buněk oproti kontrolní linii (Obrázek 19C).

Z výsledků vyplývá, že mutace v podjednotce ARPC4 komplexu ARP2/3 má výrazný vliv na lokalizaci přenašečů PIN7 v pokožkových buňkách. Zdá se, že ve větších buňkách (700-900 μm^2) je sníženo celkové množství přenašečů PIN7, tj. na PM i uvnitř buněk. Komplex ARP2/3 je tedy zřejmě důležitý pro správnou lokalizaci přenašečů PIN7 do PM dlaždicových buněk. Mutace v podjednotce ARPC4 má zřejmě za následek celkové snížení množství přenašečů PIN7 v dlaždicových buňkách.

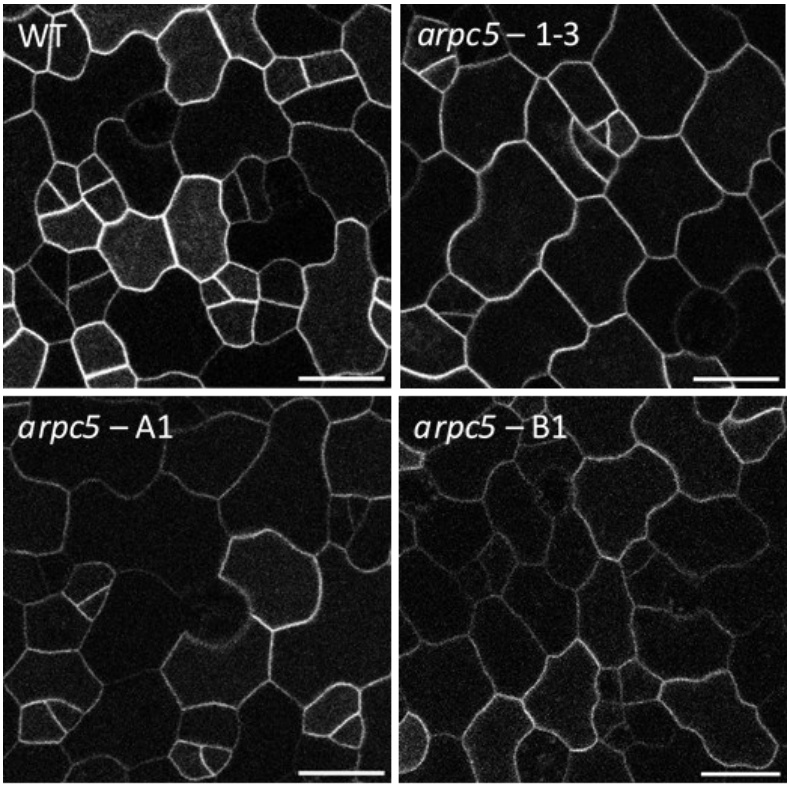
4.3.6 Lokalizace AUX1 v pokožce děložních listů rostlin nesoucích mutace podjednotek komplexu ARP2/3

Lokalizace přenašeče AUX1 byla mikroskopicky pozorována u tří linií pAUX1::AUX1:GFP x *arpc4* a tří linií pAUX1::AUX1:GFP x *arpc5*. Obrazová analýza všech těchto linií však nebyla z časových důvodů dokončena. U všech linií je patrná mozaikovitá lokalizace přenašečů v buňkách pokožky děložních listů (Obrázek 21; Obrázek 22). Z pozorování se zdá, že lokalizace přenašečů se v mutantech *arpc4* téměř nemění a nejvíce postižená se zdá být linie 3-4 (Obrázek 21). V případě mutantů *arpc5* je lokalizace přenašečů je v rostlinách více postižená než v případě *arpc4* a největší rozdíly lze pozorovat u linie B1 (Obrázek 22).

Z důvodu nedokončené analýzy dat však nelze vyvodit jednoznačné závěry. Z pozorování však vyplývá, že komplex ARP2/3 může být důležitý pro správnou lokalizaci přenašečů AUX1 na PM. Zdá se, že mutace v podjednotce ARPC5 způsobuje větší změny v lokalizaci AUX1 než mutace v podjednotce ARPC4.



Obrázek 21: Lokalizace přenašečů AUX1 v pokožkových buňkách rostlin nesoucích mutaci v podjednotce ARPC4 komplexu ARP2/3. Reprezentativní snímky kontrolních rostlin (WT) a tří linií *arpc4* l. 3-2, 3-3 a 3-4, měřítko = 20 µm.



Obrázek 22: Lokalizace přenašečů AUX1 v pokožkových buňkách rostlin nesoucích mutaci v podjednotce ARPC5 komplexu ARP2/3. Reprezentativní snímky kontrolních rostlin (WT) a tří linií *arpc5* l. 1-3, A1 a B1, měřítko = 20 µm.

4.3.7 Analýza genové exprese řízené auxinem v pokožce děložních listů rostlin nesoucích mutace podjednotek komplexu ARP2/3

U mutantů v podjednotkách komplexu ARP2/3 jsem pozorovala narušenou lokalizaci auxinových přenašečů v dlaždicových buňkách pokožky děložních listů *Arabidopsis thaliana*. To by mohlo mít vliv na hladiny auxinu v buňkách a tím pádem také na genovou expresi řízenou auxinem. V práci z naší laboratoře byly ukázány změny v míře odpovědi na auxin pomocí reportéru DII-VENUS u mutantní linie *arpc5* (García-González a kol., 2020). Mým cílem bylo provést hlubší analýzu genové exprese řízené auxinem a doplnit výsledky o hodnocení odezvy mutované verze markeru mDII-VENUS v kombinaci s mutacemi v podjednotkách ARPC4 a ARPC5 komplexu ARP2/3. Tento přístup umožňuje hodnotit míru genové exprese řízené auxinem, ale porovnání funkční a nefunkční verze markeru je nutné provádět v separátních liniích. Proto byly též připraveny kombinace mutantů s ratiometrickým reportérem R2D2, kde je DII a mDII přítomné v jedné rostlině.

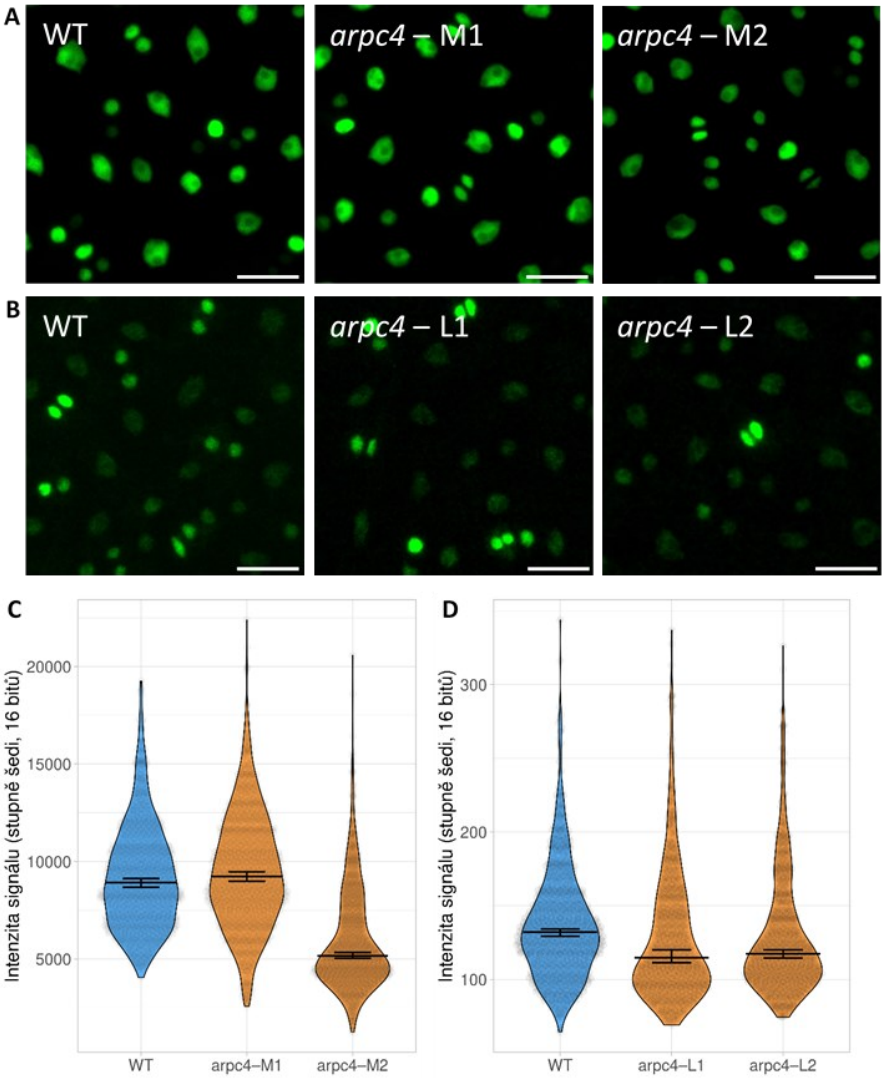
4.3.8 Míra auxinové signalizace v pokožce děložních listů rostlin nesoucích mutace podjednotek komplexu ARP2/3 hodnocená pomocí DII-VENUS a mDII-VENUS

Analýza míry odpovědi na auxin v dlaždicových buňkách pokožky děložních listů za použití markerů auxinové signalizace DII-VENUS a mDII-VENUS byla provedena pro mutantní linie *arpc4* i *arpc5*. Linie DII-VENUS přímo ukazují zvýšenou míru odpovědi na auxin prostřednictvím snížení fluorescenčního signálu, který je u těchto linií pod kontrolou silného 35S promotoru. Linie mDII-VENUS díky mutaci v sekvenci degradačního boxu nereagují na auxin a fluorescenční signál tak reprezentuje hladinu genové exprese řízené 35S v jednotlivých buňkách a může sloužit jako kontrola (Brunoud a kol., 2012).

Analýza markerových linií DII-VENUS ukázala, že v rostlinách nesoucích mutaci *arpc4* je oproti kontrolní linii snížená intenzita fluorescenčního signálu, což ukazuje na zvýšenou míru auxinem řízené genové exprese v pokožkových buňkách (Obrázek 23B, D). Zatímco v rostlinách s mutací *arpc5* je intenzita signálu naopak zvýšená (Obrázek 24B, D).

Analýza linií mDII-VENUS v kombinaci s mutací *arpc4* ukázala nejednoznačné výsledky (Obrázek 23C). Mutantní linie M1 má shodnou hladinu exprese jako kontrolní linie, zatímco

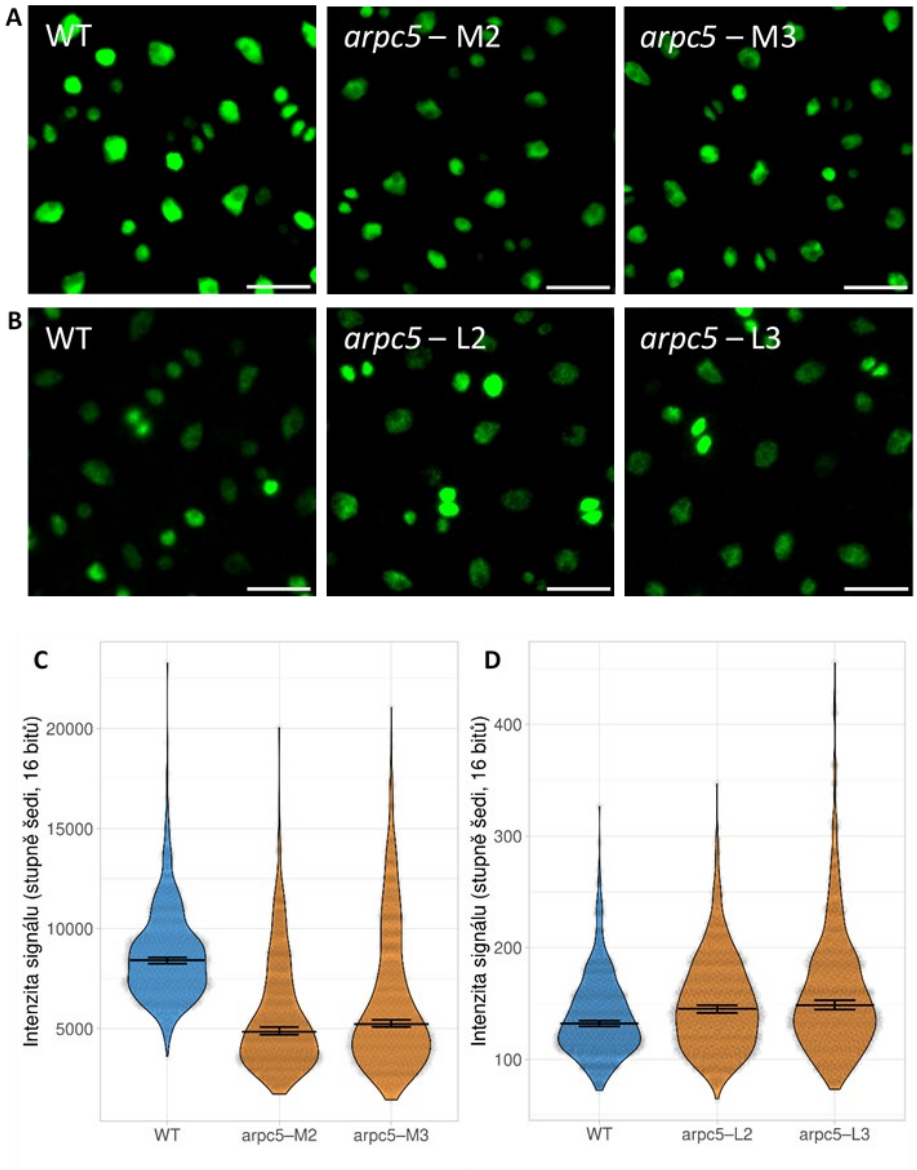
linie M2 má hladinu exprese výrazně sníženou (Obrázek 23A, C). V případě mutace *arpc5* ukazují sníženou hladinu exprese oproti kontrole obě mutantní linie (Obrázek 24A, C).



Obrázek 23: Analýza genové exprese řízené auxinem v pokožkových buňkách rostlin nesoucích mutaci v podjednotce ARPC4 komplexu ARP2/3. (A) Lokalizace mDII-VENUS v mutantech *arpc4*. Měřítko = 20 µm. **(B)** Lokalizace DII-VENUS v mutantech *arpc4*. Měřítko = 20 µm. **(C)** Intenzita jaderného signálu mDII-VENUS. *n* (WT) = 1015; *n* (*arpc4* – M1) = 976; *n* (*arpc4* – M2) = 888 (Bootstrapping, 95% interval spolehlivosti: WT = 8683,09-9132,35; *arpc4* – M1 = 8980,35-9460,95; *arpc4* – M2 = 5037,13-5339,52). **(D)** Intenzita jaderného signálu DII-VENUS. *n* (WT) = 822; *n* (*arpc4* – L1) = 622; *n* (*arpc4* – L2) = 651 (Bootstrapping, 95% interval spolehlivosti: WT = 129,15-134,13; *arpc4* – L1 = 111,26-119,96; *arpc4* – L1 = 114,4-119,95).

Z výsledků tedy vyplývá, že u *arpc4* mutantů je vzhledem k intenzitě signálu DII-VENUS zřejmě zvýšená míra odpovědi na auxin, což naznačuje na zvýšené hladiny auxinu v buňkách. U *arpc5* mutantů je tomu ale naopak, což je také v rozporu s předchozími výsledky práce

z naší laboratoře, viz (García-González a kol., 2020). Výsledky pozorování linií mDII-VENUS pak ukazují výrazně sníženou hladinu exprese v důsledku mutací v komplexu ARP2/3 u tří ze čtyř mutantních linií. Přímá interpretace hladiny signálu DII-VENUS u mutantních linií tak není spolehlivá a pozorování tedy ukázalo nejednoznačné výsledky.



Obrázek 24: Analýza genové exprese řízené auxinem v pokožkových buňkách rostlin nesoucích mutaci v podjednotce ARPC5 komplexu ARP2/3. (A) Lokalizace mDII-VENUS v mutantech *arpc5*. Měřítko = 20 µm. **(B)** Lokalizace DII-VENUS v mutantech *arpc5*. Měřítko = 20 µm. **(C)** Intenzita jaderného signálu mDII-VENUS. *n* (WT) = 946; *n* (*arpc5* – M2) = 866; *n* (*arpc5* – M3) = 901 (Bootstrapping, 95% interval spolehlivosti: WT = 8253,55-8551,16; *arpc5* – M2 = 4700,38-5072,85; *arpc5* – M3 = 5086,84-5441,76). **(D)** Intenzita jaderného signálu DII-VENUS. *n* (WT) = 758; *n* (*arpc5* – L2) = 844; *n* (*arpc5* – L3) = 846 (Bootstrapping, 95% interval spolehlivosti: WT = 129,4-134,79; *arpc5* – L2 = 141,62-148,29; *arpc5* – L3 = 144,51-152,78).

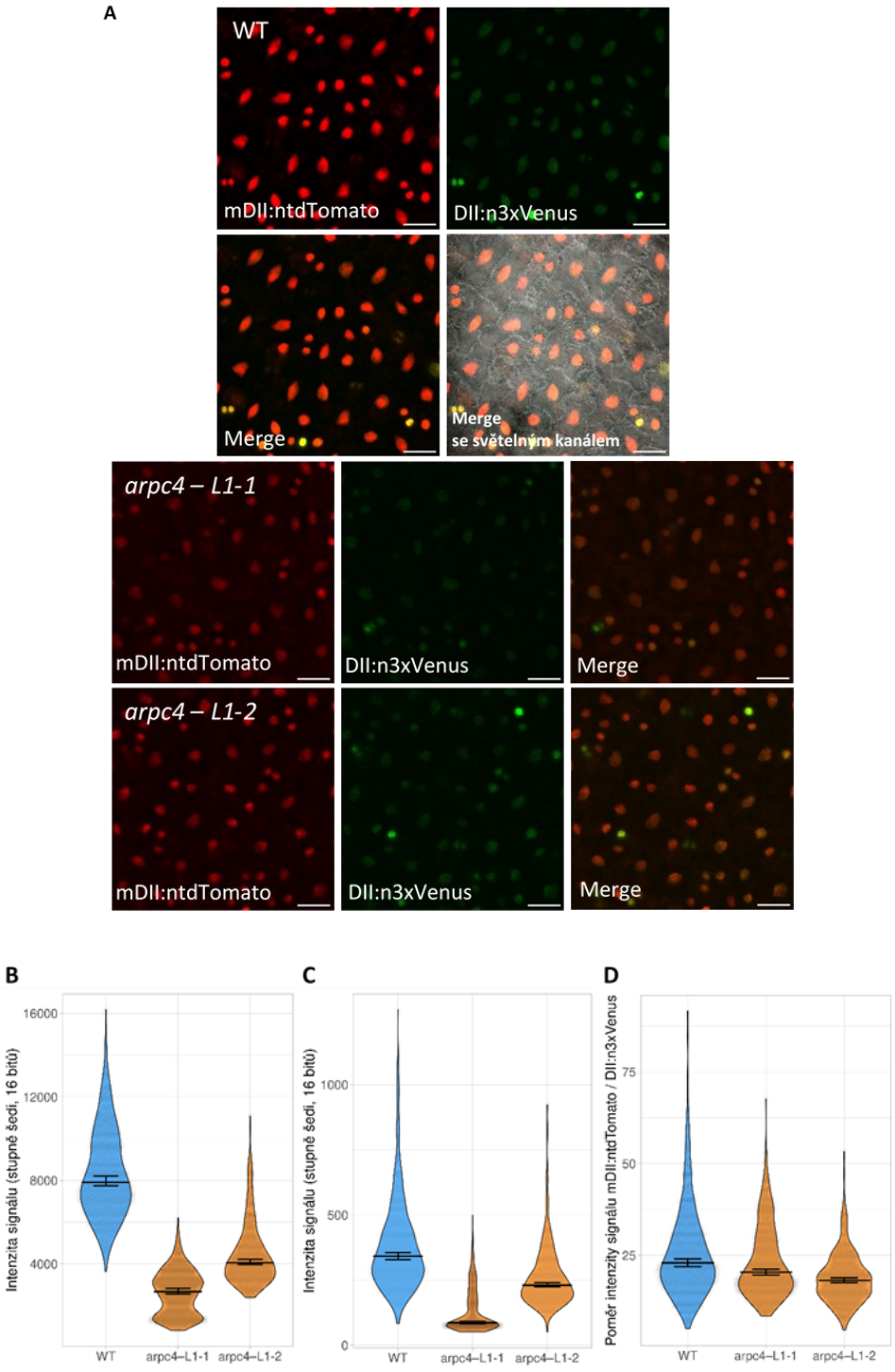
4.3.9 Míra auxinové signalizace v pokožce děložních listů rostlin nesoucích mutace podjednotek komplexu ARP2/3 hodnocená pomocí R2D2

Pro analýzu míry auxinové odpovědi v dlaždicových buňkách byl dále použit reportér R2D2 vnesený do rostlin s mutacemi *arpc4* a *arpc5*. Míra auxinem řízené genové exprese je pomocí reportéru R2D2 stanovena jako poměr (ratio) intenzit fluorescenčních signálů mDII-ntdTomato a DII-n3xVenus. Oba reportéry jsou díky jaderné lokalizační sekvenci (NLS) přítomny v buněčných jádrech a je tak možné aplikovat postupy kvantitativní obrazové analýzy. Tento přístup umožnuje pro každou jednotlivou testovanou buňku vyjádřit auxinem řízenou expresi vzhledem k celkové rychlosti genové exprese, která je zde pod kontrolou promotoru RPS5A (Liao a kol., 2015).

Provedená obrazová analýza a kvantitativní vyhodnocení *arpc4* linií překvapivě ukázala výrazně a signifikantně snížený signál mDII-ntdTomato, tj. RPS5A řízenu genovou expresi (Obrázek 25A, B), podobně jako u mutantních linií nesoucích 35S řízenou expresi mDII-VENUS. Taktéž intenzita signálu DII:n3xVenus u obou mutantních linií byla oproti kontrolní linii významně snížená (Obrázek 25A, C), stejně tak jako poměr intenzit signálů mDII-ntdTomato/DII-n3xVenus (Obrázek 25D).

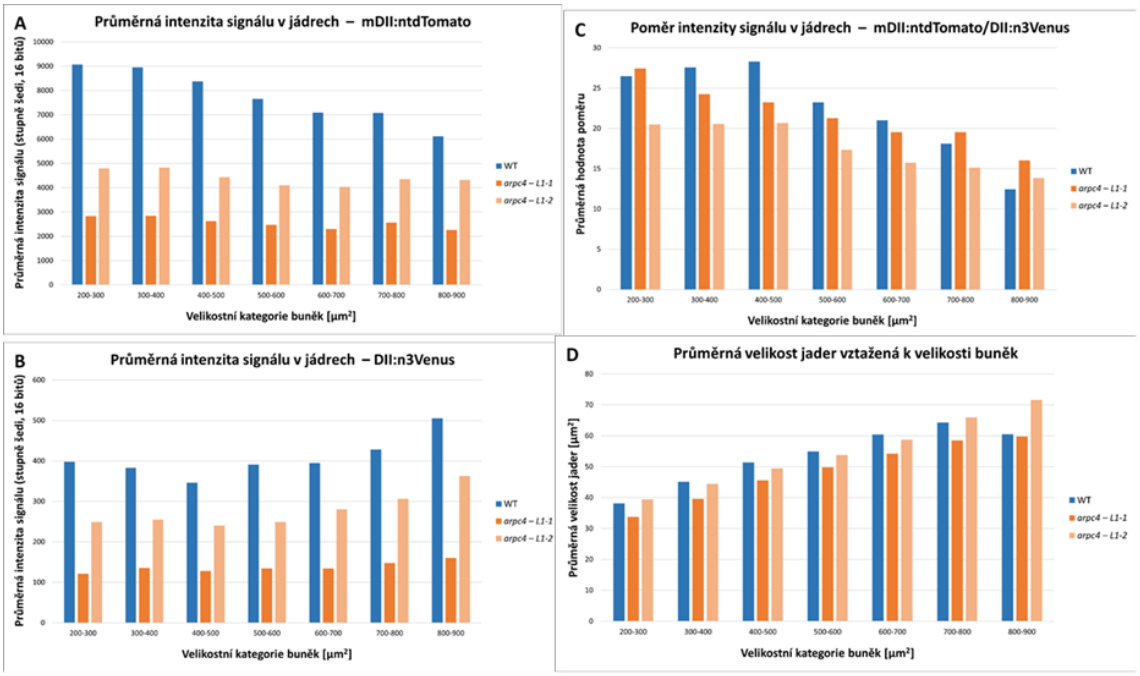
Pro linie R2D2 s mutací *arpc4* bylo dále také provedeno měření přibližné velikosti buněk, ve kterých se analyzovala fluorescence v jádrech. Pro znázornění veškerých výsledků pro R2D2 x *arpc4* pak bylo při analýze stanoveno rozmezí velikostí buněk 200-900 μm^2, které odpovídá analýzám přítomnosti auxinových přenašečů uvedených v předchozích kapitolách.

Rozdělení naměřených hodnot dle velikostních kategorií umožňuje sledovat postupné snižování průměrné intenzity jaderného signálu mDII-ntdTomato (Obrázek 26A). To ukazuje na snižování hladiny genové exprese řízené RPS5A během růstu buněk u kontrolní linie. U mutantních linií se tak však tato exprese výrazně nemění (Obrázek 26A). Oproti tomu, průměrná intenzita jaderného signálu DII-n3xVenus s velikostí buněk spíše stoupá, s největším rozdílem v poslední kategorii buněk. To platí jak pro kontrolní linii, tak ve snížené míře také pro linie mutantů (Obrázek 26B). Poměr intenzity signálu mDII-ntdTomato/DII-n3xVenus se pak s velikostí buněk u všech linií spíše snižuje, a to výrazněji u kontrolní linie, kde v případě poslední velikostní kategorie dokonce hodnoty pro mutantní linie převyšují hodnoty té kontrolní (Obrázek 26C). Nakonec bylo provedeno také porovnání velikostí buněk s velikostí k nim příslušných jader. Ve všech liniích dochází k postupnému zvětšování jader úměrně s velikostí buněk (Obrázek 26D).



Obrázek 25: Analýza genové exprese řízené auxinem v pokožkových buňkách rostlin nesoucích mutaci v podjednotce ARPC4 komplexu ARP2/3. (A) Lokalizace R2D2 v mutantech *arpc4*. Měřítko = 20 µm. **(B)** Intenzita jaderného signálu mDII:ntdTomato. *n* (WT) = 658; *n* (*arpc4* – L1-1) = 678; *n* (*arpc4* – L1-2) = 505 (Bootstrapping, 95% interval spolehlivosti: WT = 7761,56-8237,47; *arpc4* – L1-1 =2574,24-2842,07; *arpc4* – L1-2 = 3976-4202,83). **(C)** Intenzita jaderného signálu DII:n3xVenus. *n* (WT) = 658; *n* (*arpc4* – L1-1) = 678; *n* (*arpc4* – L1-2) = 505 (Bootstrapping, 95% interval spolehlivosti: WT = 328,05-354,53; *arpc4* – L1-1 = 83,35-91,22; *arpc4* – L1-2 = 224,05-242,74). **(D)** Poměr intenzity signálu mDII:ntdTomato/DII:n3xVenus. *n* (WT) = 658; *n* (*arpc4* – L1-1) = 678; *n* (*arpc4* – L1-2) = 505 (Bootstrapping, 95% interval spolehlivosti: WT =21,99-24,04; *arpc4* – L1-1 = 19,66-21,27; *arpc4* – L1-2 = 17,5-18,9).

Výsledky analýzy dat pro mutantní linie *arpc4* tak oproti kontrole ukazují sníženou hladinu genové exprese pod promotorem RPS5A a zároveň zvýšenou míru auxinem řízené genové exprese v dlaždicových buňkách pokožky. Výsledný poměr hodnot, který je v případě linií R2D2 rozhodující, naznačuje oproti kontrole zvýšenou koncentraci auxinu uvnitř buněk mutantních linií. Tyto výsledky jsou tak ve shodě s mým předchozím pozorování linií DII-VENUS s mutací *arpc4*.

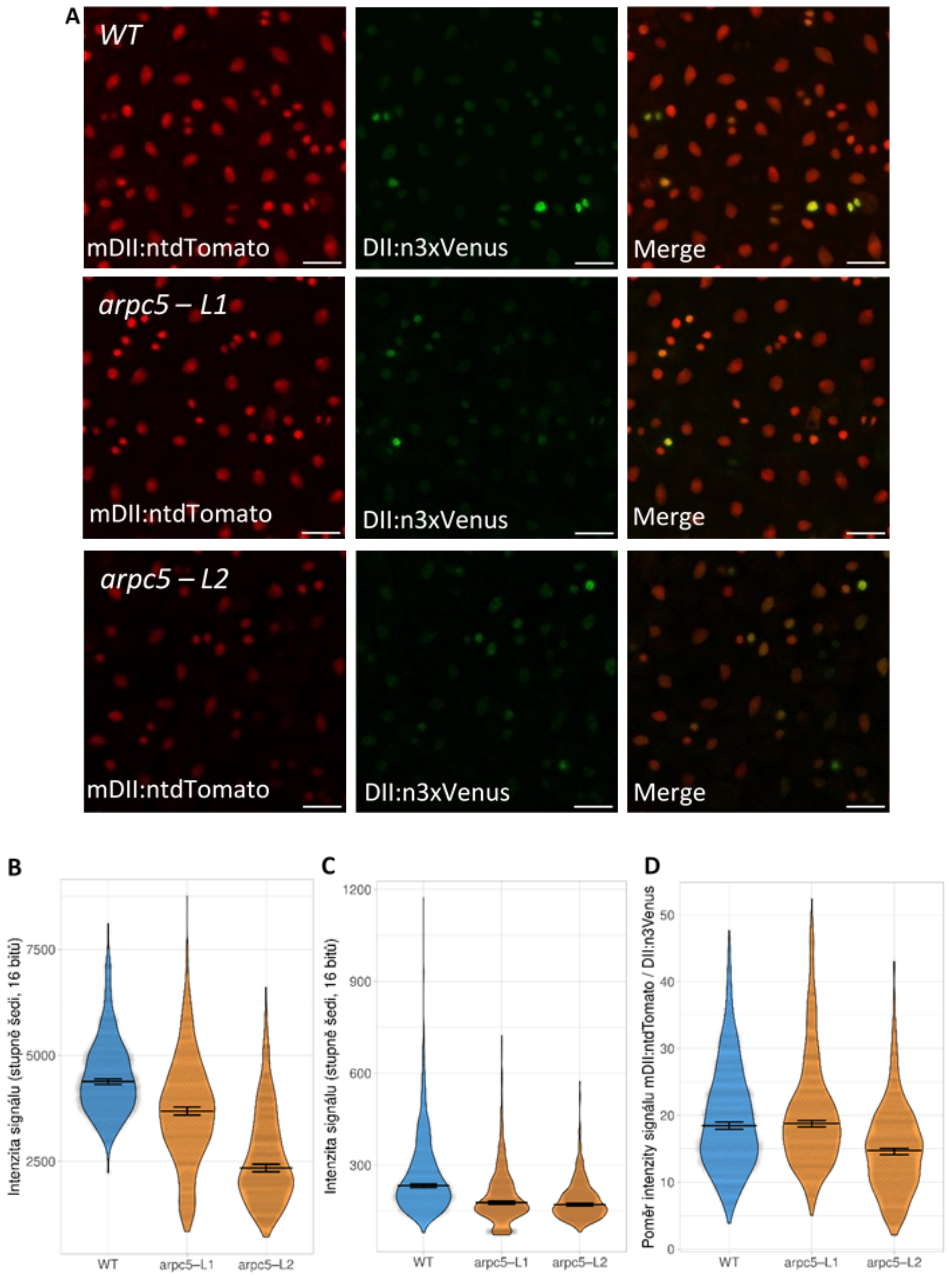


Obrázek 26: Průměrná velikost jader vztažená k velikosti buněk a průměrná intenzita signálu R2D2 v jednotlivých velikostních kategoriích v jádrech pokožkových buněk rostlin nesoucích mutaci ARPC4 – linie L-1-1 a L1-2. (A) Průměrná velikost jader vztažená k velikosti buněk. Průměrná intenzita jaderného signálu mDII:ntdTomato **(B)**, DII:n3xVenus **(C)** a poměr intenzity signálu mDII:ntdTomato/DII:n3xVenus **(D)**.

Analýza linií R2D2 s mutací *arpc5* pak ukazuje opět významné snížení hladiny exprese promotoru RPS5A pro obě mutantní linie v různé míře oproti kontrolní linii (Obrázek 27B). Intenzita jaderného signálu DII:n3xVenus je také snížená pro obě mutantní linie oproti kontrolní, což ukazuje na zvýšenou míru auxinem řízené genové exprese (Obrázek 27C). Výsledný poměr hodnot intenzity signálu mDII:ntdTomato/DII:n3xVenus je pak signifikantně snížený pouze pro jednu z mutantních linií *acrp5* (Obrázek 27D). Měření velikostí buněk nebylo v případě těchto linií z časových důvodů provedeno.

Z výsledků analýzy R2D2 u mutantů *arpc5* tedy vyplývá, že hladina genové exprese pod promotorem RPS5A je u mutantů do různé míry snížená, zatímco hladina auxinem řízené genové exprese je do stejné míry zvýšená u obou mutantních linií. To má za následek, že

výsledný poměr hodnot ukazuje signifikantní rozdíl vůči kontrole pouze pro jednu z mutantních linií.



Obrázek 27: Analýza genové exprese řízené auxinem v pokožkových buňkách rostlin nesoucích mutaci v podjednotce ARPC5 komplexu ARP2/3. (A) Lokalizace R2D2 v mutantech *arpc5*. Měřítko = 20 µm. **(B)** Intenzita jaderného signálu mDII:ntdTomato. *n* (WT) = 1375; *n* (*arpc5* – L1) = 987; *n* (*arpc5* – L2) = 909 (Bootstrapping, 95% interval spolehlivosti: WT = 4315,98-4441,22; *arpc5* – L1 = 3589,55-3769,14; *arpc5* – L2 = 2252,21-2428,17). **(C)** Intenzita jaderného signálu DII:n3xVenus *n* (WT) = 1375; *n* (*arpc5* – L1) = 987; *n* (*arpc5* – L2) = 909 (Bootstrapping, 95% interval spolehlivosti: WT = 227,62-238,09; *arpc5* – L1 = 172,59-181,98; *arpc5* – L2 = 166,73-176,38). **(D)** Poměr intenzity signálu mDII:ntdTomato/DII:n3xVenus. *n* (WT) = 1375; *n* (*arpc5* – L1) = 987; *n* (*arpc5* – L2) = 909 (Bootstrapping, 95% interval spolehlivosti: WT = 17,9-18,96; *arpc5* – L1 = 18,18-19,19; *arpc5* – L2 = 14,18-15,07).

Výsledky analýzy R2D2 pro mutanty *arpc5* se shodují s výsledky pro mutanty *arpc4* v případě hladin exprese. Po vytvoření poměru naznačují všechny linie kromě *arpc5* L1, že v dlaždicových buňkách je zvýšená hladina auxinu. Tyto výsledky jsou v souladu s výsledky v práci z naší laboratoře (García-González a kol., 2020) a také s mými předchozími výsledky analýzy mDII-VENUS pro mutanty *arpc5* a *arpc4* - M2 a DII-VENUS pro mutanty *arpc4*. Z výsledků vyplývá, že mutace komplexu ARP2/3 mají za následek změny celkové genové exprese v dlaždicových buňkách děložních listů.

5 Diskuze

5.1 Mikroskopická pozorování

Pro mikroskopická pozorování byly vytvořeny sady markerových linií pro auxinové přenašeče a znázornění auxinové signalizace v kombinaci s mutacemi v podjednotkách komplexu ARP2/3 a také s mutacemi v izoformách aktinu. Mutanti v podjednotkách komplexu ARP2/3 jsou v naší laboratoři rozsáhle studováni a jsou vhodní pro křížení s markerovými liniemi díky možnosti selekce rostlin na typický znak tzv. distorted trichomů (Hülskamp a kol., 1994).

Pro pozorování byly vybrány dlaždicové buňky pokožky děložních listů, kde byl také potvrzen jasný fenotyp u mutantů v komplexu ARP2/3, a to zvýšení cirkularity buněk (Pratap Sahi a kol., 2018). Rostliny nesoucí vícenásobné mutace pin1/pin3/pin4/pin7 mají výrazně sníženou schopnost buněčné expanze, ačkoliv jejich tvarování není nápadně postiženo (Belteton a kol., 2018) a v pokožkových buňkách byla také ukázána exprese auxinových přenašečů (Belteton a kol., 2018; Grones a kol., 2020). Dlaždicové buňky jsou tak vhodným pletivem pro sledování vlivu narušení aktinového cytoskeletu na umisťování auxinových přenašečů v plazmatické membráně. Pro pozorování byly vybrány velice mladé semenáčky ve stáří 1-1,5 DAG, a to z důvodu toho, že právě v období vývoje semenáčků do 2 DAG dochází k důležitým krokům morfogeneze jako je právě zakládání laloků pokožkových buněk (Zhang a kol., 2011; Armour a kol., 2015; Wu a kol., 2016).

5.2 Zavedení kvantitativní metody vyhodnocení lokalizace auxinových přenašečů a auxinových gradientů pomocí obrazové analýzy

Pro vyhodnocení obsáhlého množství nasnímaných mikroskopických snímků s cílem kvantifikace dat a urychlení analýzy byla vytvořena sada maker pro použití v programu Fiji (Schindelin a kol., 2012). Tento program je dostupným a často používaným nástrojem pro obrazovou analýzu. Makra byla zpřístupněna pro veřejnost.

Momentálně neexistují volně dostupné nástroje pro snadnou kvantifikaci dat lokalizace auxinových přenašečů a markerů auxinové signalizace v pokožkových buňkách a manuální analýza je zdlouhavá. Sada vytvořených maker je tak jedinečným nástrojem pro analýzu

tohoto typu dat. Makra se mohou také dále upravovat a ideálně nastavit na konkrétní druh pozorování, což rozšiřuje způsob jejich možného použití. Asi hlavní nevýhodou této metody analýzy pro případ lokalizace auxinových přenašečů je, že pro správné nalezení obrysů buněk je vyžadována dostatečná intenzita signálu na PM a zároveň vyšší než vnitrobuněčný signál. S problémem nízkého signálu na PM jsem se setkala při analýze svých dat, a proto muselo být v některých případech přistoupeno k manuální analýze.

5.3 Analýza lokalizace auxinových přenašečů po narušení dynamiky aktinového cytoskeletu

Výsledky analýzy lokalizace auxinových přenašečů po narušení dynamiky aktinového cytoskeletu způsobeném mutacemi v komplexu ARP2/3 nebo také pomocí aktinové drogy latrunkulinu B ukázaly, že dochází ke změnám v lokalizaci přenašečů na PM. Tyto výsledky byly potvrzeny pro přenašeče PIN3, PIN7 a do určité míry také pro přenašeče PIN4. Mimo to bylo u mutantů ve stáří 1,5 DAG pozorováno snížení vnitrobuněčného signálu těchto auxinových přenašečů oproti kontrole. Mé výsledky analýzy pro přenašeč PIN3 v kombinaci s mutací *arpc5* již byly publikovány v práci z naší laboratoře, kde jsem spoluautorem (García-González a kol., 2020).

Z pozorování a analýzy lokalizace přenašečů vyplývá, že vliv mutací na lokalizaci přenašečů se může lišit u jednotlivých pozorovaných linií dané kombinace, což bylo pozorováno v případě přenašečů PIN3 v kombinaci s mutací *arpc5* a také v případě přenašečů PIN4 v kombinaci s mutací *arpc4*. Variabilita byla pozorována také u mutantních linií pro auxinový přenašeč AUX1. Data pro tento přenašeč však nebyla kvantifikována. Je tak vidět, že provedení kvantitativní analýzy více nezávislých linií se stejnou mutací je potřebné pro správnou interpretaci výsledků. Zajímavý náhled na výsledky pak poskytlo také znázornění dat rozdělených podle velikostí měřených buněk. Dají se tak sledovat změny v lokalizaci přenašečů v průběhu vývoje dlaždicových buněk. Zdá se, že buňky v mutantních liniích nejsou schopny dostatečně měnit množství přenašečů v průběhu vývoje, což by mohlo mít vliv na změny tvaru dlaždicových buněk pozorovaných v jiných pracích (Deeks a Hussey, 2003; Pratap Sahi a kol., 2018). Vhodnější metodou pro sledování změn v lokalizaci přenašečů v průběhu vývoje by bylo vytvoření časosběrného záznamu, tzv. time lapse. Pro sledování detailů lokalizace přenašečů na PM by byla vhodná mikroskopie s větším

prostorovým rozlišením, jako je např. AiryScan či spinning disk s objektivem 100x. Tato pozorovnání jsem již prováděla, ale nejsou součástí této diplomové práce.

5.4 Analýza genové exprese řízené auxinem v pokožce děložních listů nesoucích mutované podjednotky aktin nukleačního komplexu ARP2/3

Pozorované změny v lokalizaci auxinových přenašečů při narušení dynamiky aktinového cytoskeletu v pokožkových buňkách děložních listů naznačuje na možnost změn hladiny auxinu v těchto buňkách. Výsledky analýzy markerových linií ukázaly, že hladina auxinem řízené genové exprese je v dlaždicových buňkách u mutantů oproti kontrole snížená a snížená je také celková genová exprese u mutantních linií. Změny v hladinách genové exprese řízené auxinem byly již pro linii DII-VENUS v kombinaci s mutací *arpc5* ukázány dříve (García-González a kol., 2020). Avšak má analýza pro kombinaci DII-VENUS s *arpc5* ukázala opačné výsledky. Mé ostatní výsledky jsou pak z většiny v souladu s výsledky této práce a naznačují zvýšenou hladinu auxinu v dlaždicových buňkách mutantních rostlin oproti kontrole. Výsledky mé analýzy pro DII-VENUS v *arpc5* rozdílné od publikovaných výsledků mohly vzniknout z důvodu použití odlišných metod analýzy dat. Dalším důvodem by mohl být fakt, že v případě článku byly pozorovány rostliny o půl dne mladší. Nakonec je důležité také podotknout, že pro interpretaci výsledků použitých v článku nebyla použita kontrolní linie mDII-VENUS. Výsledky analýzy auxinem řízené genové exprese ukazují na důležitost použití kontroly, jako je linie mDII-VENUS pro marker DII-VENUS, nebo ještě lépe kombinace těchto reportérů v každé jedné rostlině u linií R2D2.

Zajímavý náhled na data opět poskytlo rozdělení dat podle příslušných velikostí buněk v případě R2D2 s mutací *arpc4*, které ukázalo právě postupné snižování celkové genové exprese v buňkách se zvyšující se velikostí, a zároveň se s velikostí snižovala auxinem řízená exprese. Snižování celkové genové exprese v buňkách může ale být způsobeno tím, že reportér R2D2 je exprimován pod promotorem RPS5A, jehož exprese v rostlinách je především v aktivně se dělících buňkách (Weijers a kol., 2001).

Jako vhodnou alternativu pro sledování gradientů auxinu by bylo možné použít nově vytvořený biosenzor, který umožňuje vizualizaci rychlých změn v koncentraci auxinu (Herud-Sikimić a kol., 2021).

6 Závěry

1. Pro mikroskopické pozorování lokalizace auxinových přenašečů a auxinem řízené genové exprese v liniích rostlin *Arabidopsis thaliana* s mutacemi v podjednotkách komplexu ARP2/3 byly vytvořeny vhodné linie pomocí křížení. Pro analýzu pořízených mikroskopických snímků byl zaveden kvantitativní postup vyhodnocení pomocí obrazové analýzy v programu Fiji za použití vytvořené sady maker.
2. V pokožce děložních listů *Arabidopsis thaliana* byla mikroskopicky pozorována lokalizace auxinových přenašečů po narušení aktinového cytoskeletu. Všechny analyzované auxinové přenašeče (PIN3, PIN4 a PIN7) mají změněnou lokalizaci v buňkách při mutacích v podjednotkách komplexu ARP2/3. Lokalizace přenašečů na PM je u mutovaných linií a také při použití latrunkulinu B oproti kontrole do různé míry snížená. Podrobnější analýza dat rozdělených do kategorií podle velikostí buněk ukazuje na sníženou schopnost správné lokalizace přenašečů na PM v průběhu vývoje buněk u mutantů *arpc4*.
3. V pokožce děložních listů mutantů v podjednotkách komplexu ARP2/3 byla mikroskopicky pozorována míra genové exprese řízené auxinem. Z analýzy pořízených snímků vyplývá, že u mutantních linií je oproti kontrole snížená celková hladina genové exprese v dlaždicových buňkách. Celková exprese řízená auxinem je pak u mutantních linií zvýšená, kromě linií DII-VENUS s mutací *arpc5*. Výsledky naznačují, že v dlaždicových buňkách mutantů je celkově spíše zvýšená hladina auxinu oproti kontrole. Podrobnější analýza dat R2D2 pro kontrolní i mutantní linie *arpc4* rozdělené do kategorií podle velikostí buněk ukazuje, že v buňkách se v průběhu jejich zvětšování snižuje hladina genové exprese, i té řízené auxinem, a že u mutantů *arpc4* dochází ke snižování exprese pomaleji než u kontrolní linie.

7 Seznam použité literatury

Adamowski, M., M. Narasimhan, U. Kania, M. Glanc, G. De Jaeger & J. Friml (2018) A Functional Study of AUXILIN-LIKE1 and 2, Two Putative Clathrin Uncoating Factors in Arabidopsis. *Plant Cell,* 30**,** 700-716.

Aloni, R., K. Schwalm, M. Langhans & C. I. Ullrich (2003) Gradual shifts in sites of free-auxin production during leaf-primordium development and their role in vascular differentiation and leaf morphogenesis in Arabidopsis. *Planta,* 216**,** 841-53.

Amann, K. J. & T. D. Pollard (2001) The Arp2/3 complex nucleates actin filament branches from the sides of pre-existing filaments. *Nat Cell Biol,* 3**,** 306-10.

Arieti, R. S. & C. J. Staiger (2020) Auxin-induced actin cytoskeleton rearrangements require AUX1. *New Phytol,* 226**,** 441-459.

Armour, W. J., D. A. Barton, A. M. Law & R. L. Overall (2015) Differential Growth in Periclinal and Anticlinal Walls during Lobe Formation in Arabidopsis Cotyledon Pavement Cells. *Plant Cell,* 27**,** 2484-500.

Basu, D., S. l.-D. El-Assal, J. Le, E. L. Mallery & D. B. Szymanski (2004) Interchangeable functions of Arabidopsis PIROGI and the human WAVE complex subunit SRA1 during leaf epidermal development. *Development,* 131**,** 4345-55.

Basu, D., J. Le, S. l.-D. El-Essal, S. Huang, C. Zhang, E. L. Mallery, G. Koliantz, C. J. Staiger & D. B. Szymanski (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**,** 502-24.

Belteton, S. A., M. G. Sawchuk, B. S. Donohoe, E. Scarpella & D. B. Szymanski (2018) Reassessing the Roles of PIN Proteins and Anticlinal Microtubules during Pavement Cell Morphogenesis. *Plant Physiol,* 176**,** 432-449.

Bennett, M. J., A. Marchant, H. G. Green, S. T. May, S. P. Ward, P. A. Millner, A. R. Walker, B. Schulz & K. A. Feldmann (1996) Arabidopsis AUX1 gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science,* 273**,** 948-50.

Blanchoin, L., T. D. Pollard & R. D. Mullins (2000) Interactions of ADF/cofilin, Arp2/3 complex, capping protein and profilin in remodeling of branched actin filament networks. *Curr Biol,* 10**,** 1273-82.

Blilou, I., J. Xu, M. Wildwater, V. Willemsen, I. Paponov, J. Friml, R. Heidstra, M. Aida, K. Palme & B. Scheres (2005) The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots. *Nature,* 433**,** 39-44.

Boutté, Y., M. T. Crosnier, N. Carraro, J. Traas & B. Satiat-Jeunemaitre (2006) The plasma membrane recycling pathway and cell polarity in plants: studies on PIN proteins. *J Cell Sci,* 119**,** 1255-65.

Brunoud, G., D. M. Wells, M. Oliva, A. Larrieu, V. Mirabet, A. H. Burrow, T. Beeckman, S. Kepinski, J. Traas, M. J. Bennett & T. Vernoux (2012) A novel sensor to map auxin response and distribution at high spatio-temporal resolution. *Nature,* 482**,** 103-6.

Carter, S. B. (1967) Effects of cytochalasins on mammalian cells. *Nature,* 213**,** 261-4.

Cumming, G. & S. Finch (2005) Inference by eye: confidence intervals and how to read pictures of data. *Am Psychol,* 60**,** 170-80.

Damodaran, S. & L. C. Strader (2019) Indole 3-Butyric Acid Metabolism and Transport in. *Front Plant Sci,* 10**,** 851.

De La Cruz, E. M. & M. L. Gardel (2015) Actin Mechanics and Fragmentation. *J Biol Chem,* 290**,** 17137-44.

Deeks, M. J. & P. J. Hussey (2003) Arp2/3 and 'the shape of things to come'. *Curr Opin Plant Biol,* 6**,** 561-7.

Deeks, M. J., D. Kaloriti, B. Davies, R. Malhó & P. J. Hussey (2004) Arabidopsis NAP1 is essential for Arp2/3-dependent trichome morphogenesis. *Curr Biol,* 14**,** 1410-4.

Dharmasiri, N., S. Dharmasiri & M. Estelle (2005) The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature,* 435**,** 441-5.

Dhonukshe, P., F. Aniento, I. Hwang, D. G. Robinson, J. Mravec, Y. D. Stierhof & J. Friml (2007) Clathrin-mediated constitutive endocytosis of PIN auxin efflux carriers in Arabidopsis. *Curr Biol,* 17**,** 520-7.

Djakovic, S., J. Dyachok, M. Burke, M. J. Frank & L. G. Smith (2006) BRICK1/HSPC300 functions with SCAR and the ARP2/3 complex to regulate epidermal cell shape in Arabidopsis. *Development,* 133**,** 1091-100.

Dominguez, R. & K. C. Holmes (2011) Actin structure and function. *Annu Rev Biophys,* 40**,** 169-86.

Dubey, S. M., N. B. C. Serre, D. Oulehlová, P. Vittal & M. Fendrych (2021) No Time for Transcription-Rapid Auxin Responses in Plants. *Cold Spring Harb Perspect Biol,* 13.

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

El-Din El-Assal, S., J. Le, D. Basu, E. L. Mallery & D. B. Szymanski (2004) DISTORTED2 encodes an ARPC2 subunit of the putative Arabidopsis ARP2/3 complex. *Plant J,* 38**,** 526-38.

Feraru, E., M. I. Feraru, J. Kleine-Vehn, A. Martinière, G. Mouille, S. Vanneste, S. Vernhettes, J. Runions & J. Friml (2011) PIN polarity maintenance by the cell wall in Arabidopsis. *Curr Biol,* 21**,** 338-43.

Frank, M., C. Egile, J. Dyachok, S. Djakovic, M. Nolasco, R. Li & L. G. Smith (2004) Activation of Arp2/3 complex-dependent actin polymerization by plant proteins distantly related to Scar/WAVE. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 101**,** 16379-84.

Friml, J., A. Vieten, M. Sauer, D. Weijers, H. Schwarz, T. Hamann, R. Offringa & G. Jürgens (2003) Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of Arabidopsis. *Nature,* 426**,** 147-53.

Friml, J., J. Wiśniewska, E. Benková, K. Mendgen & K. Palme (2002) Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in Arabidopsis. *Nature,* 415**,** 806-9.

García-González, J., Š. Kebrlová, M. Semerák, J. Lacek, I. Kotannal Baby, J. Petrášek & K. Schwarzerová (2020) Arp2/3 Complex Is Required for Auxin-Driven Cell Expansion Through Regulation of Auxin Transporter Homeostasis. *Front Plant Sci,* 11**,** 486.

Geisler, M., J. J. Blakeslee, R. Bouchard, O. R. Lee, V. Vincenzetti, A. Bandyopadhyay, B. Titapiwatanakun, W. A. Peer, A. Bailly, E. L. Richards, K. F. Ejendal, A. P. Smith, C. Baroux, U. Grossniklaus, A. Müller, C. A. Hrycyna, R. Dudler, A. S. Murphy & E. Martinoia (2005) Cellular efflux of auxin catalyzed by the Arabidopsis MDR/PGP transporter AtPGP1. *Plant J,* 44**,** 179-94.

Geldner, N., N. Anders, H. Wolters, J. Keicher, W. Kornberger, P. Muller, A. Delbarre, T. Ueda, A. Nakano & G. Jürgens (2003) The Arabidopsis GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth. *Cell,* 112**,** 219-30.

Geldner, N., J. Friml, Y. D. Stierhof, G. Jürgens & K. Palme (2001) Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature,* 413**,** 425-8.

Gjetting, K. S., C. K. Ytting, A. Schulz & A. T. Fuglsang (2012) Live imaging of intra- and extracellular pH in plants using pHusion, a novel genetically encoded biosensor. *J Exp Bot,* 63**,** 3207-18.

Glanc, M., M. Fendrych & J. Friml (2018) Mechanistic framework for cell-intrinsic re-establishment of PIN2 polarity after cell division. *Nat Plants,* 4**,** 1082-1088.

--- (2019) PIN2 Polarity Establishment in. *Biomolecules,* 9.

Gomes, G. L. B. & K. C. Scortecci (2021) Auxin and its role in plant development: structure, signalling, regulation and response mechanisms. *Plant Biol (Stuttg),* 23**,** 894-904.

Goodson, H. V. & E. M. Jonasson (2018) Microtubules and Microtubule-Associated Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol,* 10.

Gray, W. M., S. Kepinski, D. Rouse, O. Leyser & M. Estelle (2001) Auxin regulates SCF(TIR1)-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature,* 414**,** 271-6.

Grones, P., M. Majda, S. M. Doyle, D. Van Damme & S. Robert (2020) Fluctuating auxin response gradients determine pavement cell-shape acquisition. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 117**,** 16027-16034.

Han, H., M. Adamowski, L. Qi, S. S. Alotaibi & J. Friml (2021) PIN-mediated polar auxin transport regulations in plant tropic responses. *New Phytol,* 232**,** 510-522.

Havelková, L., G. Nanda, J. Martinek, E. Bellinvia, L. Sikorová, K. Šlajcherová, D. Seifertová, L. Fischer, J. Fišerová, J. Petrášek & K. Schwarzerová (2015) Arp2/3 complex subunit ARPC2 binds to microtubules. *Plant Sci,* 241**,** 96-108.

Herud-Sikimić, O., A. C. Stiel, M. Kolb, S. Shanmugaratnam, K. W. Berendzen, C. Feldhaus, B. Höcker & G. Jürgens (2021) A biosensor for the direct visualization of auxin. *Nature,* 592**,** 768-772.

Hu, Y., X. Na, J. Li, L. Yang, J. You, X. Liang, J. Wang, L. Peng & Y. Bi (2015) Narciclasine, a potential allelochemical, affects subcellular trafficking of auxin transporter proteins and actin cytoskeleton dynamics in Arabidopsis roots. *Planta,* 242**,** 1349-60.

Huang, S., J. M. McDowell, M. J. Weise & R. B. Meagher (1996) The Arabidopsis profilin gene family. Evidence for an ancient split between constitutive and pollen-specific profilin genes. *Plant Physiol,* 111**,** 115-26.

Hülskamp, M., S. Misŕa & G. Jürgens (1994) Genetic dissection of trichome cell development in Arabidopsis. *Cell,* 76**,** 555-66.

Hussey, P. J., T. Ketelaar & M. J. Deeks (2006) Control of the actin cytoskeleton in plant cell growth. *Annu Rev Plant Biol,* 57**,** 109-25.

Cho, M. & H. T. Cho (2013) The function of ABCB transporters in auxin transport. *Plant Signal Behav,* 8**,** e22990.

Cho, M., S. H. Lee & H. T. Cho (2007) P-glycoprotein4 displays auxin efflux transporter-like action in Arabidopsis root hair cells and tobacco cells. *Plant Cell,* 19**,** 3930-43.

Cho, M., Z. W. Lee & H. T. Cho (2012) ATP-binding cassette B4, an auxin-efflux transporter, stably associates with the plasma membrane and shows distinctive intracellular trafficking from that of PIN-FORMED proteins. *Plant Physiol,* 159**,** 642-54.

Isner, J. C., Z. Xu, J. M. Costa, F. Monnet, T. Batstone, X. Ou, M. J. Deeks, B. Genty, K. Jiang & A. M. Hetherington (2017) Actin filament reorganisation controlled by the SCAR/WAVE complex mediates stomatal response to darkness. *New Phytol,* 215**,** 1059-1067.

Jaillais, Y., I. Fobis-Loisy, C. Miège, C. Rollin & T. Gaude (2006) AtSNX1 defines an endosome for auxin-carrier trafficking in Arabidopsis. *Nature,* 443**,** 106-9.

Jásik, J., B. Bokor, S. Stuchlík, K. Mičieta, J. Turňa & E. Schmelzer (2016) Effects of Auxins on PIN-FORMED2 (PIN2) Dynamics Are Not Mediated by Inhibiting PIN2 Endocytosis. *Plant Physiol,* 172**,** 1019-1031.

Jiang, K., K. Sorefan, M. J. Deeks, M. W. Bevan, P. J. Hussey & A. M. Hetherington (2012) The ARP2/3 complex mediates guard cell actin reorganization and stomatal movement in Arabidopsis. *Plant Cell,* 24**,** 2031-40.

Kamimoto, Y., K. Terasaka, M. Hamamoto, K. Takanashi, S. Fukuda, N. Shitan, A. Sugiyama, H. Suzuki, D. Shibata, B. Wang, S. Pollmann, M. Geisler & K. Yazaki (2012) Arabidopsis ABCB21 is a facultative auxin importer/exporter regulated by cytoplasmic auxin concentration. *Plant Cell Physiol,* 53**,** 2090-100.

Kaneda, M., M. Schuetz, B. S. Lin, C. Chanis, B. Hamberger, T. L. Western, J. Ehlting & A. L. Samuels (2011) ABC transporters coordinately expressed during lignification of Arabidopsis stems include a set of ABCBs associated with auxin transport. *J Exp Bot,* 62**,** 2063-77.

Kelleher, J. F., S. J. Atkinson & T. D. Pollard (1995) Sequences, structural models, and cellular localization of the actin-related proteins Arp2 and Arp3 from Acanthamoeba. *J Cell Biol,* 131**,** 385-97.

Kepinski, S. & O. Leyser (2005) The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature,* 435**,** 446-51.

Kleine-Vehn, J., P. Dhonukshe, M. Sauer, P. B. Brewer, J. Wiśniewska, T. Paciorek, E. Benková & J. Friml (2008a) ARF GEF-dependent transcytosis and polar delivery of PIN auxin carriers in Arabidopsis. *Curr Biol,* 18**,** 526-31.

Kleine-Vehn, J., P. Dhonukshe, R. Swarup, M. Bennett & J. Friml (2006) Subcellular trafficking of the Arabidopsis auxin influx carrier AUX1 uses a novel pathway distinct from PIN1. *Plant Cell,* 18**,** 3171-81.

Kleine-Vehn, J. & J. Friml (2008) Polar targeting and endocytic recycling in auxin-dependent plant development. *Annu Rev Cell Dev Biol,* 24**,** 447-73.

Kleine-Vehn, J., L. Langowski, J. Wisniewska, P. Dhonukshe, P. B. Brewer & J. Friml (2008b) Cellular and molecular requirements for polar PIN targeting and transcytosis in plants. *Mol Plant,* 1**,** 1056-66.

Kleine-Vehn, J., J. Leitner, M. Zwiewka, M. Sauer, L. Abas, C. Luschnig & J. Friml (2008c) Differential degradation of PIN2 auxin efflux carrier by retromer-dependent vacuolar targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 105**,** 17812-7.

Kleine-Vehn, J., K. Wabnik, A. Martinière, Ł. Łangowski, K. Willig, S. Naramoto, J. Leitner, H. Tanaka, S. Jakobs, S. Robert, C. Luschnig, W. Govaerts, S. W. Hell, J. Runions & J. Friml (2011) Recycling, clustering, and endocytosis jointly maintain PIN auxin carrier polarity at the plasma membrane. *Mol Syst Biol,* 7**,** 540.

Kollmar, M., D. Lbik & S. Enge (2012) Evolution of the eukaryotic ARP2/3 activators of the WASP family: WASP, WAVE, WASH, and WHAMM, and the proposed new family members WAWH and WAML. *BMC Res Notes,* 5**,** 88.

Kotchoni, S. O., T. Zakharova, E. L. Mallery, J. Le, S. l.-D. El-Assal & D. B. Szymanski (2009) The association of the Arabidopsis actin-related protein2/3 complex with cell membranes is linked to its assembly status but not its activation. *Plant Physiol,* 151**,** 2095-109.

Krouk, G., B. Lacombe, A. Bielach, F. Perrine-Walker, K. Malinska, E. Mounier, K. Hoyerova, P. Tillard, S. Leon, K. Ljung, E. Zazimalova, E. Benkova, P. Nacry & A. Gojon (2010) Nitrate-regulated auxin transport by NRT1.1 defines a mechanism for nutrient sensing in plants. *Dev Cell,* 18**,** 927-37.

Kubeš, M., H. Yang, G. L. Richter, Y. Cheng, E. Młodzińska, X. Wang, J. J. Blakeslee, N. Carraro, J. Petrášek, E. Zažímalová, K. Hoyerová, W. A. Peer & A. S. Murphy (2012) The Arabidopsis concentration-dependent influx/efflux transporter ABCB4 regulates cellular auxin levels in the root epidermis. *Plant J,* 69**,** 640-54.

Kumar, M., N. Pandya-Kumar, A. Dam, H. Haor, E. Mayzlish-Gati, E. Belausov, S. Wininger, M. Abu-Abied, C. S. McErlean, L. J. Bromhead, C. Prandi, Y. Kapulnik & H. Koltai (2015) Arabidopsis response to low-phosphate conditions includes active changes in actin filaments and PIN2 polarization and is dependent on strigolactone signalling. *J Exp Bot,* 66**,** 1499-510.

Laxmi, A., J. Pan, M. Morsy & R. Chen (2008) Light plays an essential role in intracellular distribution of auxin efflux carrier PIN2 in Arabidopsis thaliana. *PLoS One,* 3**,** e1510.

Le, J., S. l.-D. El-Assal, D. Basu, M. E. Saad & D. B. Szymanski (2003) Requirements for Arabidopsis ATARP2 and ATARP3 during epidermal development. *Curr Biol,* 13**,** 1341-7.

Le, J., E. L. Mallery, C. Zhang, S. Brankle & D. B. Szymanski (2006) Arabidopsis BRICK1/HSPC300 is an essential WAVE-complex subunit that selectively stabilizes the Arp2/3 activator SCAR2. *Curr Biol,* 16**,** 895-901.

Li, S., L. Blanchoin, Z. Yang & E. M. Lord (2003) The putative Arabidopsis arp2/3 complex controls leaf cell morphogenesis. *Plant Physiol,* 132**,** 2034-44.

Li, X., J. H. Li, W. Wang, N. Z. Chen, T. S. Ma, Y. N. Xi, X. L. Zhang, H. F. Lin, Y. Bai, S. J. Huang & Y. L. Chen (2014) ARP2/3 complex-mediated actin dynamics is required for hydrogen peroxide-induced stomatal closure in Arabidopsis. *Plant Cell Environ,* 37**,** 1548-60.

Lian, N., X. Wang, Y. Jing & J. Lin (2021) Regulation of cytoskeleton-associated protein activities: Linking cellular signals to plant cytoskeletal function. *J Integr Plant Biol,* 63**,** 241-250.

Liao, C. Y., W. Smet, G. Brunoud, S. Yoshida, T. Vernoux & D. Weijers (2015) Reporters for sensitive and quantitative measurement of auxin response. *Nat Methods,* 12**,** 207-10, 2 p following 210.

Machesky, L. M., S. J. Atkinson, C. Ampe, J. Vandekerckhove & T. D. Pollard (1994) Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from Acanthamoeba by affinity chromatography on profilin-agarose. *J Cell Biol,* 127**,** 107-15.

Maisch, J. & P. Nick (2007) Actin is involved in auxin-dependent patterning. *Plant Physiol,* 143**,** 1695-704.

Marchand, J. B., D. A. Kaiser, T. D. Pollard & H. N. Higgs (2001) Interaction of WASP/Scar proteins with actin and vertebrate Arp2/3 complex. *Nat Cell Biol,* 3**,** 76-82.

Martinek, J., P. Cifrová, S. Vosolsobě, J. Krtková, L. Sikorová, K. Malínská, Z. Mauerová, I. Leaves, I. Sparkes & K. Schwarzerová (2022) ARP2/3 complex associates with peroxisomes to participate in pexophagy in plants. *bioRxiv***,** 2022.04.07.487451.

Martinière, A., I. Lavagi, G. Nageswaran, D. J. Rolfe, L. Maneta-Peyret, D. T. Luu, S. W. Botchway, S. E. Webb, S. Mongrand, C. Maurel, M. L. Martin-Fernandez, J. Kleine-Vehn, J. Friml, P. Moreau & J. Runions (2012) Cell wall constrains lateral diffusion of plant plasma-membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 109**,** 12805-10.

Mashiguchi, K., K. Tanaka, T. Sakai, S. Sugawara, H. Kawaide, M. Natsume, A. Hanada, T. Yaeno, K. Shirasu, H. Yao, P. McSteen, Y. Zhao, K. Hayashi, Y. Kamiya & H. Kasahara (2011) The main auxin biosynthesis pathway in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 108**,** 18512-7.

Mathur, J., N. Mathur, B. Kernebeck & M. Hülskamp (2003a) Mutations in actin-related proteins 2 and 3 affect cell shape development in Arabidopsis. *Plant Cell,* 15**,** 1632-45.

Mathur, J., N. Mathur, V. Kirik, B. Kernebeck, B. P. Srinivas & M. Hülskamp (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**,** 3137-46.

Mazur, E., M. Gallei, M. Adamowski, H. Han, H. S. Robert & J. Friml (2020) Clathrin-mediated trafficking and PIN trafficking are required for auxin canalization and vascular tissue formation in Arabidopsis. *Plant Sci,* 293**,** 110414.

McDowell, J. M., S. Huang, E. C. McKinney, Y. Q. An & R. B. Meagher (1996) Structure and evolution of the actin gene family in Arabidopsis thaliana. *Genetics,* 142**,** 587-602.

Meagher, R. B., E. C. McKinney & A. V. Vitale (1999) The evolution of new structures: clues from plant cytoskeletal genes. *Trends Genet,* 15**,** 278-84.

Men, S., Y. Boutté, Y. Ikeda, X. Li, K. Palme, Y. D. Stierhof, M. A. Hartmann, T. Moritz & M. Grebe (2008) Sterol-dependent endocytosis mediates post-cytokinetic acquisition of PIN2 auxin efflux carrier polarity. *Nat Cell Biol,* 10**,** 237-44.

Michelot, A., C. Guérin, S. Huang, M. Ingouff, S. Richard, N. Rodiuc, C. J. Staiger & L. Blanchoin (2005) The formin homology 1 domain modulates the actin nucleation and bundling activity of Arabidopsis FORMIN1. *Plant Cell,* 17**,** 2296-313.

Mravec, J., M. Kubes, A. Bielach, V. Gaykova, J. Petrásek, P. Skůpa, S. Chand, E. Benková, E. Zazímalová & J. Friml (2008) Interaction of PIN and PGP transport mechanisms in auxin distribution-dependent development. *Development,* 135**,** 3345-54.

Mravec, J., P. Skůpa, A. Bailly, K. Hoyerová, P. Krecek, A. Bielach, J. Petrásek, J. Zhang, V. Gaykova, Y. D. Stierhof, P. I. Dobrev, K. Schwarzerová, J. Rolcík, D. Seifertová, C. Luschnig, E. Benková, E. Zazímalová, M. Geisler & J. Friml (2009) Subcellular homeostasis of phytohormone auxin is mediated by the ER-localized PIN5 transporter. *Nature,* 459**,** 1136-40.

Muday, G. K., S. Hu & S. R. Brady (2000) The actin cytoskeleton may control the polar distribution of an auxin transport protein. *Gravit Space Biol Bull,* 13**,** 75-83.

Mullins, R. D., J. F. Kelleher, J. Xu & T. D. Pollard (1998) Arp2/3 complex from Acanthamoeba binds profilin and cross-links actin filaments. *Mol Biol Cell,* 9**,** 841-52.

Narasimhan, M., M. Gallei, S. Tan, A. Johnson, I. Verstraeten, L. Li, L. Rodriguez, H. Han, E. Himschoot, R. Wang, S. Vanneste, J. Sánchez-Simarro, F. Aniento, M. Adamowski & J. Friml (2021) Systematic analysis of specific and nonspecific auxin effects on endocytosis and trafficking. *Plant Physiol,* 186**,** 1122-1142.

Nick, P., M. J. Han & G. An (2009) Auxin stimulates its own transport by shaping actin filaments. *Plant Physiol,* 151**,** 155-67.

Paciorek, T., E. Zazímalová, N. Ruthardt, J. Petrásek, Y. D. Stierhof, J. Kleine-Vehn, D. A. Morris, N. Emans, G. Jürgens, N. Geldner & J. Friml (2005) Auxin inhibits endocytosis and promotes its own efflux from cells. *Nature,* 435**,** 1251-6.

Péret, B., K. Swarup, A. Ferguson, M. Seth, Y. Yang, S. Dhondt, N. James, I. Casimiro, P. Perry, A. Syed, H. Yang, J. Reemmer, E. Venison, C. Howells, M. A. Perez-Amador, J. Yun, J. Alonso, G. T. Beemster, L. Laplaze, A. Murphy, M. J. Bennett, E. Nielsen & R. Swarup (2012) AUX/LAX genes encode a family of auxin influx transporters that perform distinct functions during Arabidopsis development. *Plant Cell,* 24**,** 2874-85.

Petrásek, J. & K. Schwarzerová (2009) Actin and microtubule cytoskeleton interactions. *Curr Opin Plant Biol,* 12**,** 728-34.

Pollard, T. D. (2007) Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct,* 36**,** 451-77.

--- (2016) Actin and Actin-Binding Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol,* 8.

Pratap Sahi, V., P. Cifrová, J. García-González, I. Kotannal Baby, G. Mouillé, E. Gineau, K. Müller, F. Baluška, A. Soukup, J. Petrášek & K. Schwarzerová (2018) Arabidopsis thaliana plants lacking the ARP2/3 complex show defects in cell wall assembly and auxin distribution. *Ann Bot,* 122**,** 777-789.

Robert, H. S. & J. Friml (2009) Auxin and other signals on the move in plants. *Nat Chem Biol,* 5**,** 325-32.

Robinson, R. C., K. Turbedsky, D. A. Kaiser, J. B. Marchand, H. N. Higgs, S. Choe & T. D. Pollard (2001) Crystal structure of Arp2/3 complex. *Science,* 294**,** 1679-84.

Rohatgi, R., L. Ma, H. Miki, M. Lopez, T. Kirchhausen, T. Takenawa & M. W. Kirschner (1999) The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell,* 97**,** 221-31.

Rouiller, I., X. P. Xu, K. J. Amann, C. Egile, S. Nickell, D. Nicastro, R. Li, T. D. Pollard, N. Volkmann & D. Hanein (2008) The structural basis of actin filament branching by the Arp2/3 complex. *J Cell Biol,* 180**,** 887-95.

Rubery, P. H. & A. R. Sheldrake (1974) Carrier-mediated auxin transport. *Planta,* 118**,** 101-21.

Ruegger, M., E. Dewey, W. M. Gray, L. Hobbie, J. Turner & M. Estelle (1998) The TIR1 protein of Arabidopsis functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast grr1p. *Genes Dev,* 12**,** 198-207.

Sabater, M. & P. H. Rubery (1987) Auxin carriers in Cucurbita vesicles : II. Evidence that carrier-mediated routes of both indole-3-acetic acid influx and efflux are electroimpelled. *Planta,* 171**,** 507-13.

Saedler, R., M. Jakoby, B. Marin, E. Galiana-Jaime & M. Hülskamp (2009) The cell morphogenesis gene SPIRRIG in Arabidopsis encodes a WD/BEACH domain protein. *Plant J,* 59**,** 612-21.

Saedler, R., N. Mathur, B. P. Srinivas, B. Kernebeck, M. Hülskamp & J. Mathur (2004) Actin control over microtubules suggested by DISTORTED2 encoding the Arabidopsis ARPC2 subunit homolog. *Plant Cell Physiol,* 45**,** 813-22.

Schindelin, J., I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J. Y. Tinevez, D. J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak & A. Cardona (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods,* 9**,** 676-82.

Schwab, B., J. Mathur, R. Saedler, H. Schwarz, B. Frey, C. Scheidegger & M. Hülskamp (2003) Regulation of cell expansion by the DISTORTED genes in Arabidopsis thaliana: actin controls the spatial organization of microtubules. *Mol Genet Genomics,* 269**,** 350-60.

Spector, I., N. R. Shochet, D. Blasberger & Y. Kashman (1989) Latrunculins--novel marine macrolides that disrupt microfilament organization and affect cell growth: I. Comparison with cytochalasin D. *Cell Motil Cytoskeleton,* 13**,** 127-44.

Spector, I., N. R. Shochet, Y. Kashman & A. Groweiss (1983) Latrunculins: novel marine toxins that disrupt microfilament organization in cultured cells. *Science,* 219**,** 493-5.

Steinmann, T., N. Geldner, M. Grebe, S. Mangold, C. L. Jackson, S. Paris, L. Gälweiler, K. Palme & G. Jürgens (1999) Coordinated polar localization of auxin efflux carrier PIN1 by GNOM ARF GEF. *Science,* 286**,** 316-8.

Swarup, R., J. Friml, A. Marchant, K. Ljung, G. Sandberg, K. Palme & M. Bennett (2001) Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the Arabidopsis root apex. *Genes Dev,* 15**,** 2648-53.

Swarup, R., J. Kargul, A. Marchant, D. Zadik, A. Rahman, R. Mills, A. Yemm, S. May, L. Williams, P. Millner, S. Tsurumi, I. Moore, R. Napier, I. D. Kerr & M. J. Bennett (2004) Structure-function analysis of the presumptive Arabidopsis auxin permease AUX1. *Plant Cell,* 16**,** 3069-83.

Szymanski, D. B. (2009) Plant cells taking shape: new insights into cytoplasmic control. *Curr Opin Plant Biol,* 12**,** 735-44.

Tan, X., L. I. Calderon-Villalobos, M. Sharon, C. Zheng, C. V. Robinson, M. Estelle & N. Zheng (2007) Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature,* 446**,** 640-5.

Terasaka, K., J. J. Blakeslee, B. Titapiwatanakun, W. A. Peer, A. Bandyopadhyay, S. N. Makam, O. R. Lee, E. L. Richards, A. S. Murphy, F. Sato & K. Yazaki (2005) PGP4, an ATP binding cassette P-glycoprotein, catalyzes auxin transport in Arabidopsis thaliana roots. *Plant Cell,* 17**,** 2922-39.

Titapiwatanakun, B., J. J. Blakeslee, A. Bandyopadhyay, H. Yang, J. Mravec, M. Sauer, Y. Cheng, J. Adamec, A. Nagashima, M. Geisler, T. Sakai, J. Friml, W. A. Peer & A. S. Murphy (2009) ABCB19/PGP19 stabilises PIN1 in membrane microdomains in Arabidopsis. *Plant J,* 57**,** 27-44.

Ulmasov, T., G. Hagen & T. J. Guilfoyle (1997a) ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements. *Science,* 276**,** 1865-8.

Ulmasov, T., Z. B. Liu, G. Hagen & T. J. Guilfoyle (1995) Composite structure of auxin response elements. *Plant Cell,* 7**,** 1611-23.

Ulmasov, T., J. Murfett, G. Hagen & T. J. Guilfoyle (1997b) Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell,* 9**,** 1963-71.

Verna, C., S. J. Ravichandran, M. G. Sawchuk, N. M. Linh & E. Scarpella (2019) Coordination of tissue cell polarity by auxin transport and signaling. *Elife,* 8.

Vieten, A., S. Vanneste, J. Wisniewska, E. Benková, R. Benjamins, T. Beeckman, C. Luschnig & J. Friml (2005) Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression. *Development,* 132**,** 4521-31.

Volkmann, N., K. J. Amann, S. Stoilova-McPhie, C. Egile, D. C. Winter, L. Hazelwood, J. E. Heuser, R. Li, T. D. Pollard & D. Hanein (2001) Structure of Arp2/3 complex in its activated state and in actin filament branch junctions. *Science,* 293**,** 2456-9.

Wang, P., C. Richardson, C. Hawes & P. J. Hussey (2016) Arabidopsis NAP1 Regulates the Formation of Autophagosomes. *Curr Biol,* 26**,** 2060-2069.

Weijers, D., M. Franke-van Dijk, R. J. Vencken, A. Quint, P. Hooykaas & R. Offringa (2001) An Arabidopsis Minute-like phenotype caused by a semi-dominant mutation in a RIBOSOMAL PROTEIN S5 gene. *Development,* 128**,** 4289-99.

Welch, M. D., A. H. DePace, S. Verma, A. Iwamatsu & T. J. Mitchison (1997) The human Arp2/3 complex is composed of evolutionarily conserved subunits and is localized to cellular regions of dynamic actin filament assembly. *J Cell Biol,* 138**,** 375-84.

Welch, M. D. & R. D. Mullins (2002) Cellular control of actin nucleation. *Annu Rev Cell Dev Biol,* 18**,** 247-88.

Went, F. 1926. On growth-accelerating substances in the coleoptile of Avena sativa. In *Proc Kon Akad Wetensch Amsterdam*, 10-19.

Winter, D., T. Lechler & R. Li (1999) Activation of the yeast Arp2/3 complex by Bee1p, a WASP-family protein. *Curr Biol,* 9**,** 501-4.

Wisniewska, J., J. Xu, D. Seifertová, P. B. Brewer, K. Ruzicka, I. Blilou, D. Rouquié, E. Benková, B. Scheres & J. Friml (2006) Polar PIN localization directs auxin flow in plants. *Science,* 312**,** 883.

Won, C., X. Shen, K. Mashiguchi, Z. Zheng, X. Dai, Y. Cheng, H. Kasahara, Y. Kamiya, J. Chory & Y. Zhao (2011) Conversion of tryptophan to indole-3-acetic acid by TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASES OF ARABIDOPSIS and YUCCAs in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 108**,** 18518-23.

Wood, M. 2004. Statistical inference using bootstrap confidence intervals. In *Significance*, 180-182.

Woodward, A. W. & B. Bartel (2005) A receptor for auxin. *Plant Cell,* 17**,** 2425-9.

Wu, T. C., S. A. Belteton, J. Pack, D. B. Szymanski & D. M. Umulis (2016) LobeFinder: A Convex Hull-Based Method for Quantitative Boundary Analyses of Lobed Plant Cells. *Plant Physiol,* 171**,** 2331-42.

Yanagisawa, M., A. S. Desyatova, S. A. Belteton, E. L. Mallery, J. A. Turner & D. B. Szymanski (2015) Patterning mechanisms of cytoskeletal and cell wall systems during leaf trichome morphogenesis. *Nat Plants,* 1**,** 15014.

Yang, H., G. L. Richter, X. Wang, E. Młodzińska, N. Carraro, G. Ma, M. Jenness, D. Y. Chao, W. A. Peer & A. S. Murphy (2013) Sterols and sphingolipids differentially function in trafficking of the Arabidopsis ABCB19 auxin transporter. *Plant J,* 74**,** 37-47.

Yarar, D., W. To, A. Abo & M. D. Welch (1999) The Wiskott-Aldrich syndrome protein directs actin-based motility by stimulating actin nucleation with the Arp2/3 complex. *Curr Biol,* 9**,** 555-8.

Zádníková, P., J. Petrásek, P. Marhavy, V. Raz, F. Vandenbussche, Z. Ding, K. Schwarzerová, M. T. Morita, M. Tasaka, J. Hejátko, D. Van Der Straeten, J. Friml & E. Benková (2010) Role of PIN-mediated auxin efflux in apical hook development of Arabidopsis thaliana. *Development,* 137**,** 607-17.

Zazímalová, E., A. S. Murphy, H. Yang, K. Hoyerová & P. Hosek (2010) Auxin transporters--why so many? *Cold Spring Harb Perspect Biol,* 2**,** a001552.

Zhang, C., L. E. Halsey & D. B. Szymanski (2011) The development and geometry of shape change in Arabidopsis thaliana cotyledon pavement cells. *BMC Plant Biol,* 11**,** 27.

Zhang, C., E. L. Mallery & D. B. Szymanski (2013) ARP2/3 localization in Arabidopsis leaf pavement cells: a diversity of intracellular pools and cytoskeletal interactions. *Front Plant Sci,* 4**,** 238.

Zhao, Y. (2012) Auxin biosynthesis: a simple two-step pathway converts tryptophan to indole-3-acetic acid in plants. *Mol Plant,* 5**,** 334-8.

Zhao, Y., Z. Pan, Y. Zhang, X. Qu, Y. Yang, X. Jiang, S. Huang, M. Yuan, K. S. Schumaker & Y. Guo (2013) The actin-related Protein2/3 complex regulates mitochondrial-associated calcium signaling during salt stress in Arabidopsis. *Plant Cell,* 25**,** 4544-59.

Zhu, J. & M. Geisler (2015) Keeping it all together: auxin-actin crosstalk in plant development. *J Exp Bot,* 66**,** 4983-98.

Zou, J. J., Z. Y. Zheng, S. Xue, H. H. Li, Y. R. Wang & J. Le (2016) The role of Arabidopsis Actin-Related Protein 3 in amyloplast sedimentation and polar auxin transport in root gravitropism. *J Exp Bot,* 67**,** 5325-5337.