Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Experimentální biologie rostlin

Studijní obor: N-EBRBU

Bc. Mariia Voloshina

Interakce komplexu ARP2/3 s komponentami rostlinné sekretorické dráhy

ARP2/3 complex interaction with plant secretory pathway components

Diplomová práce

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

Praha, 2023

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, 25. 7. 2023 Podpis

Poděkování

Seznam lidí, kterým patří moje díky, je obrovský. Díky patří mé rodině a mým kamarádům, kteří mě podporovali v tom, co dělám. Díky patří všem, kdo nějak této práci přispěl metodologicky, hlavně kolektivům z laboratoře 210 a laboratoře buněčného růstu a diferenciace za pomoc z obecnými otázkami klonování nebo zavedením GoldenBraid2.0, kolektivů laboratoře konfokální mikroskopie za nápady při výrobě metod obrazové analýzy a zkušenost organizace workshopu. Samozřejmě bych chtěla poděkovat kolektivu laboratoře 203 jak za pomoc v budování této práce, tak i za přátelskou atmosféru.

Obzvlášť bych chtěla poděkovat Barboře Jelínkové za diskuze ohledně asi všeho možného, co se endomembrán a obrazové analýzy týče a za pomoc v provedení koimunoprecipitace. Muminkovi za pomoc s obrovským množstvím věcí v laboratoři. Petře Cifrové za podnětné diskuze o tom, proč děláme to, co děláme. Všem výše zmíněným, a také Loreně Huffer a Pepovi Haltufovi, za skvělá přátelství a podporu. Vaše přítomnost naučila mě nejen tomu, jak se dělá věda – ale jak být sebevědomá, jak si dát pauzu, jak se vyrovnat s neúspěchy ve výzkumu nebo i obecně v životě.

Také bych chtěla poděkovat své školitelce Kateřině Schwarzerové za ochotu, podporu a pomoc v budování této práce a obrovské množství zkušeností, které jsem během svého magisterského studia získala. Také děkují za pomoc v sepisování a editaci této práce.

Abstrakt

ARP2/3 je evolučně konzervovaný proteinový komplex, podílející se na nukleaci aktinu. U živočichů mutace podjednotek ARP2/3 je většinou letální. Oproti tomu *arp2/3* rostliny jsou životaschopné, ale mají několik morfologických defektů. Jedním z charakteristických fenotypických projevů *arp2/3* rostlin je narušená buněčná adheze. To naznačuje roli ARP2/3 komplexu v sekreci rostlinné buněčné stěny, hlavně její pektinové složky. Není však jasně, jaký je přesný molekulární mechanismus funkce ARP2/3 v této dráze. Předběžné výsledky naznačují možnou interakci ARP2/3 s proteiny sekretorické dráhy GNL1, COPI a COG. Tato práce kombinuje dvě metody – TIRFM/VAEM a koimunoprecipitaci – pro hodnocení míry kolokalizace a stanovení interakce ARP2/3 s vybranými markery. Interakce studovaných proteinů s ARP2/3 komplexem však v této práci prokázaná nebyla. Tato práce zároveň popisuje chování COPI, COG a GNL1 pomocí TIRFM/VAEM a naznačila možnou interakci GNL1 s endocytotickým markerem na plazmatické membráně.

Klíčová slova: ARP2/3, COPI, COG, GNL1, sekretorická dráha

Abstract

The ARP2/3 complex is an evolutionarily conserved protein complex involved in actin nucleation. In animals, the loss of function of ARP2/3 subunits is usually lethal. In contrast, *arp2/3* plants are viable and exhibit certain morphological defects. One of the characteristic traits of *arp2/3* plants is impaired cell adhesion. This suggests a role for the ARP2/3 complex in plant cell wall secretion, specifically pectins. However, the exact molecular mechanism of ARP2/3 function in this pathway has not been elucidated yet. Preliminary results suggest a possible interaction of ARP2/3 with the secretory pathway proteins GNL1, COPI, and COG. This work combines two methods – TIRFM/VAEM and co-immunoprecipitation – to study the interaction of ARP2/3 with selected markers. However, neither colocalization nor physical interaction was demonstrated. This work also characterises COPI, COG and GNL1 with TIRFM/VAEM and shows that there is an interaction between GNL1 and endocytic markers.

Key words: ARP2/3, COPI, COG, GNL1, secretory pathway

Obsah

Seznam zkratek 1
1. Úvod a cíle práce 4
2. Komplex ARP2/3 5
2.1 Membránová lokalizace komplexu ARP2/3 6
2.2 Význam komplexu ARP2/3 pro vývoj rostlin 8
3. Molekulární mechanismy regulace funkce rostlinné sekretorické dráhy 10
3.1 Anterográdní směr 12
3.2 Retrográdní směr 14
3.3 Post-Golgi transport 15
3.3.1 Exocytóza 17
3.3.2 Endocytóza 19
4. Sekrece polysacharidů buněčné stěny 21
4.1 Retrográdní dráha – COPI, COG3, GNL1 22
4.2 Exocyst 23
4.3 TPLATE 25
4.4 ARP2/3 25
5. Materiál a metody 26
5.1 Rostlinný materiál 26
5.2 Kultivace rostlin 26
5.3 Kultivace a transformace bakterií 27
5.4 Klonování 28
5.5 Transformace rostlin 32
5.6 Křížení 33
5.7 Izolace proteinů a koimunoprecipitace 33
5.8 Mikroskopie 34
4.9 Obrazová analýza 35
6. Výsledky 36
6.1 Výroba markerů GA 36
6.1.1 α2-COP-mCherry 36
6.2.1 COG3-mCherry 37
6.2 TIRFM analýza markerů GA a kolokalizace s ARP2/3 38
6.2.1 α2-COP-mCherry 39
6.2.2 COG2-GFP 40
6.2.3 GNL1 41
6.4 Koimunoprecipitace markerů GA a podjednotek ARP2/3 47
6.4.1 GNL1 a ARPC5 47

6.4.2 α2-COP a ARPC5 49
6.4.3 COG2 a ARPC5 50
7. Diskuze 52
7.1 Klonování COG3 a α2-COP 52
7.2 Mikroskopie COG2 a α2-COP 52
7.3 ARPC4-mCherry nelokalizuje v rovině TIRFM 54
7.4 GNL1 lokalizuje v rovině PM v podobě dynamických teček v TIRFM 54
7.5 Analýza kolokalizace GNL1 s TPLATE a EXO84b 56
7.6 Koimunoprecipitace GA markerů s komplexem ARP2/3 58
8. Závěry 59
Seznam literatury 60
Přílohy 1

Seznam zkratek

ABI – Abl-interacting protein

ANTH – AP180 N-Terminal Homology

AP1-4 – Adaptor protein 1-4

ARP2/3 – Actin related protein 2/3

BFA – Brefeldin A

BRK1 – BRICK1

CalS – Callose synthase, kalózasyntáza

CESA – Cellulose synthase, celulózasyntáza

CSC – Cellulose synthase complex

CME – Clathrin-mediated endocytosis, endocytóza závislá na klathrinu

COG – Conserved oligomeric Golgi

COPI, II – Coat protein I, II

CSC – Cellulose synthase complex

DCP1 – DECAPPING PROTEIN 1

DRP – Dynamin-related protein

ECL – Enhanced chemiluminescence

EE – early endosome, časný endozóm

ENTH – Epsin N-terminal homology

ER – Endoplazmatické retikulum

ERES – ER exit sites

ERGIC – The ER-Golgi intermediate compartment

FIJI – Fiji is just ImageJ

GA – Golgiho aparát

GI-TGN – Golgi Independent TGN, TGN nezávislá na Golgi

GECCO – Golgi Entry Core Compartment

GEF – Guanine exchange factor

GFP, YFP, RFP – green, yellow, red fluorescent protein

GN, GNL1-2 – GNOM, GNOM-LIKE1-2

HRP – Horseradish peroxidase

IPTG – isopropyl-β-D-thiogalaktosid

KanR – Kanamycinová rezistence

LatB – Latrunculin B

LE – late endosome, pozdní endozóm

MASC – Microtubule-associated cellulose synthase

MES – kyselina 2-(N-morfolino)-ethansulfonová

MTCs, – multisubunit tethering complexes

MVB – multivesucular body

NAP1 – Nck-Associated protein 1

NPF – Nucleation promoting factor

PEN1 – PENETRATION 1

PICL – PAMP-INDUCED COILED-COIL LIKE

PIN – PIN-FORMED

$PIP(4,5)_2$ – Fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát

PM – Plasma membrane, cytoplazmatická membrána

ROP – Rho of plants

SCAR – suppressor of cAMP receptor

SEC – Secretory mutant

SmaCC – small CESA compartments

SNARE – SNAP receptor

SPK1 – SPIKE1

SpmR – Spektinomycinová rezistence

SRA1 – SPECIFICALLY RAC1-ASSOCIATED

SYP – Syntaxin

TGN – *trans*-Golgi network, *trans*-Golgi síť

TIRFM – Total internal reflection fluorescence microscopy

TPC – TPLATE complex

TRAPPI-III – Transport Protein Particle I-III

VAEM – Variable-angle epifluorescence microscopy

VAMP – Vesicle-associated membrane protein

VCA – Verprolin-homology, central hydrophobic, acidic

VETH – Vesicle tethering

VHA – Vacuolar H^+ ATPase

VHS – Vps-27, Hrs, STAM

WAVE – WASP family verprolin homologous

WT – wild type, divoký typ

X-Gal – 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid

1. Úvod a cíle práce

Proteinový komplex ARP2/3 je jedním ze dvou známých rostlinných nukleátorů aktinového cytoskeletu. Rostliny, které nemají funkční komplex ARP2/, jsou typicky rozeznatelné podle jejich pokřivených trichomů. Role ARP2/3 ve vývoji trichomů je zároveň dlouhodobým předmětem výzkumu rostlinných biologů. Mutanty mají však i další projevy. Jedním z nich je narušená buněčná adheze epidermálních buněk. Předběžné a již publikované výsledky naší laboratoře ukazují, že ARP2/3 má význam v sekreci složek buněčné stěny. To může ovlivňovat buněčnou adhezi, která je většinou zajištěna pektiny. Není však jasně, v jakém kroku možné dráhy sekrece pektinů nebo enzymů, modifikujících pektiny, se ARP2/3 zúčastňuje.

Pektiny jsou syntetizované v Golgiho aparátu. Předběžné výsledky laboratoře naznačují fyzickou interakci ARP2/3 s několika komplexy, lokalizujícími na GA a podílejícími se na regulaci sekretorické dráhy a sekreci buněčné stěny (viz kapitola 3). MS/MS analýza ukázala, že ARP2/3 interaguje s podjednotkami COPI obalového komplexu a poutacího komplexu COG. Zároveň spojení s GA naznačuje to, že mutant *gnl1-1,* postradající o funkční ARF GEF GNL1, také má narušenou adhezi mezi epidermálními buňkami. ARF GEF GNL1 lokalizuje na GA a nejspíš působí ve stejné dráze jako COPI a COG.

Na druhou stranu ARP2/3 interaguje s poutacím komplexem exocyst, podílejícím se na fúzi exocytotických váčku s cytoplazmatickou membránou (Jelínková 2021). Zároveň ARP2/3 kolokalizuje s komplexem exocyst v rovině cytoplazmatické membrány. Jejich kolokalizace je detekovatelná pomoci metod TIRFM nebo VAEM.

Je proto zajímavou otázkou, jestli interakci ARP2/3 a komponent sekretorické dráhy lze popsat za využití podobné metodologie: TIRFM/VAEM a koimunoprecipitace, a jestli výsledky, dosažené těmito dvěma metodami, jsou komplementární.

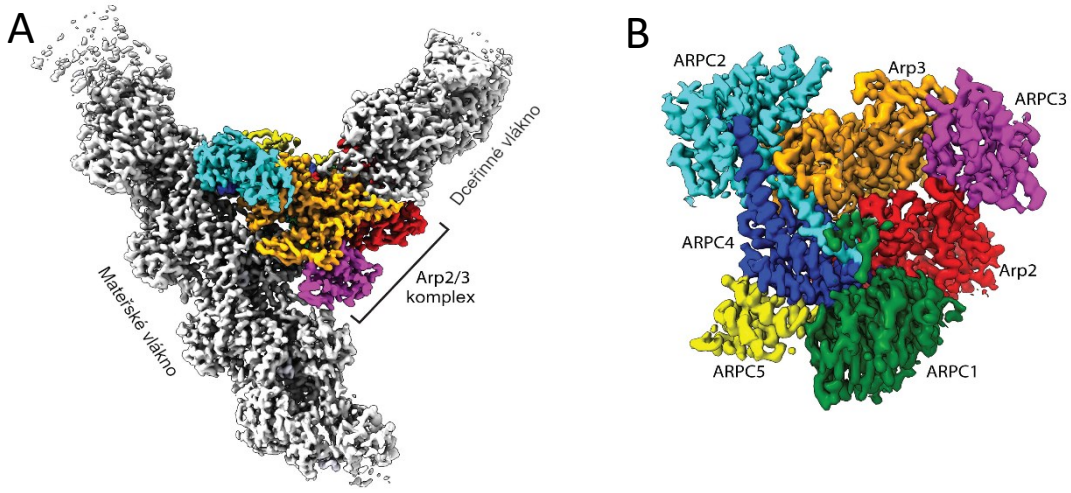
Cíle této práce jsou následující:

1. Výroba fluorescenčně značených markeru COPI a COG.
2. Charakterizace dynamiky GNL1, COPI a COG v rovině PM. Následná kolokalizace s ARP2/3.
3. Stanovení interakce GNL1, COPI a COG s ARP2/3 pomoci metod koimunoprecipitace.

2. Komplex ARP2/3

ARP2/3 (Actin-related protein 2/3) je proteinový komplex, podílející se na nukleaci aktinu. Skládá se ze sedmi podjednotek: ARP2 a ARP3, vykazujících homologii s aktinem (Muller *et al.* 2005), a ARPC1–5, konzervovaných napříč eukaryoty (Welch *et al.* 1997). Přesto, že struktura kanonického ARP2/3 komplexu byla popsána pomocí rentgenové krystalografie před 20 lety (Robinson *et al.* 2001), se nadále objevují práce o jeho rozmanitosti v různých organismech a buněčných kontextech (Pizarro-Cerdá *et al.* 2017)

Po nasednutí na mateřské aktinové vlákno ARP2/3 napomáhá tvorbě dceřiných vláken rozvětvených pod úhlem 70° (Mullins *et al.* 1998). U rostlin se předpokládá podobná funkce, což naznačuje např. pozorování ARP2 a ARP3 v místech větvení aktinových filament (Fišerová et al. 2006). Na molekulární úrovni je polymerace zajištěna konformační změnou ARP2 a ARP3, fungujících jako templát pro nascentní aktinové vlákno (Shaaban *et al.* 2020). Tato konformační změna je způsobena jak samotnou vazbou ARP2/3 na mateřské vlákno, tak i aktivátory ARP2/3, též známými jako NPFs (nucleation-promoting factors) (Shaaban *et al.* 2020; Ding *et al.* 2022). Struktura ARP2/3 a jeho nasednutí na aktinové vlákno jsou znázorněné na Obr.1 A–B.



*Obrázek 1: Struktura ARP2/3 komplexu na aktinovém vlákně (**A**) a struktura ARP2/3 komplexu (**B**), získané pomocí kryoelektronové mikroskopie. Upraveno podle Ding et al. 2022.*

NPFs jsou velkou skupinou proteinů, dělenou na dvě podtřídy: I a II (Goley a Welch 2006). Společným rysem NPFs I. třídy je přítomnost VCA domény (verprolin-homology, central hydrophobic, acidic), schopné vazby ARP2/3 a aktinu (Panchal *et al.* 2003;

Rottner *et al.* 2010). Tato poměrně rozmanitá skupina proteinů je v rostlinách zastoupená pouze heteromerním komplexem WAVE/SCAR (WASP family verprolin homologous/ suppressor of cAMP receptor), který se skládá z pěti podjednotek: ABI (Abl-interacting protein), SRA1 (SPECIFICALLY RAC1-ASSOCIATED), BRK1 (BRICK1), NAP1 (Nck-associated protein 1) a WAVE. Složení WAVE/SCAR a jeho interakce s ARP2/3 byly popsané i u *Arabidopsis thaliana* (Uhrig *et al.* 2007).

2.1 Membránová lokalizace komplexu ARP2/3

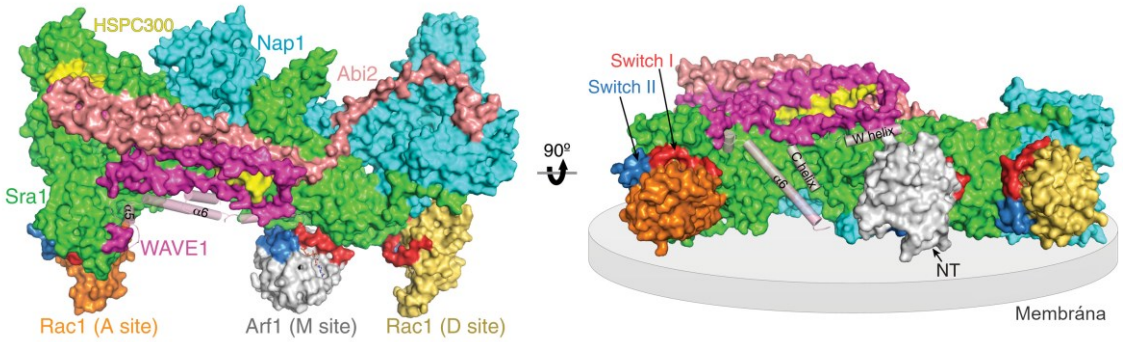
Role aktinového cytoskeletu a konkrétně ARP2/3 u opisthokont je spojována s např. modulaci membrán při endocytóze (Lamaze *et al.* 1997; Simon *et al.* 2019). Proto je důležité vědět, jestli ARP2/3 lokalizuje na membránách a co jeho lokalizaci ovlivňuje. Není však známá přímá interakce ARP2/3 a membrán. U opisthokont je prostorová organizace ARP2/3 na membránách zprostředkována některými z výše zmíněných NPF, vážícími přímo lipidy (Rohatgi *et al.* 2000; Oikawa *et al.* 2004; Dai *et al.* 2019) nebo GTPázy, zakotvené v membráně (Lechler *et al.* 2001; Steffen *et al.* 2004; Yang *et al.* 2022).

Co se ví o interakci ARP2/3 a membrán v rostlinné buňce? Zatím není jediný model, který by sjednotil všechny poznatky o tomto tématu. Na rozdíl od živočišného komplexu, který se vyskytuje v rozpustné formě a váže membrány po aktivaci příslušnými NPFs, rostlinný ARP2/3 vykazuje silnou asociaci s membránami (Kotchoni *et al.* 2009). Míra asociace ARP2/3 s membránami se snížila u *arp2/3* mutant, jejichž komplexu chybí některá podjednotka. Mutace *sra1* naopak asociaci ARP2/3 s membránami neovlivnila. To vedlo autory k závěru, že klíčová pro asociaci ARP2/3 s membránami není samotná aktivace pomocí WAVE/SCAR, ale to, jestli ARP2/3 je správně sestavený (Kotchoni *et al.* 2009). Z této práce však nelze uzavřít, jestli jde o přímou interakci různých podjednotek s membránami nebo interakci nepřímou přes nějaký další protein. Navíc to neznamená, že interakce s WAVE/SCAR není důležitá pro správnou lokalizaci ARP2/3, rozpustného nebo již navázaného na např. membrány jiných buněčných kompartmentů nebo organel. Např. v mutantním pozadí *nap1* ARP2/3 ztrácí polární lokalizaci na špičce trichomů (Yanagisawa *et al.* 2015). NPF WAVE/SCAR také periferně asociuje s plazmatickou membránou (PM), zejména v rozích, kde dochází ke kontaktu vícero epidermálních buněk nebo buněk primární kůry (Dyachok *et al.* 2008).

Jednou z dalších možných determinant lokalizace obou těchto komplexů je protein DCP1 (DECAPPING PROTEIN 1), vyskytující se v proteinových kondenzátech a přecházející na plazmatickou membránu fázovou separací v buňkách kořene (Liu *et al.* 2023). DCP1, ARP2/3 a WAVE/SCAR lokalizují v rozích expandujících kořenových buněk. Pří narušení lokalizace DCP1 dochází k narušené lokalizaci obou komplexů. DCP1 a WAVE/SCAR se zároveň ovlivňují navzájem, zatímco mutace *arpc5* nemá na prostorovou organizaci DCP1 skoro žádný vliv.

Dále pro membránovou lokalizaci WAVE/SCAR a ARP2/3 během napadení patogeny a tvorby papily může být důležitá interakce $PIP(4,5)_2$ (fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát) a WAVE/SCAR (Qin *et al.* 2021). Lokalizace obou komplexů se výrazně lišila u mutant s narušenou syntézou $PIP(4,5)_2$. Není jasné, jaká podjednotka WAVE/SCAR by mohla tyto lipidy vázat: v jiných systémech tuto roli plní podjednotky NAP1 a SRA1 (Chen *et al.* 2010).

Živočišný WAVE/SCAR navíc je schopný interakce s GTPázami Arf1 a Rac1. Aminokyselinové zbytky, důležité pro interakci s Arf1 GTPázou u živočichů, nejsou u rostlin konzervované (Yang *et al.* 2022). Jsou však známe dvě rostlinné ROP (Rho-of-plants) GTPázy, homologní s Rac1 GTPázou: ROP2 a ROP8, jejichž interakce s WAVE/SCAR byla prokázána pomocí biochemických metod (Basu *et al.* 2004, 2005; Uhrig *et al.* 2007). U rostlin je rovněž znám ROP GEF (guanine exchange factor) SPIKE1 (SPK1), aktivující ROP2 GTPázu a zároveň interagující s WAVE/SCAR (Basu *et al.* 2008; Ren *et al.* 2016). Ví se, že *spike1* rostliny mají narušenou membránovou lokalizaci WAVE/SCAR a ARP2/3 (Yanagisawa *et al.* 2018). SPK1 váže různé záporně nabité fosfolipidy, což může být pro organizaci WAVE/SCAR a ARP2/3 na membránách důležité (Mallery *et al.* 2022). Struktura a vazba živočišného WAVE komplexu je znázorněná na obrázku 2.

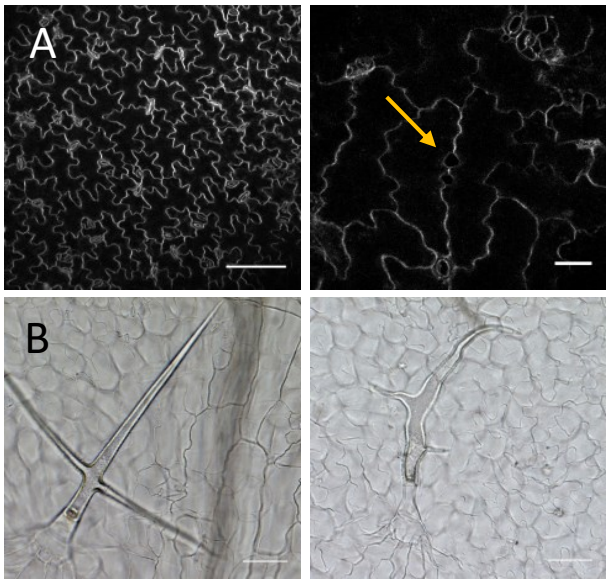


Obrázek 2: Struktura živočišného WAVE komplexu s vazebnými místy pro Rac1 (oranžová, žlutá) a Arf1 GTPázy (šedá) a model jeho vazby na membrány; s membránou interagují hlavně Sra1 (zelená) a Nap1 podjednotky (tyrkysová). Tato struktura byla získaná pomocí kryoelektronové mikroskopie. Upraveno podle Yang *et al.* 2022.

2.2 Význam komplexu ARP2/3 pro vývoj rostlin

Zatímco nepřítomnost funkčního ARP2/3 u kvasinek vede k letalitě buněk (Schwob a Martin 1992), toto není případem u rostlin. Nejvýraznějšími fenotypickými projevy těchto mutací u *Arabidopsis* jsou pokřivené trichomy pravých listů a narušená morfologie epidermálních buněk (Mathur *et al.* 2003 a, b; Le *et al.* 2003; Li *et al.* 2003). Dalším projevem je narušená adheze mezi buňkami epidermis a hypokotylu. Výjimkou je mutace *arpc3*, pro kterou tyto projevy nejsou charakteristické (Bellinvia et al. 2022). Tyto fenotypické projevy (Obr.3 A-B) přetrvávají nejen u mutant podjednotek ARP2/3, ale i jeho aktivátoru WAVE/SCAR (Brembu *et al.* 2004; Deeks *et al.* 2004).

Přesto, že jsou tyto mutanty dobře popsané, není úplně jasná molekulární podstata funkce ARP2/3 v buněčné morfogenezi. Nejvíc pokročilý je výzkum role ARP2/3 a aktinového cytoskeletu v morfogenezi trichomů. Bylo ukázáno, že u mutant *arp2* a *arpc5* nedochází ke tvorbě sítě z aktinových filament ve špičce vyvíjejících se trichomů (Yanagisawa *et al.* 2015). To nejspíš má vliv na správnou dopravu sekretorických endomembránových kompartmentů a polarizovanou sekreci polysacharidů nebo proteinů buněčné stěny.



*Obrázek 3: Epidermis pravých listů Arabidopsis: WT (vlevo), arpc5 (vpravo). Šípka ukázuje na místo s narušenou buněčnou adhezí (**A**). Trichomy Arabidopsis WT (vlevo) a arpc5 (vpravo) (**B**). Měřítko – 50 um. Upraveno dle Cifrová et al., 2020.*

Neví se, zda je role ARP2/3 v jiných buňkách a procesech tomu analogická. ARP2/3 zřejmě má vliv na transport auxinových přenašečů PIN (PIN-FORMED) a jejich vzájemná souhra ovlivňuje velikost a tvar pokožkových buněk pravých listů (García-González *et al.* 2020). Organizace a dynamika aktinových filament v těchto buňkách se u *arpc5* a *arp2* mutant liší od rostlin divokého typu (Cifrová *et al.* 2020). Rozdíl však není velký.

ARP2/3 má vliv na bazální hladinu syntaxinu PEN1 (PENETRATION 1) na plazmatické membráně (Qin *et al.* 2021). PEN1 se podílí na obraně vůči patogenům. Imunitní odpověď není závislá na *de novo* syntéze PEN1 během infekce, nýbrž na jeho internalizaci z PM a recyklaci na místo tvorby papily (Nielsen *et al.* 2012). Autoři předpokládají, že ARP2/3 ovlivňuje především internalizaci a transport PEN1 k místu tvorby papily a chod obecné endocytózy (Qin *et al.* 2021). Spojení s endocytózou naznačuje snížený počet endozómů, označených barvivem FM4-64. Mutace také má vliv na organizaci aktinu kolem tvořící se papily, a zvyšuje úspěšnost penetrace patogenem.

Spojení ARP2/3 s endocytózou je však kontroverzní téma. Recentní výzkum ukazuje, že vznik endocytotického váčku obaleného klathrinem nevyžaduje aktin (Narasimhan *et al.* 2020). Opačná je situace u kvasinek, u kterých aktin je pro vykonání tohoto kroku endocytózy nezbytný (Kaksonen *et al.* 2005). Narasimhan *et al.* 2020 však spojují aktin s transportem endocytotického váčku do časného endozómu. Na druhou stranu byla popsaná interakce komplexu ARP2/3 a podjednotky AtEH1/Pan1 TPLATE komplexu (Wang *et al.* 2019), podílejícího se na rostlinné endocytóze závislé na klathrinu (Gadeyne *et al.* 2014).

Tato interakce je zároveň interpretovaná ve světle autofágie: předpokládá se role TPLATE komplexu v tvorbě autofagozómů v místech kontaktu PM a endoplazmatického retikula (ER), konkrétně endocytóze nákladů (Wang *et al.* 2019). Zároveň roli ARP2/3 v tvorbě autofagozómů naznačují kolokalizace NAP1, podjednotky WAVE/SCAR, s markery autofagozómů a narušená autofágie u *nap1* rostlin (Wang *et al.* 2016). Není proto jasné, jak se může rostlinný komplex ARP2/3 na těchto procesech podílet.

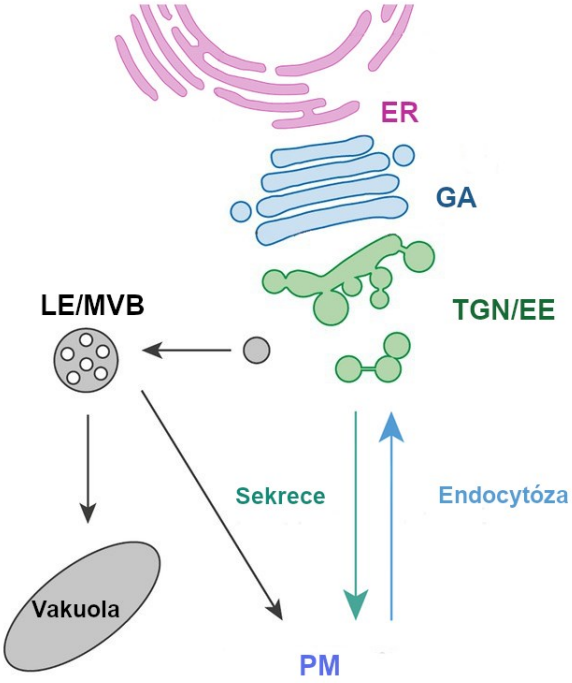
3. Molekulární mechanismy regulace funkce rostlinné sekretorické dráhy

Endomembránový systém hraje důležitou roli v sekreci a cyklování materiálu v buňce. Na jeho správném fungování je závislé velké množství procesů, týkajících se jak růstu a vývoje buňky, tak i její komunikace s okolím například pří napadení patogeny. Jedním ze mnoha procesů, inherentně závislých na endomembránách, je sekrece složek buněčné stěny, viz kapitola 4. Eukaryotický endomembránový se skládá z endoplazmatického retikula (ER), Golgiho aparátu (GA), *trans*-Golgi sítě (*trans*-Golgi network, TGN), endosomálního kompartmentu a lytického kompartmentu, kterým je vakuola (Obr. 3). Rostlinný endomembránový systém je podobný živočišnému, ale zároveň se liší v několika základních rysech, které budou zmíněné v následujících kapitolách.

Transport z jednoho kompartmentu do druhého je regulován na více úrovních pomocí proteinů, specifických pro určité dráhy nebo buněčné procesy. První z úrovní je rozpoznávání nákladů díky určitým sekvenčním motivům a tvorba váčků s nákladem pomocí specifických multimerických komplexů (Arora a Damme 2021). K této skupině patří např. obalové komplexy COPI (coat protein I) a COPII a adaptérové proteiny AP1-4 (Adaptor protein) a TPLATE komplex. Některé z těchto komplexů mívají shodné strukturní motivy a jsou evolučně příbuzné (Rout a Field 2017).

Sestavení nebo vazbu těchto multimerických komplexů na membrány regulují malé GTPázy Sar1 a Arf1 (Yorimitsu *et al.* 2014). Tyto malé GTPázy se vyskytují ve dvou stavech. V aktivním stavu GTPázy vážou GTP a asociují s membránami, zatímco v neaktivním stavu dochází k hydrolýze GTP na GDP a konformační změně, která vede k lokalizaci v cytosolu. Aktivaci, to jest výměnu GDP za GTP, zprostředkují GEF (Gunanine Exchange Factor) proteiny. Inaktivaci katalyzují GAP (GTPase Activating Protein) proteiny. Kromě vazby obalových proteinů, je aktivita Arf-GTP a Sar-GTP spojovaná se zakřivením membrán při tvorbě váčků (Lee *et al.* 2005; Beck *et al.* 2008). U *Arabidopsis*

najdeme 4 Sar1 a 12 Arf1 homologů, ale jejichž možná subfunkcionalizace nebo naopak redundance není zatím detailně prozkoumaná (Yorimitsu *et al.* 2014).



Obrázek 4: Zjednodušené schéma rostlinného endomembránového systému. Barevně jsou označené kompartmenty a procesy, probírané v této práci. ER, endoplazmatické retikulum; GA, Golgiho aparát; TGN/EE, trans-Golgi network/early endosome; PM, cytoplazmatická membrána; LE/MVB, late endosome/multivesicular body. Upraveno dle Ito a Boutté 2020.

Význam pro tvorbu váčku také mají monomerické proteiny, obsahující ENTH (epsin N-terminal homology), ANTH (AP180 N-Terminal Homology) nebo VHS (Vps-27, Hrs, STAM) domény. ENTH/ANTH domény vážou určité membránové lipidy a nejspíš pomáhají tvorbě zakřivení membrány ve mnoha organismech (Ford *et al.* 2001; Itoh *et al.* 2001), zatímco VHS doména zprostředkuje interakce mezi proteiny při tvorbě váčků s nákladem (Lohi a Lehto 1998). *Arabidopsis* má 53 proteinů s těmito doménami, ale zdaleka ne všechny byly popsané na funkční úrovni (Zouhar a Sauer 2014). Zouhar a Sauer 2014 však navrhují následující zjednodušenou klasifikaci: ENTH proteiny se podílejí na různých aspektech post-Golgi transportu, ANTH na endocytóze, a VHS proteiny na transportu nákladu, určeného pro degradaci, do vakuoly.

Další úroveň regulace je rozpoznávání váčku a jeho fúze s cílovým kompartmentem. Na povrchu váčků a cílových membrán najdeme speciální SNARE (SNAP receptor)

proteiny, které spolu vytvářejí komplex a tím podporují membránovou fúzi. SNARE komplex se skládá ze 4 SNARE proteinů – 3 na membráně váčku a 1 na cílové membráně (Sutton *et al.* 1998; Antonin *et al.* 2002). Struktura SNARE komplexu je velice konzervovaná. *Arabidopsis* má 54 SNARE homologů, které lokalizují do různých buněčných kompartmentů (Uemura *et al.* 2004).

Tvorba SNARE komplexu je regulovaná Rab GTPázami, ale to není jediná funkce Rab GTPáz. Předpokládá se jejich význam ve třídění nákladů, odstranění obalů z váčků, pohybu váčků a jejich fúzi s cílovými membrány (Stenmark 2009). Na rozdíl od výše zmíněných Arf1 a Sar1 GTPáz, asociace Rab GTPáz s membránami je zajištěna přidáním geranylgeranylové kotvy. V aktivovaném stavu Rab GTPázy vážou velkou škálu různých efektorů. Rab GTPázy jsou konzervované napříč eukaryoty (Pereira-Leal a Seabra 2001). U *Arabidopsis* najdeme 57 genů kódujících Rab GTPázy, které se na základě homologie dělí na 8 skupin RabA–H, působící v různých buněčných kompartmentech (Rutherford a Moore 2002). Některé z nich jsou unikátní jenom pro rostliny, a předpokládá se, že plní rostlinně specifické funkce (Ueda 2001).

Dalšími hráči ve finálních krocích vezikulárního transportu jsou tzv. poutací faktory. Podle své struktury jsou seřazené do dvou širokých skupin: vícepodjednotkové poutací komplexy (MTCs, multisubunit tethering complexes) a dlouhé coiled-coil proteiny (Yu a Hughson 2010). Je však stále otázkou, co většina poutacích faktorů dělá na molekulární úrovni, a jestli opravdu napomáhají přiblížení dvou membrán k sobě tím, že interagují s proteiny na cílové membráně a na zachycovaném váčku. To je definice poutacího faktoru, kterou navrhují Brunet a Sacher 2014. U některých coiled-coil faktorů to bylo ukázáno (Witkos a Lowe 2016). Některé poutací faktory plní roli Rab GEF, což je třeba příkladem TRAPPI–III (Transport Protein Particle) komplexů (Cai *et al.* 2008). Proto nelze uvažovat o jediné obecné funkci, kterou tyto faktory plní.

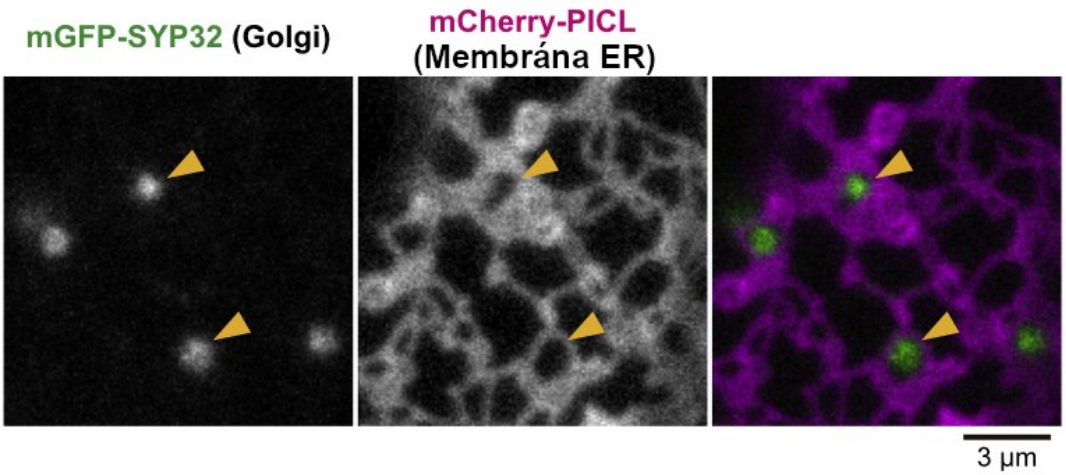
V následujících kapitolách budou podrobněji popsané jednotlivé směry sekretorické dráhy se zřetelem na vybrané procesy, jejichž markery byly v využity v této diplomové práci nebo zapadají do její tematiky.

3.1 Anterográdní směr

Anterográdní směr vyznačuje transport proteinů a membrán z ER do GA. U eukaryot je obecně přijímán model transportu materiálu ve váčcích, závislých na obalovém komplexu COPII. K sestavení COPII obalu dochází v morfologicky odlišných místech na membráně ER, kterým se říká ER exit sites (ERES) (Bannykh *et al.* 1996). Minimální

COPII se *in vitro* skládá ze třech opakujících se podjednotek: hetero-oligomerů SEC23/24 (secretory mutant) a SEC13/31 a GTPázy Sar1 (Barlowe et al. 1994), která již byla zmíněná výše a plní regulační funkci. Základní podjednotky COPII najdeme u všech eukaryot včetně rostlin, u kterých navíc došlo k expanzi příslušných genových rodin (Schlacht a Dacks 2015). Vzhledem ke zvýšenému počtu izoforem se předpokládá funkční divergence mezi různými podjednotkami. Experimentálně to bylo naznačeno u např. Sar1 GTPáz, vykazujících různou lokalizaci (Hanton *et al.* 2008; Zeng *et al.* 2015).

Rostlinný endomembránový systém je navíc specifický tím, že místo jednoho stabilního kompartmentu GA najdeme více pohyblivých diktyosomů. Kvůli tomuto rozdílu se velká část výzkumu věnuje dynamice ER, ERES a GA. Některé práce popisují dva pohyblivé kompartmenty, vykazující dynamickou kolokalizaci (daSilva *et al.* 2004; Stefano *et al.* 2006). Rovněž byla zaznamenaná i transientní interakce ERES a GA (Yang *et al.* 2005). Recentní výzkum navrhuje model *capture-and-release*: ERES existuje ve volném stavu na membráně ER nebo v asociaci s GA (Takagi *et al.* 2020). ER a ERES obklopují a zachycují diktyosomy (Obr. 5). Pak dochází k uvolnění diktyosomů a recyklaci ERES.



Obrázek 5: Vzájemná lokalizace GA, označeného mGFP-SYP32 (syntaxin), a ER, označeného mCherry-PICL (PAMP-INDUCED COILED-COIL LIKE). Upraveno dle Takagi et al. 2020.

V živočišné buňce najdeme intermediální kompartment mezi ER a GA (Appenzeller-Herzog a Hauri 2006), kterému se říká ERGIC (The ER-Golgi intermediate compartment). Je to nepohyblivý kompartment, ve kterém dochází k třídění proteinů a jejich případnému retrográdnímu transportu zpět do ER, které bude probrán v následující kapitole (Ben-Tekaya *et al.* 2005). Jedním z nástrojů výzkumu ERGIC je použití Brefeldinu A (BFA). V živočišných buňkách BFA způsobuje fúzi GA s ER, ale ERGIC s ER nesplývá (Lippincott-Schwartz *et al.* 1990). U rostlin byla popsaná struktura, která

se při aplikaci BFA chová podobně jako ERGIC (Ito *et al.* 2012, 2017). Tato struktura byla pojmenovaná GECCO (Golgi Entry Core Compartment).

Poměrně málo se ví o regulátorech fúze váčků v rostlinné anterográdní dráze. S anterográdní dráhou jsou spojované RabB a RabD GTPázy což bylo v případě některých homologů demonstrováno i experimentálně (Saint-Jore *et al.* 2002; Pinheiro *et al.* 2009). Homolog RabD v kvasinkách je aktivován TRAPPI komplexem (Cai *et al.* 2008). TRAPPI je velmi konzervovaný celou eukaryotickou říší a jeho podjednotky najdeme i u rostlin (Koumandou *et al.* 2007). O SNARE proteinech jsou také většinou fragmentární poznatky. Není znám celý SNARE komplex, fungující v anterográdní dráze. Předchozí snaha odhalit celý SNARE komplex nebyla úspěšná (Fujiwara *et al.* 2014).

3.2 Retrográdní směr

Retrográdní směr se týká zpátečního třídění proteinů a membrán mezi Golgi cisternami nebo GA a ER. Současný model GA cisteren předpokládá, že dochází k jejich postupné maturaci od *cis*- k *trans*-Golgi. Proto jedním z účelů retrográdní dráhy by bylo udržování proteinové homeostázy jednotlivých cisteren. Druhým by byl návrat rezidentních ER proteinů do ER.

Retrográdní transport je závislý na COPI váčcích. COPI obal se skládá ze sedmi podjednotek: α, β, β', γ, δ, ε a ζ-COP (Waters *et al.* 1991; Hara-Kuge *et al.* 1994). V rostlinné buňce byly popsané dvě různé populace COPI váčků, které se liší svou morfologii: COPIa a COPIb (Donohoe *et al.* 2007). COPIa váčky byly pozorované mezi ER a GA, zatímco COPIb – mezi jednotlivými cisterny GA. U Arabidopsis všechny podjednotky kromě γ a δ mají více izoforem (Robinson *et al.* 2007). Není známo, jestli se tyto podjednotky inkorporují do různých subkomplexů, a jestli jsou specifické pro různé druhy COPI váčků. Můžou plnit různé funkce v jiných typech buněk nebo pletiv. Mutanty různých podjednotek můžou vykazovat odlišné fenotypy, např. *α2-cop* má mnohem výraznější fenotyp než *α1-cop* (Gimeno-Ferrer *et al.* 2016). Na druhou stranu mutanty *β'-cop* nemají výrazný fenotyp oproti dvojitým mutantům, což naznačuje jejich funkční redundanci (Sánchez-Simarro *et al.* 2020).

Proteinový náklad, který se udržuje v ER nebo Golgi, je opatřen charakteristickými aminokyselinovými motivy: např. dilysinovým motivem (Jackson *et al.* 1990), KXD/E motivem (Woo *et al.* 2015), KDEL/HDEL motivem (Ozawa a Muramatsu 1993; Janson *et al.* 1998). Tyto motivy můžou být rozpoznávané podjednotkami COPI obalu (Jackson *et al.* 2012) nebo specifickými receptory (Xu a Liu 2012).

Tvorbu COPI vačku reguluje Arf1 GTPáza. Dobře prozkoumaným ARF GEF je GN (GNOM), který rovněž má dva homology – GNL1 (GNOM-LIKE1) a GNL2 (Richter *et al.* 2007). Zatímco GNL2 je specifický pro pyl, GNL1 je exprimován v celé rostlině. GN a GNL1 byly lokalizované v různých doménách GA cisteren pomocí metod superrezoluční mikroskopie (Naramoto *et al.* 2014). To naznačuje určitou divergenci těchto dvou proteinů a možnou specificitu GA domén. GN i GNL1 vytvářejí homodimery (Anders *et al.* 2008; Brumm *et al.* 2022). Mechanismus jejich dimerizace a aktivace Arf1 je předmětem několika recentních publikací (Brumm *et al.* 2020, 2022). O možné funkci této proteinu mimo retrográdní dráhu je zmíněno v kapitole 3.1.

Jsou známé dva poutací faktory, podílející se na retrográdním transportu. Trimerický Dsl1 komplex lokalizuje na membránách ER a reguluje transport z GA do ER (Kraynack *et al.* 2005). Tento komplex byl popsán i u *Arabidopsis* (Li *et al.* 2013). Druhý poutací komplex COG (Conserved Oligomeric Golgi) reguluje transport mezi jednotlivými Golgi cisterny. Je zároveň předmětem této práce, a proto bude popsán detailněji v následujícím odstavci.

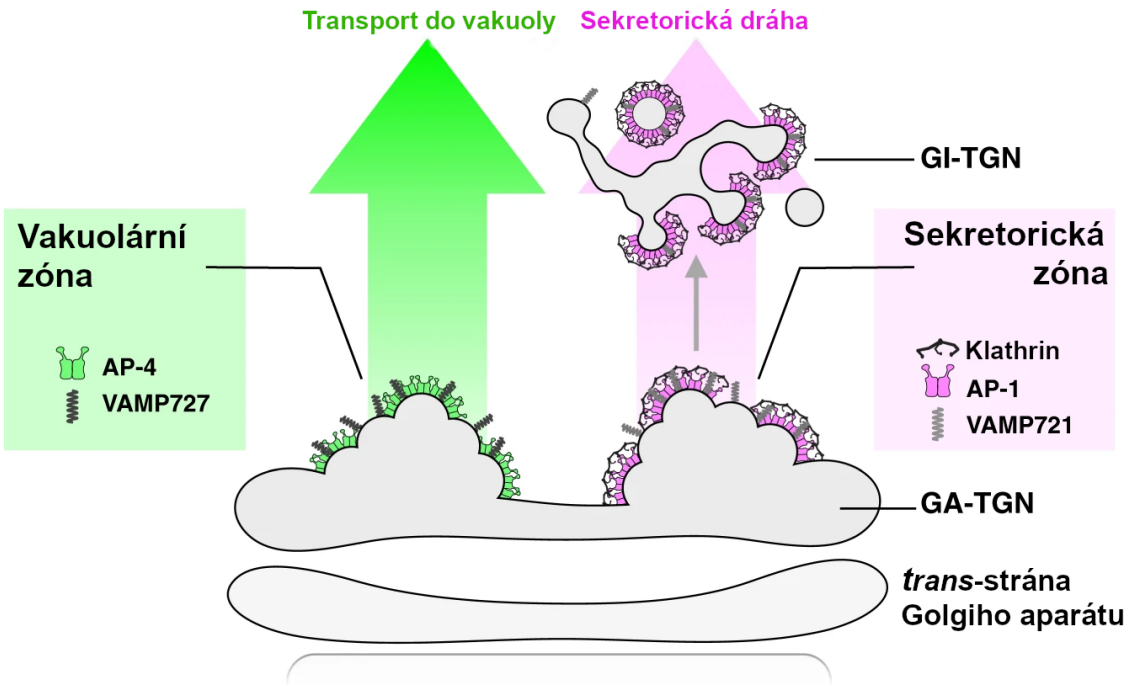
COG je oktamerický komplex, který se skládá ze dvou heterotrimerů: COG2/3/4 a COG5/6/7, spojených mezi sebou heterodimerem COG1/8 (Ungar *et al.* 2002, 2005). Interakce COG se SNARE proteiny na membránách GA, Rab GTPázami nebo podjednotkami COPI byla demonstrovaná u savců a kvasinek (Suvorova *et al.* 2002; Laufman *et al.* 2013). V genomu *Arabidopsis* byly nalezené geny, kódující všechny podjednotky COG. Rovněž jsou publikované práce, které popisují mutanty *cog7* (Ishikawa *et al.* 2008), *cog6* (Rui *et al.* 2020), *cog3* a *cog8* (Tan *et al.* 2016), které budou zmíněny v dalších kapitolách. Zajímavé také je, že v rostlinách byla popsána interakce COG a exocystu, dalšího poutacího komplexu, pří depozici sekundární buněčně stěny (Oda *et al.* 2015; Vukašinović *et al.* 2017).

3.3 Post-Golgi transport

Jednou ze specifik rostlinného endomembránového systému je morfologie a dynamika TGN. V TGN dochází ke třídění materiálu a jeho dopravě do jiných kompartmentů. Kromě role v sekreci materiálu funguje rostlinný TGN jako časný endozóm (Dettmer *et al.* 2006; Viotti *et al.* 2010). TGN se zároveň vyskytuje ve dvou formách: asociovaný s GA (GA-TGN) a volný TGN (GI-TGN, Golgi Independent). GA-TGN vzniká z trans-Golgi cisteren. GI-TGN vzniká z GA-TGN (Kang *et al.* 2011; Uemura *et al.* 2014). Byla také pozorovaná zpětná asociace volného TGN s GA (Viotti et al. 2010)

Tyto dva typy TGN jsou spojené s různými procesy. GI-TGN je důležitý pro sekreci materiálu a imunitní odpověď, kdežto v GA-TGN najdeme internalizovaný náklad (Uemura *et al.* 2019). Částečná nebo žádná kolokalizace TGN markerů znázorňuje jeho různorodost a možné rozdělení na různé subdomény na základě jejich funkce v sekreci, internalizaci materiálu nebo transportu do vakuoly (Chow *et al.* 2008; Teh *et al.* 2013; Fuji *et al.* 2016; Heinze *et al.* 2020; Shimizu *et al.* 2021). Rozmanitost TGN také reflektuje to, že došlo k expanzi proteinových rodin, které se podílejí na různých typech sekrece a udržování morfologie TGN, např. Rab GTPázy (Vernoud *et al.* 2003) nebo SNARE proteiny (Sanderfoot *et al.* 2000).

Zajímavá je práce Shimizu *et al.* 2021, která se věnuje superrezoluční mikroskopii dvou rozdílných zón TGN, značených adaptérovými proteiny AP-1 (sekretorická a endocytotická zóna) a AP-4 (vakuolární zóna). Obě zóny částečně kolokalizují se SYP61 a VHA-a1 (Vacuolar H^+ ATPase), dalšími známými markery TGN (Dettmer *et al.* 2006; Drakakaki *et al.* 2012), ale zároveň vykazují vlastní dynamiku v čase. Dalšími markery sekretorické zóny jsou SNARE VAMP721 a klathrin. Částečnou kolokalizaci s touto zónou v čase vykazuje i výše zmíněny SYP61. Model dvou zón TGN znázorňuje obr.6.



Obrázek 6: Schéma dvou možných zón TGN, vytvořené na základě kolokalizace různých markerů. Upraveno dle Shimizu et al. 2021.

Dalšími známými markery TGN jsou např. RabA GTPázy, které také značí jeho různé kompartmenty a podílí se na jiných procesech (Vernoud *et al.* 2003). Např. RabA4b lokalizuje jak v GA-TGN, tak i v GI-TGN, a vykazuje kolokalizaci se SYP61 a VHAa-a1

(Kang *et al.* 2011). Jiné RabA GTPázy vykazují jenom částečnou kolokalizaci s VHAa-a1 (Chow *et al.* 2008). Mohlo by být zajímavé studovat, jak se lokalizace RabA4b vztahuje k těmto dvou zónám.

Předpokládá se, že RabA GTPázy jsou aktivované TRAPPII komplexem, který zároveň funguje jako poutací komplex. TRAPPII sdílí základní podjednotky s TRAPPI, ale čtyři podjednotky navíc existují v kvasinkách (Choi *et al.* 2011) a tři u savců. Význam TRAPPII jako RAB GEF pro post-Golgi transport se ukazuje u kvasinek, tak i rostlin (Kalde *et al.* 2019).

Na závěr lze říct, že TGN je různorodý endomembránový kompartment, ve kterém se děje více procesů, a který má více tvarů a markerů. Další dvě kapitoly se budou zabývat dvěma takovými procesy, zapadajícími do problematiky této diplomové práce – endocytózou a exocytózou.

3.3.1 Exocytóza

Exocytóza je velice komplikované téma a shrnutí všech její aspektů a možných drah je nad rámec této diplomové práce. Exocytóza je komplikovaná i tím, že není jediný buněčný kompartment, ze kterého můžou vznikat váčky, směřující k PM (Žárský *et al.* 2009). Tato kapitola se bude převážně zabývat váčky z TGN.

Jedním z markerů sekretorické zóny je již zmíněný AP-1 komplex (Shimizu *et al.* 2021). S AP-1 kolokalizují a interagují EPSIN1 a klathrin (Song *et al.* 2006; Dahhan *et al.* 2022). Role klathrinu v endocytóze bude diskutovaná dále. Dynamickou kolokalizaci s AP-1 též vykazuje SNARE protein VAMP721 (Vesicle-associated membrane protein) (Shimizu et al. 2021).

VAMP721 vytváří ternární komplex s dalšími SNARE proteiny VAMP722, SNAP33 (Soluble NSF attachment protein) a SYP121 (Pang *et al.* 2022). Předpokládá se role tohoto komplexu ve fúzi exocytotického váčku s plazmatickou membránou. Jeho sestavení je regulováno GTPázou RABA2a. Dalším možným regulátorem sestavení tohoto SNARE komplexu může být poutací komplex exocyst (Larson et al. 2020). Nicméně v literatuře najdeme protikladné závěry o tom, zda exocyst interaguje s těmito SNARE nebo ne (Larson et al. 2020; Pang et al. 2022).

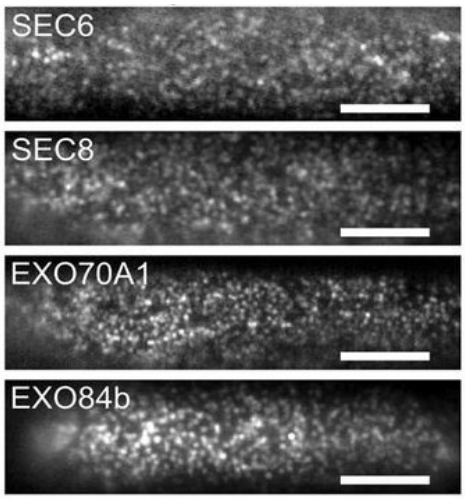
Poutací komplex exocyst je dobře prozkoumaná složka sekretorické dráhy. Tento konzervovaný komplex se skládá z osmi podjednotek: SEC3, SEC5, SEC6, SEC8, SEC10, SEC15, EXO70, a EXO84 (Hála *et al.* 2008; Fendrych *et al.* 2010). Rostlinný

exocyst je unikátní v několika aspektech. U rostlin došlo k expanzi podjednotek EXO84, SEC15 a EXO70. Rostlinná podjednotka EXO70 má desítky paralogů seřazených do třech podrodin (Cvrčková et al. 2012; Žárský et al. 2020). U rostlin podjednotka EXO70 zároveň zajišťuje lokalizaci exocystu na plazmatické membráně: jsou známé specifické aminokyselinové zbytky na C-konci EXO70A1, vážící membránové lipidy (Synek et al. 2021).

Exocyst je významný ve mnoha procesech, spojených s polarizovanou sekrecí; některé z nich budou zmíněné v následujících kapitolách. Na molekulární úrovni se předpokládá, že exocyst např. reguluje tvorbu SNARE komplexu, což již bylo zmíněného výše.

V této práci jako marker exocystu a exocytotických dějů byla použitá podjednotka EXO84b, označená RFP. Rostlinná podjednotka EXO84b byla popsaná v kontextu sekrece buněčné přepážky (Fendrych et al. 2010). Mutantní rostliny *exo84b* jsou zakrslé a sterilní. V epidermálních buňkách pravých listů dochází k akumulaci váčku, což ukazuje na význam pro sekreci. Zároveň tyto rostliny mají nedokončenou buněčnou přepážku. Předpokládá se, že poutací komplex exocyst je důležitý pro určité kroky tvorby buněčné přepážky: iniciaci a maturaci (Rybak *et al.* 2014).

Na PM lze detekovat dynamickou lokalizaci podjednotek exocystu, pozorovatelnou pomoci TIRFM (Total internal reflection fluorescence microscopy) nebo VAEM (Variable angle fluorescence microscopy) (Obr. 7) (Fendrych *et al.* 2013). Podobnou dynamiku vykazuje též SNARE protein VAMP721.

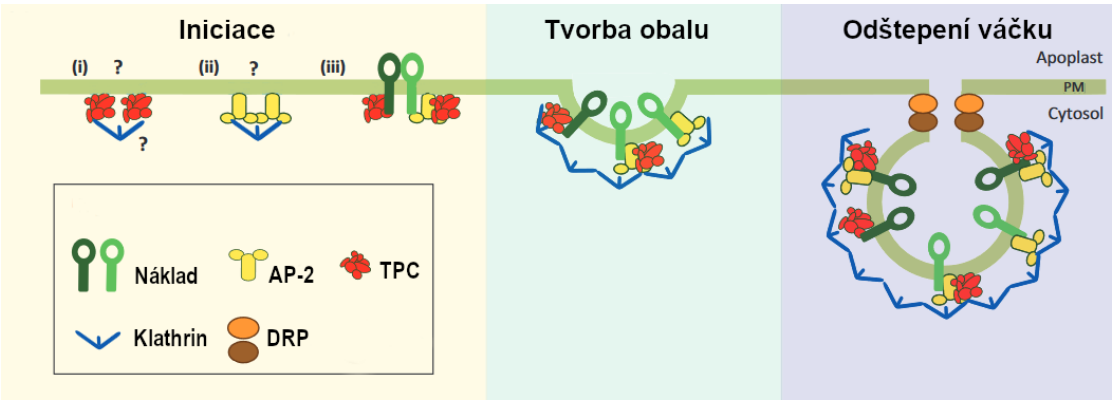


Obrázek 7: Příklad lokalizace fluorescenčně značených podjednotek SEC6, SEC8, EXO70A1 a EXO84b poutacího komplexu exocyst v blízkosti plazmatické membrány. Tato lokalizace je detekovatelná v buňkách kořene Arabidopsis pomocí VAEM. Upraveno dle Fendrych et al, 2013. Měřítko – 10 µm

3.3.2 Endocytóza

Internalizaci materiálu z plazmatické membrány zajišťuje endocytóza, která může být závislá nebo nezávislá na klathrinu. Právě endocytóza závislá na klathrinu (dále CME, clathrin-independent endocytosis) je nejvíc prostudovaným druhem endocytózy u rostlin. Její existence v rostlinách byla poprvé demonstrovaná před 16 lety (Dhonukshe *et al.* 2007). Při inhibici CME stále dochází k internalizaci materiálu, což svědčí o existenci endocytózy, nezávislé na klathrinu (Bandmann *et al.* 2012). Tento druh endocytózy je prozkoumaný mnohem méně: jsou záznamy o roli proteinu FLOTILIN1 v tomto procesu (Li *et al.* 2012). Vzhledem k tomu, že tato dráha je většinou nepopsaná, další odstavce se budou věnovat pouze CME.

V případě CME jsou dobře známé proteiny, které se podílejí na tvorbě endocytotického váčku (Obr. 8), jejich dynamika a jejich interakce mezi sebou. Ve výzkumu této dráhy se uplatňují např. spinning disc mikroskopie (Gadeyne *et al.* 2014) nebo TIRFM/VAEM (Konopka *et al.* 2008), umožňující pozorování markerů endocytózy v rovině plazmatické membrány a měření jejich dynamiky. Díky těmto metodám se ví, že se vznikem váčku jsou asociované adaptérový protein AP-2 a obalový protein klathrin, které mají v rovině plazmatické membrány specifickou dynamiku (Cocucci *et al.* 2012). Složení rostlinného AP-2 a jeho interakce s klathrinem byly zároveň ukázané kombinací různých metod (Di Rubbo *et al.* 2013).



Obrázek 8: Tvorba endocytotického váčku: iniciace jeho vzniku, tvorba klathrinového obalu a odštepení váčku pomocí DRPs. Neví se, jak probíhá iniciace jeho tvorby. Předpokládá se interakce adapterových komplexu AP-2 a TPLATE s membránovými lipidy a nákladem (o interakci TPLATE s nákladem viz dále). TPC, TPLATE complex; AP-2, adapter protein-2; DRP, dynamin-related protein, PM, cytoplazmatická membrána. Upraveno podle Zhang et al. 2015.

Kromě AP-2 v rostlinách byl popsán druhý adapterový komplex TPLATE, také se podílející se na CME (Gadeyne *et al.* 2014). Předpokládalo se, že TPLATE komplex je specificky pro rostliny (Van Damme *et al.* 2007). Ve skutečnosti se jedná o ancestrální proteinový komplex TSET, jehož stáří se směřuje k poslednímu společnému předku eukaryot (Hirst *et al.* 2014). Během evoluce došlo k několika nezávislým ztrátám celého TSET komplexu nebo některých jeho podjednotek u různých organismů. U rostlin je tento komplex znám jako TPLATE komplex nebo TPC. Rostlinný TPC se skládá z osmi podjednotek: TPLATE, TML, TASH3, LOLITA, TWD40-1, TWD40-2, AtEH1/Pan1 a AtEH2/Pan2 (Gadeyne *et al.* 2014). V posledních letech přibylo více prací o struktuře, významu a funkci jednotlivých podjednotek a architektuře celého komplexu (Wang *et al.* 2019; Yperman *et al.* 2021 a, b; Grones *et al.* 2022). Není však úplně jasně, co TPC opravdu dělá a jak vypadá *in vivo*. Rozšířený je názor, že TPLATE funguje jako další endocytotický adaptorový komplex (Gadeyne *et al.* 2014). Tento pohled podporuje například to, že TASH3 podjednotky vážou polyubiqitinovaný náklad a mutace příslušné domény snižuje účinnost endocytózy (Grones *et al.* 2022). Jiná práce, založená hlavně na mikroskopii, srovnává dynamiku TPC a klathrinu a uzavírá, že TPC asociuje s váčky periferně a podporuje zakřivení membrány, aniž by byl adaptorový komplex (Johnson *et al.* 2021).

Odštěpení váčku od donorové membrány je regulováno GTPázami, u rostlin známými jako DRPs (dynamin-related proteins). Z jiných systémů je známo, že dochází k polymerizaci dynaminu na membráně kolem límečku váčku a hydrolýza GTP vede k jeho odškrtnutí (Sweitzer a Hinshaw 1998). U rostlin najdeme šest podrodin DRPs (Hong *et al.* 2003), ale jenom některé homology z DRP1 (Konopka *et al.* 2008) a DRP2 (Fujimoto *et al.* 2007) podrodin lokalizují v rovině PM a jsou spojované s endocytózou.

U kvasinek je tvorba endocytotických váčků závislá na aktinu (Goode *et al.* 2015). Aktinový cytoskelet zajišťuje invaginaci membrány. U rostlin je závislost endocytózy na aktinu problematika je spíše kontroverznější. Aktinový cytoskelet nekolokalizuje s místy tvorby váčků a jeho narušení neovlivňuje internalizaci nákladu jako třeba jsou PIN2 přenašeče (Narasimhan et al. 2020). Jednou z alternativ pro tvorbu dostatečného zakřivení membrány může být např. TPLATE komplex (Johnson *et al.* 2021).

4. Sekrece polysacharidů buněčné stěny

Buněčná stěna se skládá z vícero složek, které se syntetizují na různých místech v buňce. Proto lze předpokládat, že jejich transport a sekrece jsou závislé na vícero dráhách v endomembránovém systému, a je více stupňů jejich regulace.

Celulóza je syntetizovaná na PM celulózasyntázovým komplexem (cellulose synthase complex, CSC), který se skládá z membránových integrálních proteinů celulózasyntáz (CESA). CSC se pohybuje podél kortikálních mikrotubulů v rovině membrány, a tak dochází k depozici celulózy podle jejich vzoru (Paredez *et al.* 2006). Syntéza celulózy během vývoje buňky je regulovaná mírou sekrece CSC z GA/TGN do PM a internalizace CSC z PM (Crowell *et al.* 2009). CSC je sekretován pomocí SmaCC (small CESA compartments) (Gutierrez *et al.* 2009) nebo MASC (microtubule-associated cellulose synthase) kompartmentů (Crowell *et al.* 2009), které částečně kolokalizují s již zmíněným markerem TGN SYP61 (Drakakaki *et al.* 2012). Internalizace CSC je závislá na CME (Bashline *et al.* 2013, 2015)

Kalóza je také syntetizovaná na PM transmembránovými kalózasyntázami CalS (callose synthase) (Hong *et al.* 2001). Kalóza je speciální polysacharid, který najdeme v např. vznikající buněčné přepážce, pylové láčce nebo obranné papile. Během maturace buněčné přepážky zároveň dochází k její degradaci. Transport CalS do PM je nejspíš závislý na TGN. Zároveň se ale spekuluje, že v některých případech k syntéze kalózy nedochází na PM, ale jinde v buňce. Kalóza je pak deponovaná pomoci MVBs (multivesicular bodies) do buněčné stěny. Tato alternativní dráha se předpokládá při napadení patogeny (Böhlenius *et al.* 2010).

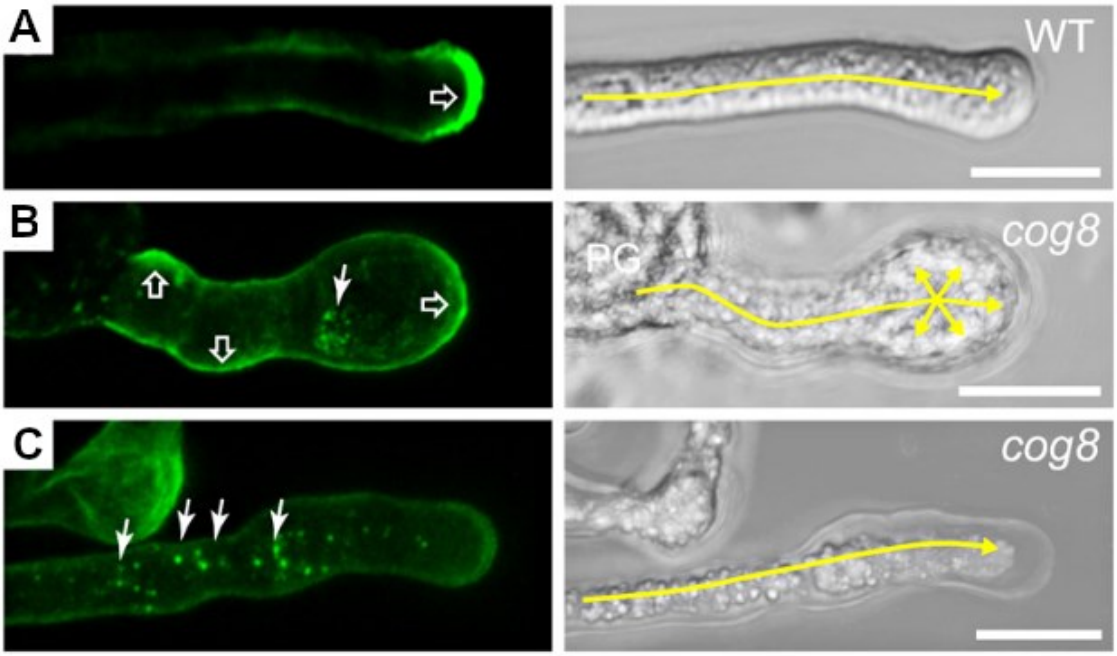
Pektiny a xyloglukany jsou syntetizované v GA a procházejí extenzivními modifikacemi, které zajišťují rezidentní enzymy GA — membránové glykosyltransferázy (Driouich *et al.* 2012). To, jak tyto polysacharidy procházejí různými Golgi cisterny a TGN, je pozorovatelné pomocí elektronové mikroskopie a imunobarvení jednotlivých polysacharidů (Zhang a Staehelin 1992; Kang *et al.* 2011).

V následujících odstavcích budou popsané specifické role určitých proteinů, použitých v této práci, v sekreci nebo biosyntéze polysacharidů buněčné stěny. Poslední kapitola se bude věnovat roli ARP2/3.

4.1 Retrográdní dráha – COPI, COG3, GNL1

Některé mutanty těchto proteinů retrográdní dráhy mívají fenotypy spojené s narušenou syntézou nebo depozicí buněčné stěny. U těchto mutant se těžce stanoví konkrétní příčina fenotypu, protože se jedná o obecný proces — retrográdní dráhu — který může ovlivňovat např. integritu GA, kde dochází k syntéze některých polysacharidů. U některých proteinů se však může jednat o funkce mimo retrográdní dráhu, přímo ovlivňující sekreci buněčné stěny. Tyto funkce většinou nejsou dobře prozkoumané.

Např. *cog* mutanty vykazují narušenou distribuci polysacharidů v pylové láčce. To naznačuje poruchu sekrece (Tan *et al.* 2016; Rui *et al.* 2020), přestože COG reguluje retrográdní intra-Golgi transport (Obr.9). COG nicméně interaguje i s komplexem exocyst při depozici sekundární buněčné stěny ve xylému, která bude popsána v následujícím odstavci (Vukašinović *et al.* 2017).

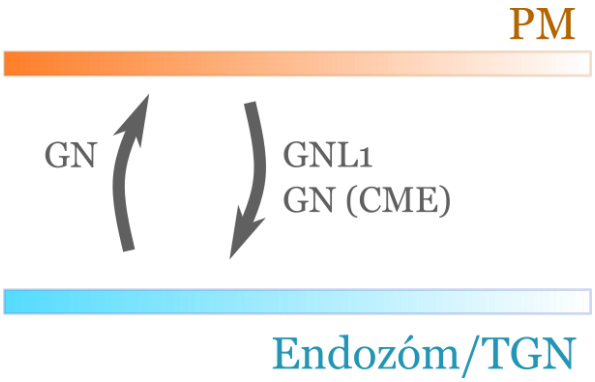


*Obrázek 9: Distribuce pektinů, značených protilátkou JIM7, v pylové láčce Arabidopsis WT (**A**) a cog8 rostlin (**B-C**). Upraveno dle Tan et al. 2016.*

O možné roli COPI obalu v sekreci polysacharidů se spekuluje v nedávné práci provedené na modelovém organismu *Marchantia polymorpha* (Kanazawa *et al.* 2022). Stélka mutantních rostlin je křehčí než stélka rostlin divokého typu. Autoři spojují tento fenotyp s možnou poruchou buněčné adheze a sekrece polysacharidů buněčné stěny. Tato práce však není podpořená vizualizací narušené adheze nebo analýzou distribuce polysacharidů buněčné stěny. Kromě toho je patrná role COPI v sekreci kalózy během

tvorby buněčné přepážky (Ahn *et al.* 2015). Není však jasně, jak přesně se COPI na tomto podílí.

Jedním z nepublikovaných výsledků naše laboratoře je to, že *gnl1-1* mutanty mají narušenou buněčnou adhezi. Některé práce také spojují GNL1 s depozicí kutikuly, který je jednou z modifikací buněčné stěny na povrchu epidermálních buněk (McFarlane *et al.* 2014). Distribuce pektinů se rovněž liší v kořenech *gnom* mutant v porovnání s *wild type* rostlinami (Wachsman *et al.* 2020). GN je zároveň spojován se sekrecí kalózy během napadení patogeny (Nielsen *et al.* 2012). Není však úplně jasné, jaký vliv na buněčnou adhezi můžou mít ARF GEF, lokalizující na membránách GA (Naramoto *et al.* 2014). Dlouhodobě se však uvažuje o funkci a lokalizaci GN nebo GNL1 mimo retrográdní dráhu a GA v endocytóze nebo recyklaci internalizovaného materiálu, hlavně proteinů jako např. auxinové přenašeče PIN1 (Geldner *et al.* 2003; Teh and Moore 2007; Naramoto *et al.* 2010; Doyle *et al.* 2015, Jelínková *et al.* 2015). Tato funkce nebyla zatím prozkoumaná ve vztahu k sekreci buněčné stěny. Nejrozšířenější představu o funkcí GN a GNL1 mimo GA znázorňuje obrázek 10.



Obrázek 10: Schéma, znázorňující možnou roli GNL1 a GN v internalizaci a recyklaci materiálu z plazmatické membrány. GNL1 se podílí na endocytóze, GN na sekreci recyklovaného materiálu. Některé publikace také spojují funkci GN s CME (Naramoto et al 2010).

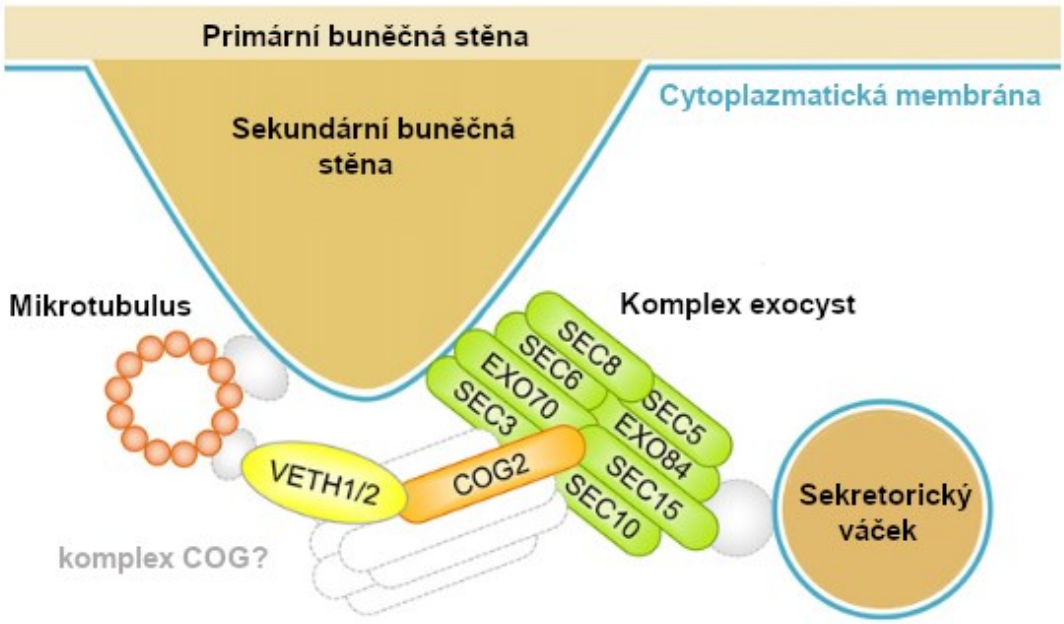
4.2 Exocyst

K dispozici jsou početné experimentální záznamy o roli komplexu exocyst nebo určitých podjednotek v polarizované sekreci polysacharidů buněčné stěny nebo biosyntetických enzymů. Podjednotka EXO70H4 je důležitá pro transport CalS enzymů, syntetizujících kalózu, na PM (Kulich *et al.* 2018), a proto mutant *exo70h4* má narušenou depozici kalózy ve vyvíjejících trichomech. Zároveň nedochází k impregnaci buněčné stěny oxidem křemičitým (Kulich *et al.* 2015, 2018). Význam pro depozici kalózy v jiném kontextu – obraně proti patogenům – byl ukázán pro EXO70B2 (Ortmannová *et al.* 2022). Práce však předpokládá význam pro přímý transport kalózy syntetizované v buňce, nikoliv nepřímý vliv přes transport CalS, což již bylo diskutováno výše v odstavci o transportu kalózy. Další dvě podjednotky exocystu SEC8 a EXO70A1 jsou důležité pro

sekreci pektinu na povrch semenného obalu (Kulich *et al.* 2010). U *exo84b* mutant dochází k akumulaci váčků, jejichž obsahem můžou být složky buněčné stěny (Fendrych *et al.* 2010).

Vztah mezi exocystem a sekrecí CESA byl nastíněn relativně nedávno. Exocyst reguluje fúzi sekretorického váčku, obsahujícího CSC, s PM (Zhu *et al.* 2018). Místo fúze je značeno CSI1 (Cellulose Synthase Interactive 1) proteinem. Interakce CSI1 s exocystem byla prokázaná pomocí různých metod. Dalším interaktorem exocystu při sekreci CSC je myosin XIK (Zhang *et al.* 2021). Není zatím znám mechanismus, jak myosin XIK může ovlivňovat přímo fúzi váčků.

Exocyst hraje podobnou roli při tvorbě sekundární buněčné stěny xylému (Vukašinović *et al.* 2017). Lokalizace exocystu je závislá na mikrotubulech a je zajištěná interakcí s COG2 podjednotkou COG komplexu a VETH (Vesicle tethering) 1/2 proteinu, vážících mikrotubuly (Oda *et al.* 2015). Asociace exocystu s mikrotubuly je důležitá pro správnou lokalizaci CESA7 na PM (Vukašinović *et al.* 2017). COG v tomto případě neplní roli poutacího komplexu, ale spojuje exocyst s VETH1/2 proteiny, které interagují s mikrotubuly (Obr. 11).



Obrázek 11: Možný mechanismus funkce komplexů exocyst a COG v syntéze sekundární buněčné stěny ve xylému. Upraveno dle Vukašinovič et al. 2017.

4.3 TPLATE

Význam TPLATE a CME pro syntézu buněčné stěny zůstává většinou neprozkoumaná. Role TPLATE byla experimentálně ukázaná jenom pro syntézu celulózy. Jak již bylo předem popsáno, endocytóza je významná pro regulaci hladiny CSC na PM. Interakce s různých podjednotek TPC s CESA byla detekována biochemicky, a jejich mutace ovlivňuje syntézu celulózy (Bashline *et al.* 2015; Sánchez-Rodríguez *et al.* 2018).

4.4 ARP2/3

Mutanty podjednotek komplexu ARP2/3 mají narušenou adhezi mezi epidermálními buňkami hypokotylu, děložních listů a pravých listů. Buněčná adheze je spojovaná s přítomností pektinu ve střední lamele. Narušená ultrastruktura střední lamely již byla popsaná v kořenech *arp2*, *brk1* a *scar* mutant (Dyachok et al. 2008).

Není známo, jak se komplex ARP2/3 přímo podílí na tomto jevu a zda-li ovlivňuje exocytózu pektinu nebo jeho internalizaci, příp. recyklaci. Je též možné, že ARP2/3 kontroluje dopravu modifikujících enzymů do prostoru buněčné stěny, jako jsou třeba pektinmetylesterázy a jejich inhibitory. Jedním z předběžných výsledků naší laboratoře je interakce ARP2/3 a poutacího komplexu exocystu (Jelínková 2021). Endocytóza pektinů, závislá na F-aktinu, byla popsána v meristematických buňkách kořene (Baluška et al. 2002).

Vzhledem k již zmíněné roli ARP2/3 v polarizované sekreci PIN přenašečů je otázkou, jestli se ARP2/3 také nepodílí na sekreci materiálu buněčné stěny nebo enzymů, které jí modifikují. Zejména se jedná o pektiny, které ovlivňují buněčnou adhezi, ale nemůže být vyloučená ani role v sekreci role jiných polysacharidů buněčné stěny. Mutantní rostliny mají totiž pozměněný obsah polysacharidů v některých pletivech, tenčí buněčné stěny a sníženou míru lignifikace buněk ve vodivých pletivech (Pratap Sahi *et al.* 2017).

5. Materiál a metody

5.1 Rostlinný materiál

V následující tabulce (Tab. 1) jsou uvedené transgenní linie *Arabidopsis thaliana* z databáze laboratoře, použité v této práci.

Linie	Pozadí	Rezistence	Citace, autor nebo identifikační číslo
35S:AtARPC5-mCherry	WT	Hygromycin	(Martinek *et al.* 2023)
35S:GFP-AtARPC5	*arpc5*	Kanamycin	(Martinek *et al.* 2023)
UBQ:COG2-GFP	WT	BASTA	(Vukašinović *et al.* 2017)
Exo84b-RFP	WT	Kanamycin	(Fendrych *et al.* 2013)
TPLATE-RFP	*tplate*	Hygromycin	Kateřina Schwarzerová
GNL1-YFP	*gnl1-1*	Kanamycin	(Richter *et al.* 2007)
AtARPC5-mCherry/GFP-AtARPC2	WT	Hygromycin, kanamycin	Jan Martinek
AtARPC5-mCherry/volný GFP	WT	Hygromycin	Kateřina Schwarzerová

Tabulka 1: Transgenní linie Arabidopsis thaliana, použité v rámci této práce.

5.2 Kultivace rostlin

Rostliny *Arabidopsis thaliana* a *Nicotiana benthamiana* byly kultivované za teploty 23 °C a při fotoperiodě 16/8 hodin světla/tmy v rašelinových peletách. Transgenní rostliny, exprimující fluorescenční marker, byly předem vyseté *in vitro* (agarové plotny), vyselektovány podle kvality fluorescence po cca týdnu kultivace a přenesené do *ex vitro* (rašelinové pelety) podmínek. Selekce probíhala na fluorescenčním mikroskopu Olympus Provis AX 70.

Pro *in vitro* kultivaci byla semena *Arabidopsis* vysterilizovaná 1 min 96% ethanolem a 10 min 50% roztokem SAVO, který byl posléze 3x vymyt sterilní destilovanou vodou. Sterilní semena byla stratifikovaná v lednici po dobu ode 2 dnů. Rostliny byly pěstované v plastové Petriho misce na standardním mediu pro *Arabidopsis* (1% sacharóza, 2,2 g/l MS soli, 0.8% agar, pH 5,7)

5.3 Kultivace a transformace bakterií

Pro GoldenBraid klonování byly využity chemicky kompetentní TOP10 nebo heat-shock kompetentní DH5α (New England Biolabs) bakterie *Escherichia coli.* TOP10 linie byla transformovaná přidáním 1 µl ligační směsi a inkubací 15 min na ledu. DH5α linie byla transformované podle protokolu výrobce. Po rozmražení do DH5α bakterií byl přidán cca 1 µl DNA. Po dvouminutové inkubaci na ledu bakterie byly ošetřené teplotním šokem 42 °C délkou 30 vteřin. Pak následovala další inkubace 2 minuty na ledu.

Po transformaci byly bakterie inkubované v SOC médiu (2% pepton, 0,5% kvasnicový extrakt, 20 mM glukóza, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM $MgSO_4$) za teploty 37 °C a mírného třepání. Po 1 hodině byly bakterie nanesené na Petriho misky s LB médiem (1,75% agar, 10 g/L pepton, 5 g/L kvasnicový extrakt, 10 g/L NaCl, pH = 7,5) a selekčním antibiotikem. V závislosti na rezistenci vektoru pro selekci byly využité chloramphenicol (5 µg/ml), kanamycin (5 µg/ml) nebo spektinomycin (10 µg/ml). Do média byly rovněž přídané X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid, 40 µg/ml) a IPTG (isopropyl-β-D-thiogalaktosid,0,5 mM), umožňující modro-bílou selekci. Kultivace bakterií probíhala přes noc při 37 °C.

Pro transformaci rostlinného materiálu byly využity elektrokompetentní bakterie *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 nebo C58C1. Po rozmražení byly bakterie smíchány s 0,1-1 µl DNA a přeneseny do elektroporační kyvety a hned elektroporované pří napětí 2000 V. Poté byly bakterie inkubované v tekutém YEB médiu pro zotavení (0,5% masový extrakt, 0,1% kvasnicový extract, 0,5% pepton, 2,5 g/L sacharóza, 0,5 g/L $MgSO_4$, 0,5 g/L NaCl, 0,2 g/L KCl, 2 g/L $MgCl_2$) za teploty 28 °C a mírného třepání cca 3 hodiny. Pak byly bakterie 2-3 dny kultivovány v Petriho miskách pevném na YEB mediu se selekčními antibiotiky kanamycinem nebo spektinomycinem a rifampicinem (50 µg/ml). Pro transformaci rostlinného materiálu byla jedna kolonie přenesena do tekutého YEB média rozetřením na stěně Erlenmayerovy baňky a postupným smytím do média. Bakterie byly kultivované v tekutém médiu přes noc za teploty 28 °C a intenzivního třepání.

5.4 Klonování

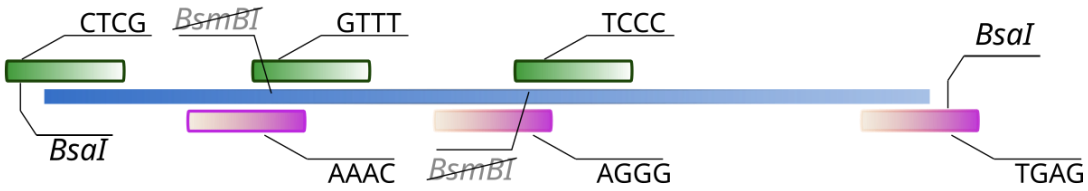
Vektory 35S:α2-COP-mCherry a UBQ:COG3-mCherry byly připravené pomocí klonovacího systému GoldenBraid2.0. Tento systém je založen na skládání konstruktů z modulárních části, udržovaných ve speciálních vektorech (Sarrion-Perdigones *et al.* 2013). Každá část má specifické přesahy, umožňující ligaci všech částí ve správném pořadí. Modulární části byly poskládané pomocí restrikční-ligační reakce v thermocykleru: 2 min 37 °C a 5 min 16 °C, 25–45 cyklů. Pro restrikční štěpení byly využité enzymy *BsaI* a *BsmBI* (ThermoFisher).

α2-COP (AT2G21390) a COG3 (AT1G73430) fragmenty byly amplifikované z cDNA pomocí PCR. Pro amplifikaci byl využit standardní protokol pro Q5 Polymerázu (New England Biolabs). Primery (Tab. 2) pro jejich amplifikaci byly navržené pomocí online dostupného digitálního nástroje https://gbcloning.upv.es/. Tyto primery mají přesahy zavádějící místa pro ligaci a skrývající restrikční místa pro enzymy *BsaI* (New England Biolabs) a *BsmBI* (ThermoFisher). Restrikční místa a členění na fragmenty genů jsou znázorněné na obr. 12.

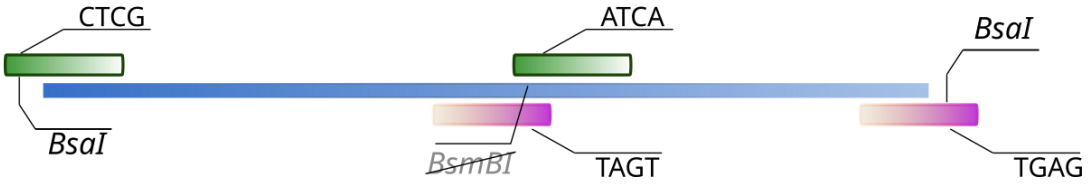
Název primeru	**Sekvence 5‘-3‘**
α2-COP F1	GCGCCGTCTCGCTCGAATGCTGACCAAGTTCGAGACTAAGAGTAAC
α2-COP F2	GCGCCGTCTCGGTTTCTGGAGGGGATGATTAC
α2-COP F3	GCGCCGTCTCGCTCACGAACCCCGGACTTGAGAGGCAGAGC
α2-COP R1	GCGCCGTCTCGAAACGAATAAAGGCTGTGAGTTG
α2-COP R2	GCGCCGTCTCGGGGACGGTGGCATTAAAAGC
α2-COP R3	GCGCCGTCTCGTCCCCCATCATGTGTGGTGG
COG3 F1	GCGCCGTCTCGCTCGAATGGCGACTAAGGCGGCTTC
COG3 F2	GCGCCGTCTCGATCAGTCAGCTAGACAGAGTG
COG3 R1	GCGCCGTCTCGTGATCTCCCAGGACTTCAAC
COG3 R2	GCGCCGTCTCGCTCACGAACCAAGGAAATTGTCGAGTTGGGT

Tabulka 2: Sekvence a názvy primerů, použitých pro amplifikaci fragmentů α2-COP a COG3.

α2-COP:



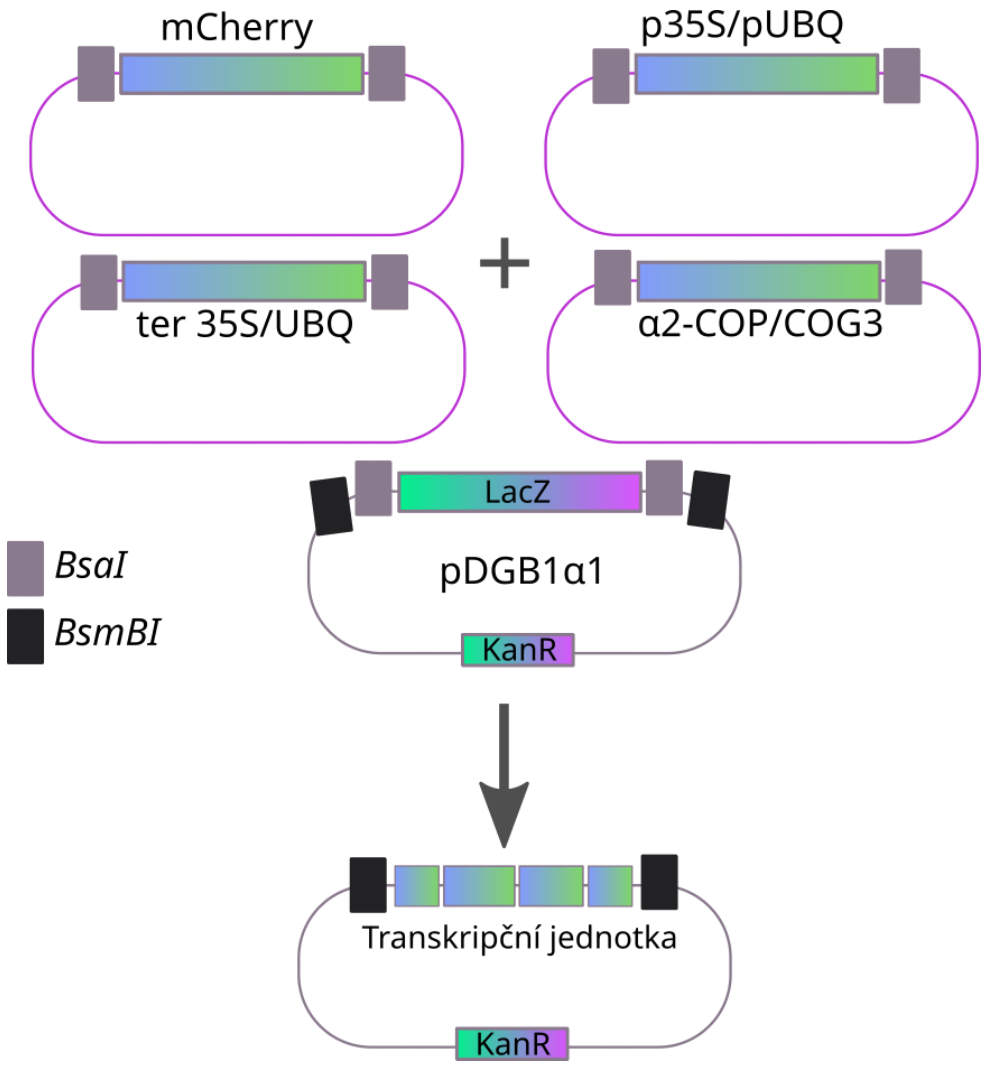
COG3:



Obrázek 12: Schéma členění α2-COP a COG3 na fragmenty, které byly následně amplifikované pomoci PCR. Zeleně a fialově jsou označené forward a reverse primery. Tyto primery zavádějí mutace, odstraňující restrikční místa pro restriktázu BsmBI. Zároveň zavádějí komplementární přesahy, umožňující ligaci fragmentů k sobě a k pUPD2 vektoru. Okrajově primery také zavádějí restrikční místa pro BsaI, důležité pro následující tvorbu modulárního konstruktu (viz dále).

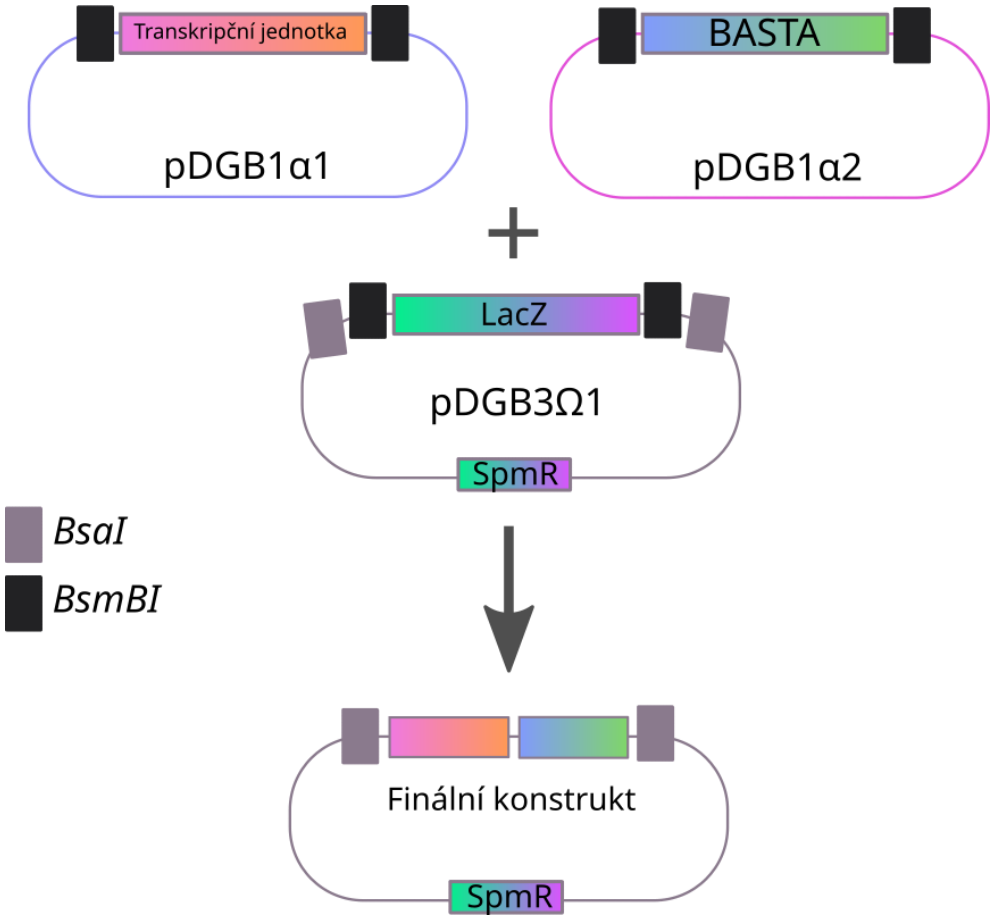
Výsledné 3 fragmenty α2-COP a 2 fragmenty COG3 byly poskládané do pUPD2 vektorů pomocí restrikční-ligační reakce, popsané výše. Množství všech složek reakce byla následující: 40 ng každého z fragmentů, 75 ng pUPD2, 1 µl *BsmBI*, 1 µl T4 ligázy (ThermoFisher), 1 µl ligačního pufru (ThermoFisher).

Dalším krokem byla tvorba transkripční jednotky (transcription unit), která se skládá z promotoru, kódující sekvence genu zájmu (COG3 nebo α2-COP), terminátoru a fluoroforu. Všechny fragmenty, udržované ve vektorech pIC nebo pUPD2, které mají rezistenci vůči chloramfenikolu nebo ampicilinu, byly překlonované do vektoru pDGB1α1 restrikční-ligační reakcí. Schematicky tento postup vysvětluje obrázek 13.



Obrázek 13: Postup tvorby transkripční jednotky z modulárních částí, které mají specifické přesahy, umožňující ligaci ve správném pořadí, a restrikční místa pro BsaI. Po překlonování do pDGB1α1 dochází k odstranění míst pro BsaI a zůstávají místa pro BsmBI, používané v další reakci. KanR; kanamycinová rezistence.

Finální konstrukt, vhodný pro stabilní expresi v *Arabidopsis*, byl překlonován do vektoru pDGB3Ω1 stejnou restrikční-ligační reakcí. Kromě transkripční jednotky do tohoto vektoru byla překlonovaná kazeta s rezistencí vůči BASTA, udržovaná ve vektoru pDGB1α2. Postup tento reakce znázorňuje obrázek 14.



Obrázek 14: Postup tvorby finálního konstruktu, exprimovaného v rostlinách, z modulárních částí. Každý vektor má restrikční místa pro BsmBI a specifické přesahy umožňující ligaci. Po překlonování do pDGB1α1 dochází k odstranění míst pro BsmBI a zůstávají místa pro BsaI, SpmR, spektinomycinová rezistence.

Složení těchto dvou reakcí bylo následující: 45 ng každého vektoru, 1 µl *BsaI* pro první reakci a *BsmBI* pro druhou, 1 µl T4 ligázy, 1 µl ligačního pufru. Použité vektory, kromě vektorů, vytvořených v rámci této práce, jsou součástí databáze vektorů laboratoře Buněčného růstu a diferenciace. Jsou uvedené v tabulce 3.

Identifikační číslo	Název (Vektor)	Autor
pCG017	pUPD2	(Sarrion-Perdigones *et al.* 2013)
pCG028	p35S (pIC)	Tomáš Moravec
pCG031	35S terminátor (pIC)	Tomáš Moravec
pCG048	C-terminální mCherry (pIC)	MoClo Kit (Nicola Patron)
pCG056	pDGB1α1	Elíška Kobercová
pCG058	pDGB3Ω1	Elíška Kobercová
pCG059	Kazeta BASTA rezistence (pDGB1α2)	Elíška Kobercová
pCG085	pUBQ10 (pUPD1)	Nelson Serre
pCG098	UBQ3 terminátor (pUPD1)	Nelson Serre

Tabulka 3: Vektory, použité pro modulární klonování pomocí systému GoldenBraid2.0, jejich autoři a identifikační čísla.

Konstrukt 35S:mCherry-ARPC4 byl překlonován z vektoru pGreen0029 (kanamycinová rezistence) do vektoru pGreen0129 (hygromycinová rezistence) metodou restrikčního klonování. Jako zdroj linearizovaného pGreen0129 vektorů sloužil konstrukt 35S:NtARPC5-mCherry, který byl k dispozici v laboratoři. Pro štěpení byly použité enzymy *XbaI* and *SalI* (New England Biolabs*)*. Stejné enzymy byly použité pro štěpení fragmentu 35S:mCherry-ARPC4. Prázdný vektor a fragment byly zaligované přes noc za teploty 15°C. Složení ligační směsi bylo následující: 2 µl plazmid pGreen0129, 6 µl fragment 35S:mCh-ARPC4, 1 ul 10x ligační pufr, 1 µl T4 ligáza.

5.5 Transformace rostlin

Rostliny *Arabidopsis* byly transformované metodou floral dip (Zhang *et al.* 2006) pomocí *Agrobacterium tumefaciens* transformovaného testovanými vektory (viz 4.3). Semena transformovaných rostlin byla vysterilizovaná podle 4.2 a pěstovaná na médiu s přidaným selekčním antibiotikem (20 µg/ml BASTA nebo 20 µg/ml hygromycin) a claforanem (100 µg/ml).

Listy *Nicotiana* byly transformované pomocí tabákové infiltrace. Rostliny byly cca 3 týdny staré. *Agrobacterium tumefaciens* transformované testovaným vektorem bylo kultivováno v tekutém médiu přes noc. Kultura byla centrifugována (10 min při 3700 g). Po odstranění supernatantu byly bakterie třikrát promyty v infiltračním roztoku (10 mM $MgCl_2$, 10 mM MES, pH 6,5). Po třetím promytí byl pelet resuspendován v infiltračním roztoku s přidáním 200 µM 3,5-dimethoxy-4-hydroxyacetophenonu (acetosyringonu).

Suspenze byla injikovaná do abaxiální strany listu pomocí stříkačky a hranice infiltrovaných částí byly označené lihovou fixou. Výsledek transformace byl pozorován po 3-5 dnech.

5.6 Křížení

Pro křížení byly použité cca 3 týdny staré rostliny. Pro křížení byly použité neotevřené květy, ze kterých byly odstraněné všechny květní orgány kromě pestíků. Na jejich blizny byl přenesen pyl. Takovým způsobem byly připravené dvojité linie, exprimující GNL1-YFP a jeden ze třech červených markerů: TPLATE-RFP, EXO84B-RFP, ARPC5-mCh. Křížením byla také připravená linie GNL1-YFP/*arpc5* (SALK_123936.41.55)

5.7 Izolace proteinů a koimunoprecipitace

Pro izolaci proteinové frakce byly použité sedmidenní rostliny *Arabidopsis*, pěstované *in vitro* a zamražené v tekutém dusíku. Pro jejich homogenizaci byla použita tekutým dusíkem předchlazená třecí miska a tlouček. Homogenizovaný rostlinný materiál byl přidán do extrakčního pufru (MES 50 mM, 10 mM EGTA, 10 mM $MgCl_2$, 2 M Glycerol, inhibitory proteáz (Merck, P9599), pH = 6,9) v poměru 1 :1 (v/w). Pro izolaci totální frakce byly vzorky centrifugovány 15 minut při 4 °C a 4000 g.

V experimentech, kde byly specifiky vychytávány proteiny označené GFP, byly pro koimunoprecipitaci použity magnetické kuličky s navázanou anti-GFP protilátkou z kitu µMACS™ GFP Isolation Kit (Miltenyi Biotec). Experiment byl proveden podle protokolu a s chemikáliemi od výrobce ze stejného kitu.

V experimentech, kde byly specificky vychytávány proteiny s mCherry značkou, byly použité stáčecí agarózové kuličky s navázanou anti-RFP protilátkou (ChromoTek RFP-Trap®). Kuličky byly stočené při s promývacím pufrem při 2500 g, 5 minut (10 mM Tris-HCL pH 7,5, 150 mM NaCl. 0,5 mM EDTA). Po odstranění pufru byl ke kuličkám přidán vzorek: 0,5 ml totálního proteinového extraktu na 25 µl kuliček. Následovala 1 hodina inkubace kýváním na ledu. Pak byly kuličky byly znovu centrifugované s promývacím pufrem a 0,05% IGEPAL CA-630 (SigmaAldrich) 2500 g, 5 minut, za 4 °C. Peletované kuličky byly smíchány s 80 ul horkého 2D purfu a centrifugované při 2500 g, 2 min, 4 °C. Supernatant (uvolněné proteiny) byl analyzován pomocí SDS PAGE.

Pro Western Blot byl použit *Trans-Blot Turbo Transfer System* (BioRad), umožňující rychlý přenos proteinu na nitrocelulózovou membránu. Postup blotování byl proveden podle protokolu výrobce. Pro blokování epitopů byly bloty nechány přes noc za teploty

4 °C a mírného třepání v TBS pufru (Tris/HCl 20 mM, NaCl 150 mM, 1% Triton X-100, pH = 7,4) s 4% sušeným odtučněným mlékem.

Příští den byly membrány inkubované v roztoku primárních protilátek v TBS pufru. Pro detekci mCherry byly použité protilátky rabbit anti-mCherry, ředěné v poměru 1:4000 (Abcam, ab167453). Pro detekci GFP byly použité protilátky rabbit anti-GFP, ředěné v poměru 1:6000 (Agrisera, AS15 2887). Membrány byly inkubované 1 hodinu při pokojové teplotě. Po inkubaci byly membrány třikrát po 10 minutách promyté TBS pufrem. Posléze byla membrána přenesená do roztoku se sekundárními protilátkami v TBS pufru a inkubovaná za stejných podmínek. Jako sekundární protilátka byla použitá anti-rabbit HRP-konjugovaná protilátka, ředěná v poměru 1:6000 (Enzo, ADI-SAB300-J). Nakonec byla membrána dvakrát promyta v TBS pufru.

Pro vizualizaci byl použit Azure 600 (Azure Biosystems), umožňující rychlou vizualizaci pomocí chemiluminiscenčního systému ECL. Pro vizualizaci byl použit Radiance ECL kit (Azure Biosystems), obsahující HRP peroxidázu. Po 3 minutách inkubace v substrátu, přípraveném podle protokolu výrobce byly membrány umístěné do Azure 600. Expoziční čas byl vybrán automaticky.

5.8 Mikroskopie

Pro konfokální mikroskopii byl použit mikroskop Leica SP8. Pro snímání byl použit objektiv HC PL APO CS2 63x/1,20 W. Pro snímání RFP (emise 587–647) nebo mCherry (emise 581–632) byl použit excitační laser 561 nm. Pro snímání GFP (emise 495–530) nebo YFP (emise 500–560) byl použit excitační laser 488 nm. Pro pozorování *Arabidopsis* byly použité 5 dní staré semenáčky. Pro pozorování *Nicotiana* byly použité kusy listů předem transformovaných rostlin, vystřihané pomocí nůžek.

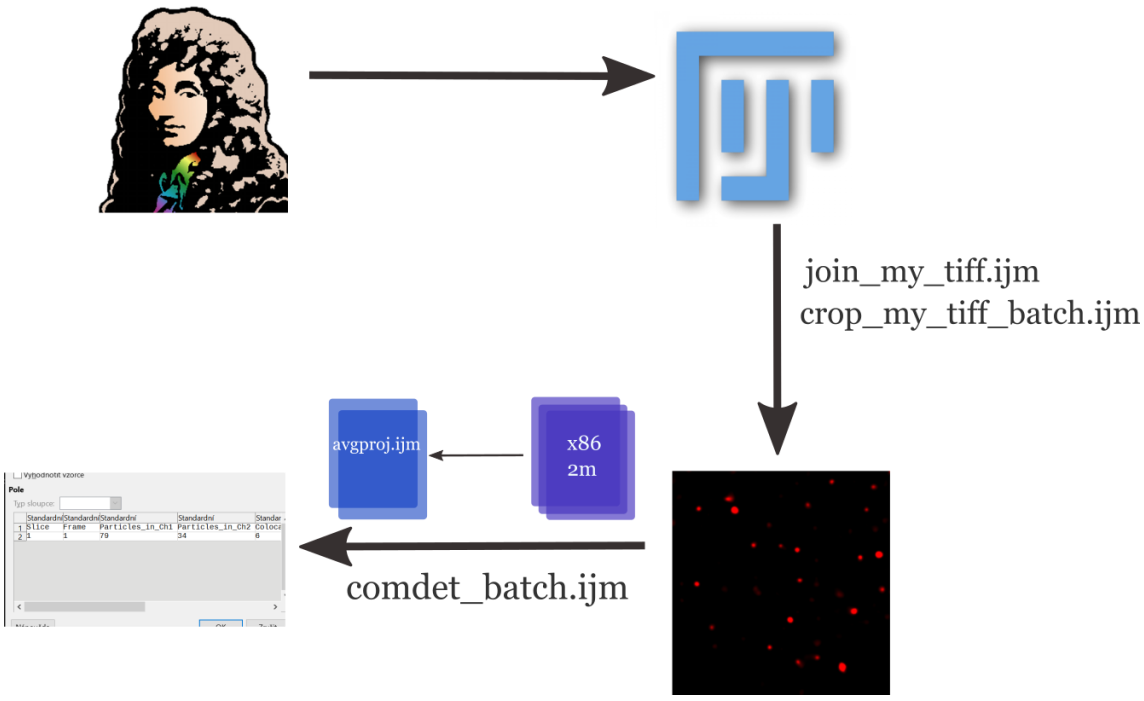
Po TIRF/VAEM mikroskopii byl použit mikroskop Zeiss Elyra PS.1. Pro excitaci RFP/mCherry byl použit laser 561 nm. Pro excitaci GFP/YFP byl použit laser 488 nm. Pro snímání byl také použit filtr MBS 488/561. Snímání bylo provedeno kamerou sCMOS PCO Edge 5.5. Pro měření dynamiky GNL1-YFP byla videa snímána s expozičním časem 250 ms a 4 snímky za sekundu.

Před snímáním byl z rostliny odříznut kořen a děložní lístky a snímány byly hypokotylové pokožkové buňky. Pro měření dynamiky po působení LatB byly rostliny inkubované v 1 µM roztoku LatB během 3 hodin.

4.9 Obrazová analýza

Snímky, získané pomocí TIRFM/VAEM, byly před analýzou upravené dekonvolucí v programu Huygens PRO v módu Widefield. SNR a pozadí byly určené programem automaticky. Pro zjednodušení výpočtů byly z každého obrazu vybrány 2–3 výřezy, které byly analyzovaný pomocí programu FIJI.

Hodnocení kolokalizace proteinů s různými fluorofory bylo provedeno pomocí pluginu ComDet (https://github.com/UU-cellbiology/ComDet) s nastavením velikosti částice 7 pixelů, vzdálenosti mezi částicemi 4 pixely s prahem 20 STD. Pro automatizaci tohoto procesu byla vytvořena sada skriptu v jazyce ImageJ Macro. Výstupy byly vypracované v programu RStudio. Shrnutí celého postupu hodnocení kolokalizace je znázorněno na obrázku 15 a je součástí přílohy této diplomové práce (Příloha 1–5).



Obrázek 15. Schéma analýzy kolokalizace pomoci Huygens a ComDet, využívající jednotlivé skripty pro tvorbu souboru, ořezávání obrázku do čtverce a samotnou kvantifikaci kolokalizace.

Pro detekci a měření dynamiky částic byl použit plugin TrackMate (Tinevez *et al.* 2017) s následujícími nastaveními: detector DoG, filtr kvality obrazu 2-3, LoG Tracker.

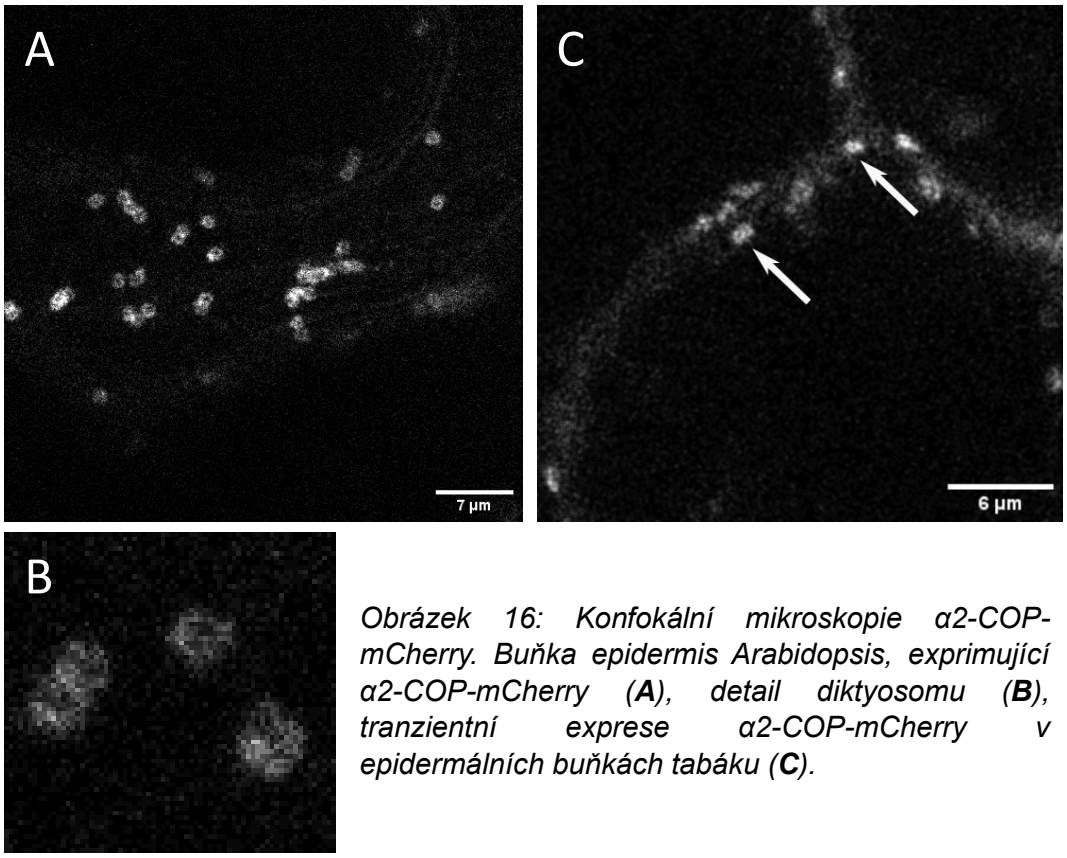
6. Výsledky

6.1 Výroba markerů GA

Prvním cílem práce byla tvorba stabilních linií *Arabidopsis*, exprimujících fluorescenčně značené proteiny COG3-mCherry a α2-COP-mCherry a studium jejich kolokalizace s markery pro komplex ARP2/3. Jak již bylo řečeno, tyto markery byly vybrány jako potenciální interaktoři ARP2/3 v MS/MS analýze v předchozích experimentech v naší laboratoři.

6.1.1 α2-COP-mCherry

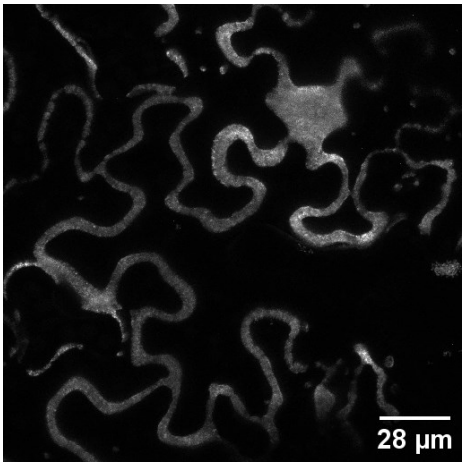
Markery byly nejprve zároveň tranzientně exprimované v *N. benthamiana* pro kontrolu jejich funkčnosti. Teprve potom jsem přistoupila ke stabilní transformaci *A. thaliana* a pozorování v konfokálním mikroskopu. V buňkách *Arabidopsis* marker α2-COP-mCherry značí početné cisterny GA (Obr.16 A-B). Tyto struktury jsou velmi dynamické a pohybují se s proudem cytoplazmy. Tento výsledek se shoduje s již existujícími záznamy o lokalizaci jiných podjednotek COPI v rostlinných buňkách pomocí fúze s fluorescenčním proteinem (Ahn *et al.* 2015). Podobná lokalizace byla pozorovatelná i v listech infiltrovaného tabáku (Obr.16 C).



*Obrázek 16: Konfokální mikroskopie α2-COP-mCherry. Buňka epidermis Arabidopsis, exprimující α2-COP-mCherry (**A**), detail diktyosomu (**B**), tranzientní exprese α2-COP-mCherry v epidermálních buňkách tabáku (**C**).*

6.2.1 COG3-mCherry

Lokalizace COG3-mCherry v listech infiltrovaného tabáku se neshodovala s očekávanou lokalizací (Obr.17). V infiltrovaných listech docházelo k akumulaci červeného signálu ve strukturách, které se zřejmě nacházely v apoplastu. Důvodem pro tuto neúspěšnou expresi v cytoplazmě může být nevhodná struktura vektoru či nevhodná manipulace s bakteriemi či rostlinným materiálem. Transformace COG3-mCherry do *Arabidopsis* nebyla úspěšná, neboť nebyla vyselektována žádná rezistentní rostlina.



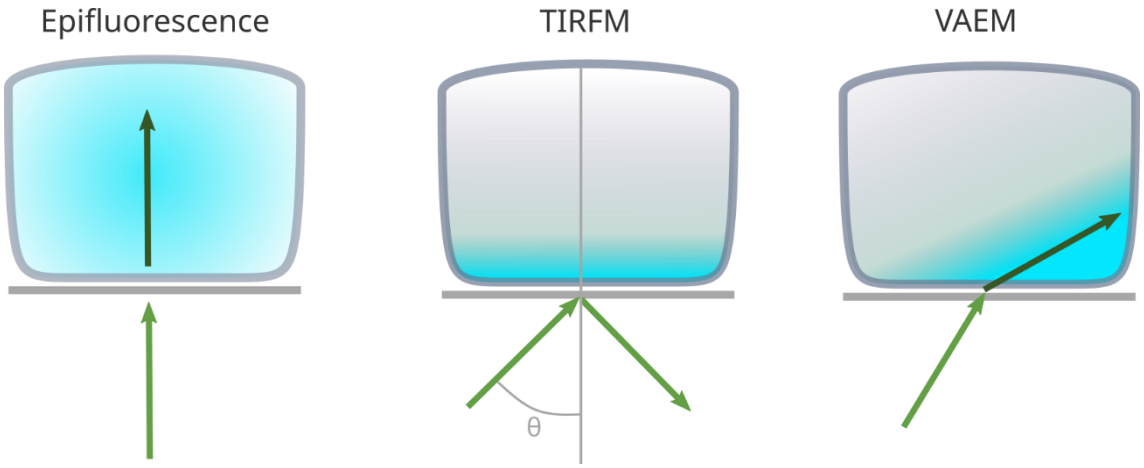
Obrázek 17: Konfokální obrázek epidermálních buněk listu tabáku, transformovaných COG3-mCh.

6.2 TIRFM analýza markerů GA a kolokalizace s ARP2/3

Dalším cílem práce bylo popsat chování vybraných markerů sekretorické dráhy v buňkách hypokotylu *Arabidopsis* pomocí TIRFM/VAEM a hodnotit jejich kolokalizaci s komplexem ARP2/3.

Na rozdíl od klasické fluorescenční mikroskopie umožňuje TIRFM excitovat a pozorovat fluorescenčně značené markery v rovině PM (Johnson and Vert 2017). Tato metoda je používaná např. pro vizualizaci markerů CME, asociovaných s PM. Pomocí TIRFM byla také pozorovaná lokalizace komplexu ARP2/3 v blízkosti PM (Jelínková 2021).

Princip TIRFM spočívá v tom, že laser, svítící na vzorek pod kritickým úhlem, neexcituje fluorofory v celém vzorku. Dochází k úplnému odrazu laseru a tvorbě evanescentní vlny, která excituje fluorofory pouze v blízkosti krycího sklíčka (Johnson and Vert 2017). Podobnou metodou, umožňující pozorování menších detailů, je VAEM. Na rozdíl od TIRFM při VAEM laser nedopadá na vzorek pod kritickým úhlem. Proto dochází k excitaci fluoroforů nejen v rovině PM, ale i v přilehlé kortikální cytoplazmě. Rozdíly mezi těmito metody schematicky znázorňuje obrázek 18. Konfokální mikroskopie umožňuje pozorovat pouze jednu optickou rovinu, avšak i zde dochází k excitaci fluoroforů v celém vzorku, což značně snižuje rozlišení.



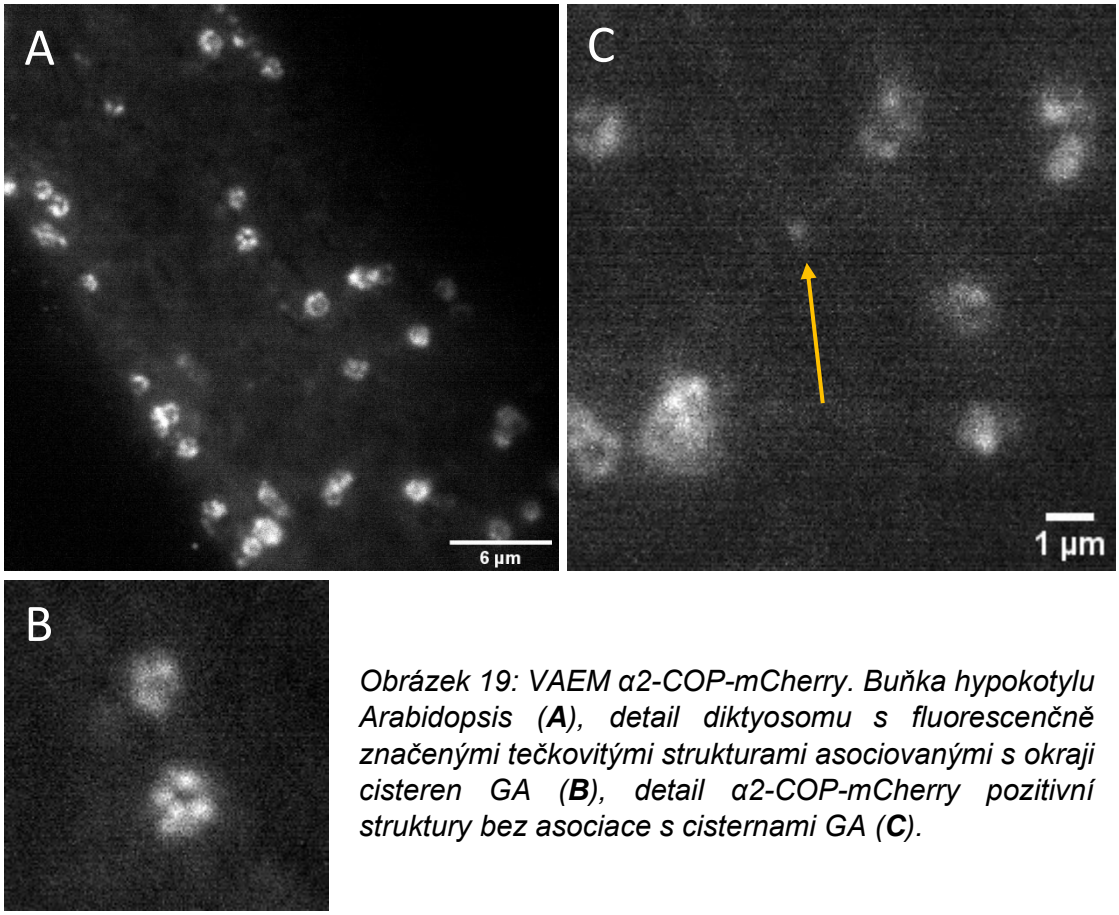
Obrázek 18: Schematické znázornění principu TIRFM a VAEM. Při TIRFM se laser používá pod specifickým úhlem θ. Dochází k úplnému vnitřnímu odrazu a tvorbě evanescentní vlny, excitující tenkou vrstvu vzorku, přilehlou ke sklíčku. K tomuto jevu nedochází při použití VAEM, když se excitují různé roviny ve vzorku.

Pro analýzu TIRFM/VAEM byly využity pokožkové buňky hypokotylů. Tyto buňky zaručují dobrý kontakt vzorku s krycím sklem, který je nutný pro pozorování touto metodou. Pro zvýšení počtu pozorovatelných buněk byly v této první analýze odstraňovány kořeny a děložní lístky, protože tyto velké orgány často znemožňovaly dobrý kontakt buněk hypokotylu s krycím sklem a zabraňovaly tak tak pozorování pomocí VAEM.

6.2.1 α2-COP-mCherry

Fluorescenčně značený marker α2-COP-mCherry nevytváří PM-asociované struktury, které by byly pomocí TIRFM detekovatelné. Pomocí VAEM byly však pozorovatelné Golgi cisterny v hlubší kortikální cytoplazmě (Obr.19 A–B). Tato lokalizace se shoduje s již známými výsledky z literatury a v této práci. VAEM umožnil snímání rychlého pohybu diktyosomu ve větším detailu (Obr.19 B). Zároveň bylo možné rychlé snímání diktyosomů, pohybujících se s proudem cytoplazmy.

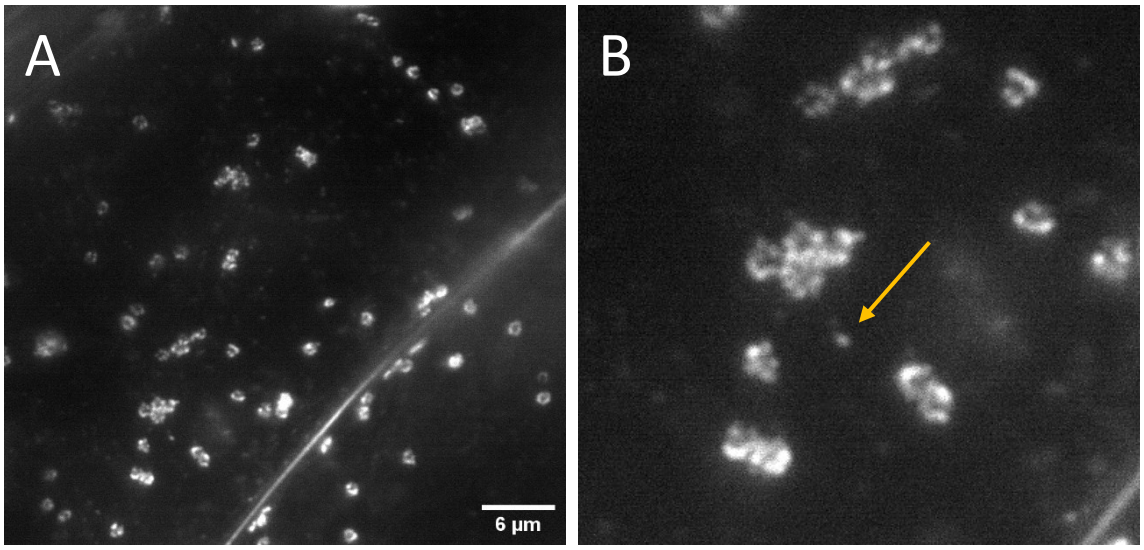
V rovině kortikální cytoplazmy byly pozorovatelné další dynamické α2-COP-pozitivní struktury, nezávislé na viditelných GA cisternách (Obr.19 C). Cisterny GA byly značené díky mnoha dynamickým tečkám, pravděpodobně váčkům či podobným kompartmentům asociovaným s okraji cisteren a značených α2-COP-mCherry. Druhý typ struktur představovaly jednotlivé tečkovité struktury, snad jednotlivé váčky či menší kompartmenty membrán značených markerem, pohybující se cytoplazmou bez zjevné asociace s GA. Protože se však struktury nenacházejí v rovině PM, neprováděla jsem analýzu kolokalizace s ARP2/3 komplexem, který se v této vrstvě cytoplazmy nevyskytuje v této formě teček.



*Obrázek 19: VAEM α2-COP-mCherry. Buňka hypokotylu Arabidopsis (**A**), detail diktyosomu s fluorescenčně značenými tečkovitými strukturami asociovanými s okraji cisteren GA (**B**), detail α2-COP-mCherry pozitivní struktury bez asociace s cisternami GA (**C**).*

6.2.2 COG2-GFP

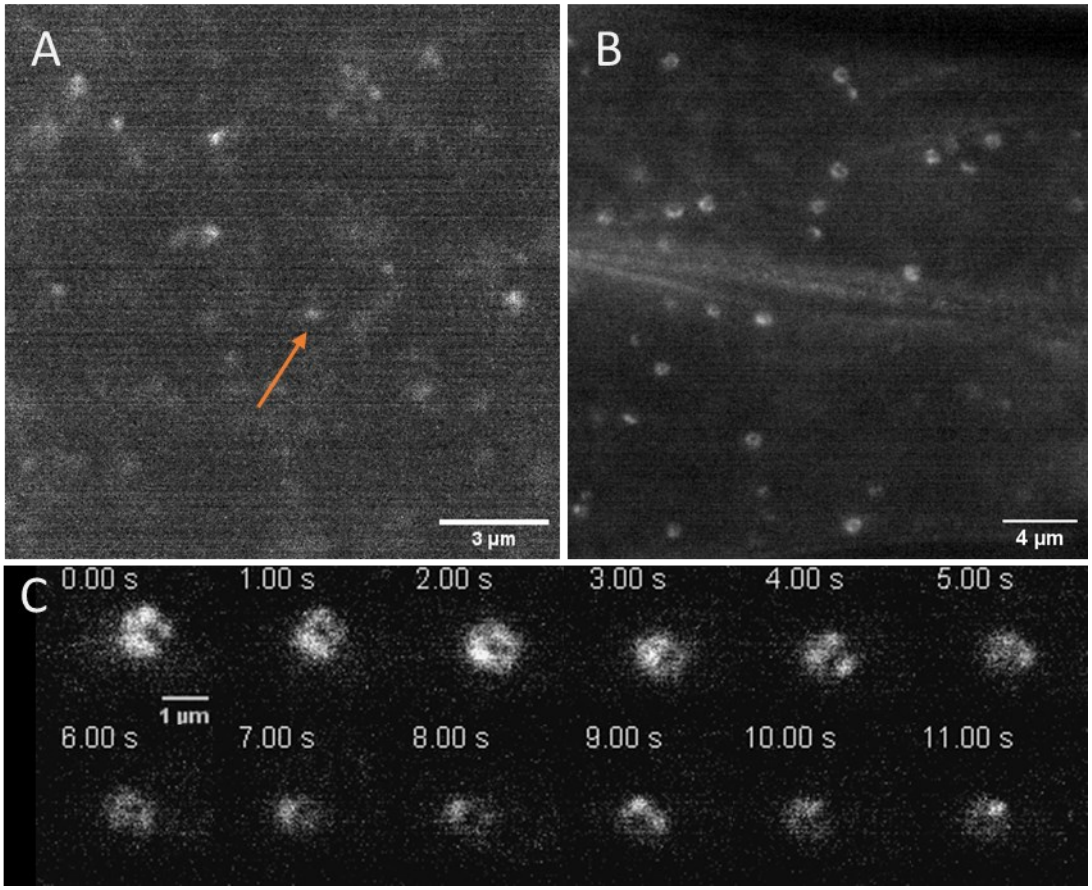
Protože transformace COG3-mCherry do Arabidopsis nebyla úspěšná, pro pozorování COG komplexu byly využité rostliny, exprimující vedlejší podjednotku COG2, značenou GFP (Vukašinović et al. 2017). Podobně jako α2-COP-mCherry, COG2-GFP nelokalizuje v rovině PM v podobě žádné struktury. Pomocí VAEM byly znovu pozorovatelné dynamické struktury diktyosomu, tvořené kompartmenty připomínající kulovité váčky asociované s laterálními stranami cisteren (Obr.20 A). Kromě diktyosomu značí COG2-GFP pohyblivé tečkovité struktury v cytoplazmě, které jsou nezávislé na GA (Obr.20 B). Jsou početnější než podobné struktury značené markerem α2-COP-mCherry. Vzhledem k lokalizaci těchto struktur v cytoplazmě nikoliv na PM nebyla hodnocena kolokalizace s ARP2/3.



*Obrázek 20: Buňka hypokotylu Arabidopsis, exprimující COG2-GFP, VAEM (**A**), detail diktyosomu (**B**). Šípka ukazuje na dynamickou COG2 pozitivní strukturu, nezávislou na GA.*

6.2.3 GNL1

Na rozdíl od přechozích dvou markerů značí marker GNL1-YFP tečkovité struktury se specifickou dynamikou v rovině PM. Tyto tečkovité struktury se objevují v rovině PM, kde jsou po určitou dobu nehybné, a posléze z roviny PM mizí (Obr.21 A). Analýze chování GNL1 pomocí TIRFM se budou věnovat následující kapitoly. Kromě těchto struktur GNL1-YFP značí dynamické diktyosomy v hlubší rovině kortikální cytoplazmy (Obr.21 B). To se shoduje s předchozími výsledky, které ukazují, že GNL1 značí membrány GA (Naramoto *et al.* 2014). I tento marker, podobně jako předchozí dva markery, značí především laterální okraje cisteren GA, což vytváří dojem kroužků, při bližším pohledu tvořených jednotlivými tečkami (pravděpodobně váčky/kompartmenty odštěpujícími se od okrajů cisteren).



*Obrázek 21: GNL1-YFP struktury (**A**) a diktyosomů (**B**) v TIRFM/VAEM. Šipka ukazuje na příklad GNL1-YFP pozitivní struktury, která vykazuje specifickou dynamiku charakterizovanou určitým lifetime. Detail a ukázka dynamiky jednoho diktyosomu a vznikajících a zanikajících váčků (**C**).*

6.2.3.1 Dynamika GNL1

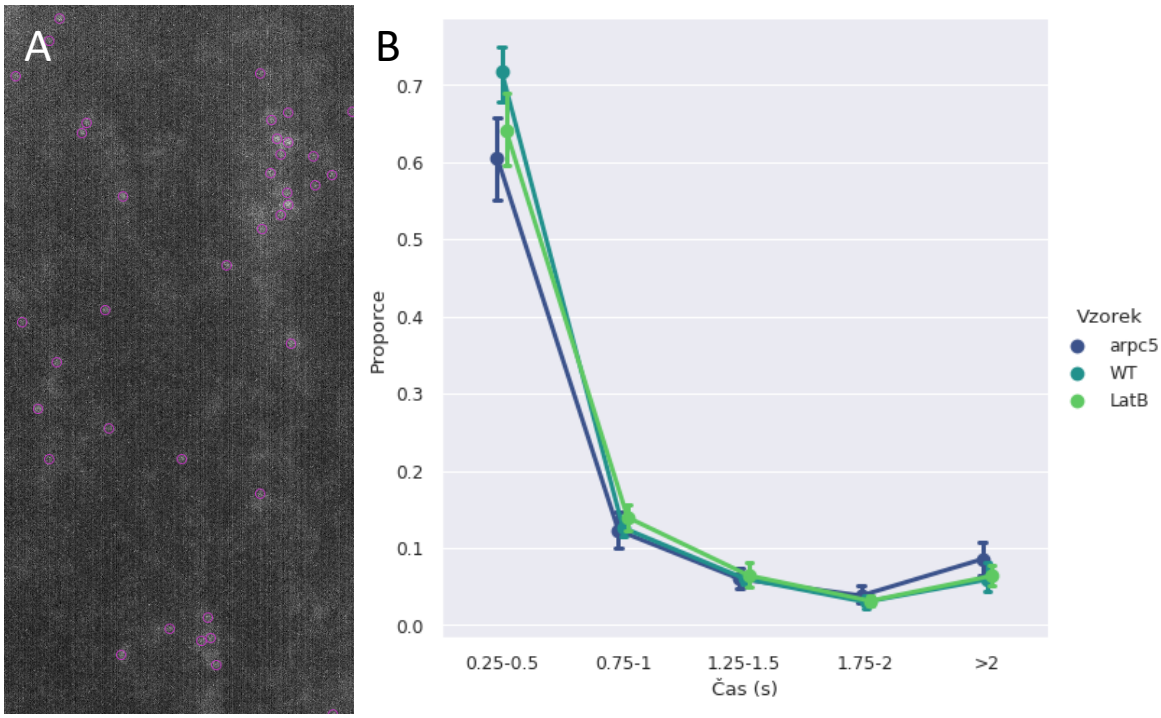
Jednou z metod, využívanou pro charakterizaci struktur v kortikální vrstvě, je měření jejich *lifetime*. Tento termín znamená čas, jak dlouho jeden bod stráví v blízkosti nebo na PM. Tato hodnota je například známá pro proteiny, podílející se na CME (Narasimhan *et al.* 2020). Zvolenou metodou pro detekci a měření *lifetime* v této práci je plugin TrackMate pro FIJI, schopný detekce a sledování bodovitých struktur (Obr.22 A) (Tinevez *et al.* 2017). Již zavedená a publikovaná metoda sledování CME pomocí specifických skriptu v prostředí MATLAB (Johnson *et al.* 2020) nebyla pro tento pokus vhodná, protože nepočítá s velmi krátkými událostmi. Další metoda měření pomocí kymogramů nebyla pro natolik velké soubory dat vhodná kvůli časové náročnosti měření.

Dalším cílem tohoto pokusu kromě samotné charakterizace GNL1 struktur bylo zkoumání možného vlivu působení LatB a mutace *arpc5* na jejich dynamiku v rovině PM

(Obr.22 B). Na obrázku 22B jsou hodnoty *lifetime* rozdělené do pěti kategorií. Kategorie vyznačují *lifetime* GNL1 struktur: 0,25–0,5 vteřin, 0,75–1 vteřin, 1,25–1,5 vteřin, 1,75-2 vteřin, nad 2 vteřiny. Poměr struktur s určitým lifetime oproti celkovému počtu struktur byl spočítán podle následujícího vzorce:

$$\frac{Počet\ struktur\ s\ lifetime\ N}{Celkový\ počet\ všech\ struktur}$$

Většina GNL1 struktur má krátký *lifetime* 0,25 s až 0,5 s (70 %), což odpovídá jednomu, resp. dvěma snímkům. To platí jak pro *arpc5* rostliny, tak i pro rostliny, ošetřené LatB. Signifikantní je jenom rozdíl mezi *arpc5* a rostlinami divokého typu, neošetřenými LatB, v časovém intervalu 0,25–0,5 s. U *arpc5* rostlin se proporce lifetime 0,25–0,5 s snížila do 60 %.

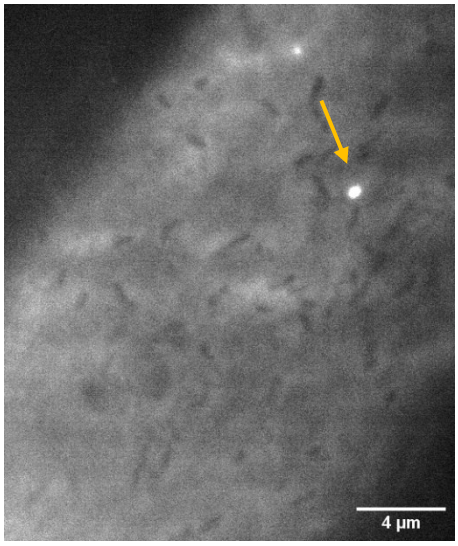


*Obrázek 22: Ukázka detekce GNL1-YFP pomocí TrackMate (**A**), měření dynamiky GNL1-YFP v WT a mutantním arpc5 pozadí a po ošetření LatB (**B**). Na ose x jsou vynesené vybrané časové intervaly lifetime. Proporce počtů struktur s určitým lifetime oproti celkovému počtu je vynesená na ose y. Proporce byla spočítaná vydělením počtu struktur s určitým lifetime celkovým počtem. Konfidenční interval – 95 %.*

6.2.3.2 Kolokalizace

Jedním z plánovaných pokusů byla také analýza míry kolokalizace GNL1-YFP a ARP2/3. V rámci této práce byla vytvořená dvojitá linie GNL1-YFP/ARPC5-mCherry, která však pro kolokalizaci nebyla vhodná. Důvodem bylo, že struktury ARPC5-mCherry na rozdíl od GFP-fúzovaných markerů ARP2/3 nejsou detekovatelné v rovině PM pomocí TIRFM/VAEM. To znemožňovalo kolokalizační analýzu.

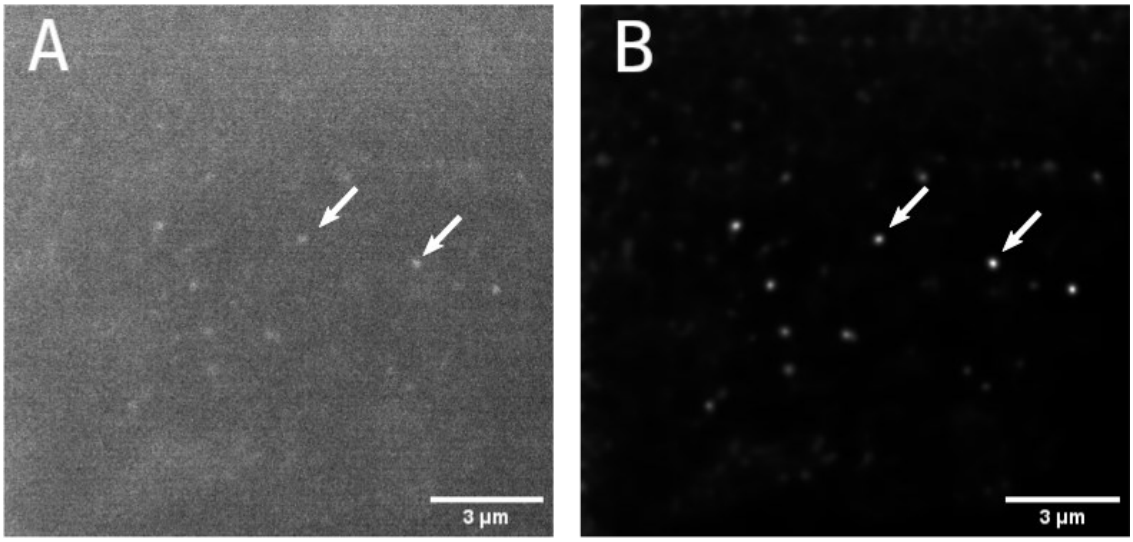
Proto v rámci této práce byl připraven vektor mCherry-ARPC4. Tímto vektorem byly transformované rostliny, exprimující GNL1-YFP. Avšak tento marker, podobně jako ARPC5-mCherry, není detekovatelný v rovině PM. Protože ve VAEM je patrná lokalizace mCherry-*At*ARPC4 v cytoplazmě a na peroxisomech (Obr.23), kde vytváří marker velké struktury, je možné tento problém vysvětlit menší citlivostí mikroskopu na malé objekty (dynamické tečky u PM) v červeném kanálu.



Obrázek 21: TIRFM mCherry-AtARPC4 v buňkách hypokotylu Arabidopsis. Šípka ukázuje na arpozóm – jinou ARP2/3 pozitivní strukturu, popsánou převážně v Martinek et al., 2023.

Zajímala jsem se dále o to, zda GNL1 kolokalizuje s jinými známými markery. Jako marker endocytózy byl zvolen TPLATE-RFP, jehož lokalizace a dynamika v rovině pod PM byla detailně popsaná v literatuře (Gadeyne *et al.* 2014). Markerem exocytózy byla podjednotka komplexu exocyst EXO84b-RFP, která také lokalizuje v kortikální vrstvě (Fendrych *et al.* 2013). Oba markery endocytózy i exocytózy podle literatury vykazují v kortikální vrstvě podobné chování jako GNL1 – signál ve formě teček, které na určitou dobu zastavují svůj pohyb u plazmatické membrány. Tyto dvě linie byly nakřížené do rostlin, exprimujících GNL1-YFP marker. Analyzovaný typ buněk byly pokožkové buňky hypokotylu.

Poměr opravdového signálu oproti šumu (SNR, *signal-to-noise ratio*) v získaných videích znemožňoval automatizovanou analýzu kolokalizace. Proto před analýzou tato videa byla upravená dekonvolucí v programu Huygens PRO (Obr.24A–B). Vzhledem k výpočetní náročnosti dekonvoluce celého videa pro dekonvoluci byla zvolená menší plocha v rámci jedné buňky.

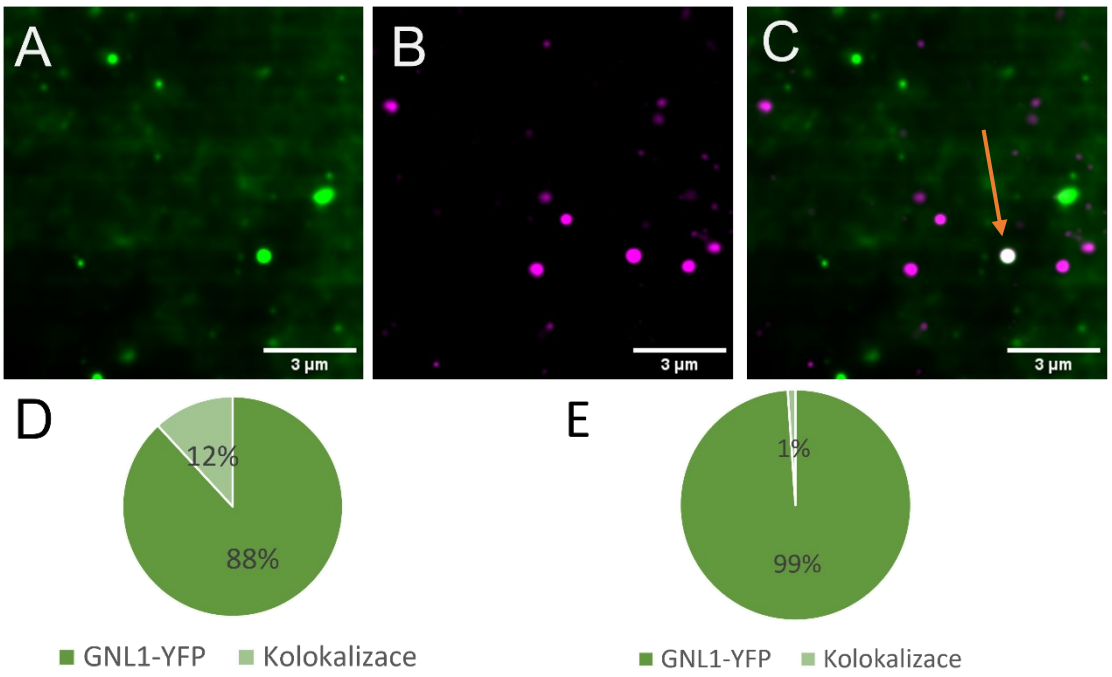


*Obrázek 24: Ukázka obrazové dekonvoluce GNL1-YFP v rovině TIRFM. Originální snímek (**A**), snímek po zpracování v programu Huygens PRO (**B**). Šipky ukazují na GNL1-YFP pozitivní struktury po a před zpracováním.*

Výsledky kolokalizační analýzy GNL1-YFP a TPL-RFP (Obr.25 A–C) poskytly následující údaje. TPL-RFP struktury byly na analyzovaných videích z vybraných částí cytoplazmy početnější, než GNL1-YFP struktury. Z celkového počtu 327 detekovaných GNL1-YFP struktur s TPL-RFP kolokalizuje 44 z nich (12 %) (Tab 4, Obr.25 D). Míra kolokalizace u negativní kontroly, dosažené otočením jednoho z kanálů o 90°, byla 1 % (4 struktury z 367 GNL1-YFP struktur) (Tab. 4, Obr.25 E). V tabulce 4 jsou zároveň uvedeny počty všech struktur a kolokalizací pro vzorek a negativní kontrolu.

	Celkový počet GNL1-YFP	**Celkový počet TPL-RFP**	**Celkový počet kolokalizovaných struktur**	**Celkový počet analyzovaných struktur**
Vzorek	327	635	44	1006
Kontrola	367	675	4	1046

Tabulka 4: Výchozí počty GNL1-YFP, TPL-RFP a kolokalizovaných struktur pro vzorek a negativní kontrolu. Počet analyzovaných videí – 18, počet různých rostlin – 3.

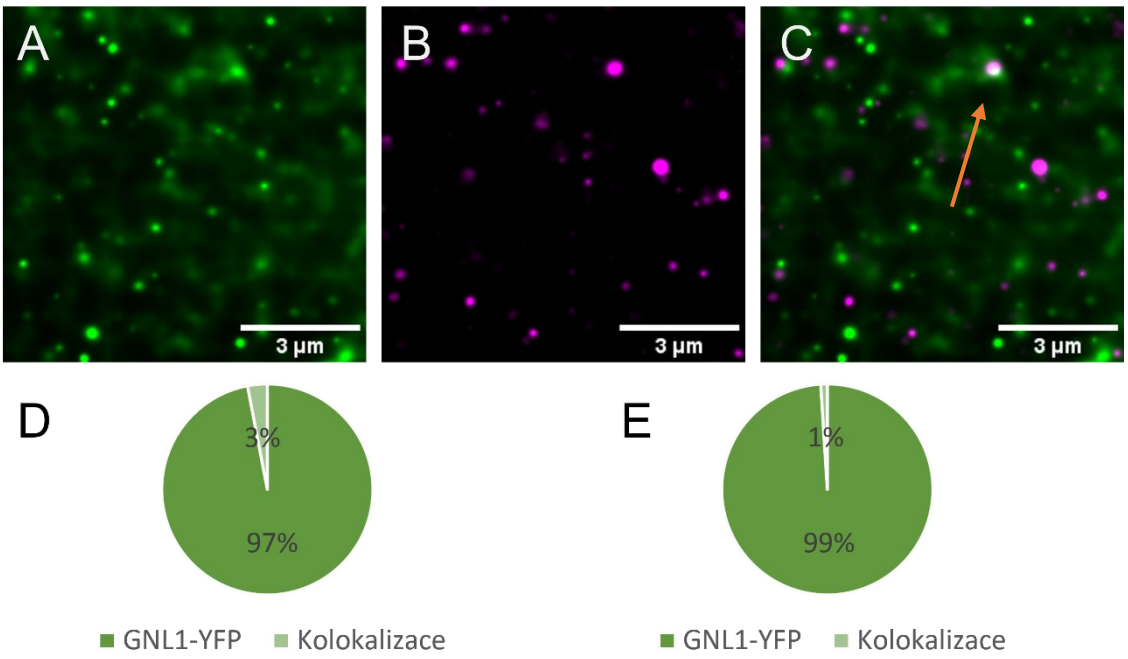


*Obrázek 25: Kolokalizace GNL1-YFP (**A**) a TPL-RFP (**B**), kompozitní obrázek (**C**) v pokožkových buňkách hypokotylu. Kvantifikace kolokalizace vzorku (**D**) a negativní kontroly, dosažené otočením jednoho z kanálu o 90° (**E**). Šipka v C ukazuje na příklad kolokalizace.*

Hodnocení míry kolokalizace EXO84b-RFP a GNL1-YFP poskytlo následující výsledky (Tab. 5, Obr.26 A–C). Podobně jako v případě předchozího pokusu, GNL1-YFP byly méně početné než EXO84b-RFP struktury. Z celkového počtu 290 detekovaných GNL1-YFP struktur na všech analyzovaných videích kolokalizuje s EXO84b-RFP pouze 9 z nich (3 %) (Obr.26 D). Míra kolokalizace u negativní kontroly, dosažené otočením jednoho z kanálů o 90°, byla 1 % (3 struktury z 296) (Obr.26 E). V tabulce 5 jsou uvedené počty všech struktur a kolokalizace pro vzorek a negativní kontrolu.

	Celkový počet GNL1-YFP	**Celkový počet EXO84b-RFP**	**Celkový počet kolokalizovaných struktur**	**Celkový počet analyzovaných struktur**
Vzorek	290	414	9	713
Kontrola	296	420	3	719

Tabulka 5: Výchozí počty GNL1-YFP, EXO84b-RFP a kolokalizovaných struktur pro vzorek a negativní kontrolu. Počet analyzovaných videí – 15, počet různých rostlin – 4.



*Obrázek 26: Kolokalizace GNL1-YFP (**A**) a EXO84b-RFP (**B**), kompozitní obrázek (**C**) v pokožkových buňkách hypokotylu. Kvantifikace kolokalizace vzorku (**D**) a negativní kontroly, dosažené otočením jednoho z kanálu o 90° (**E**). Šipka v C ukazuje na příklad kolokalizace.*

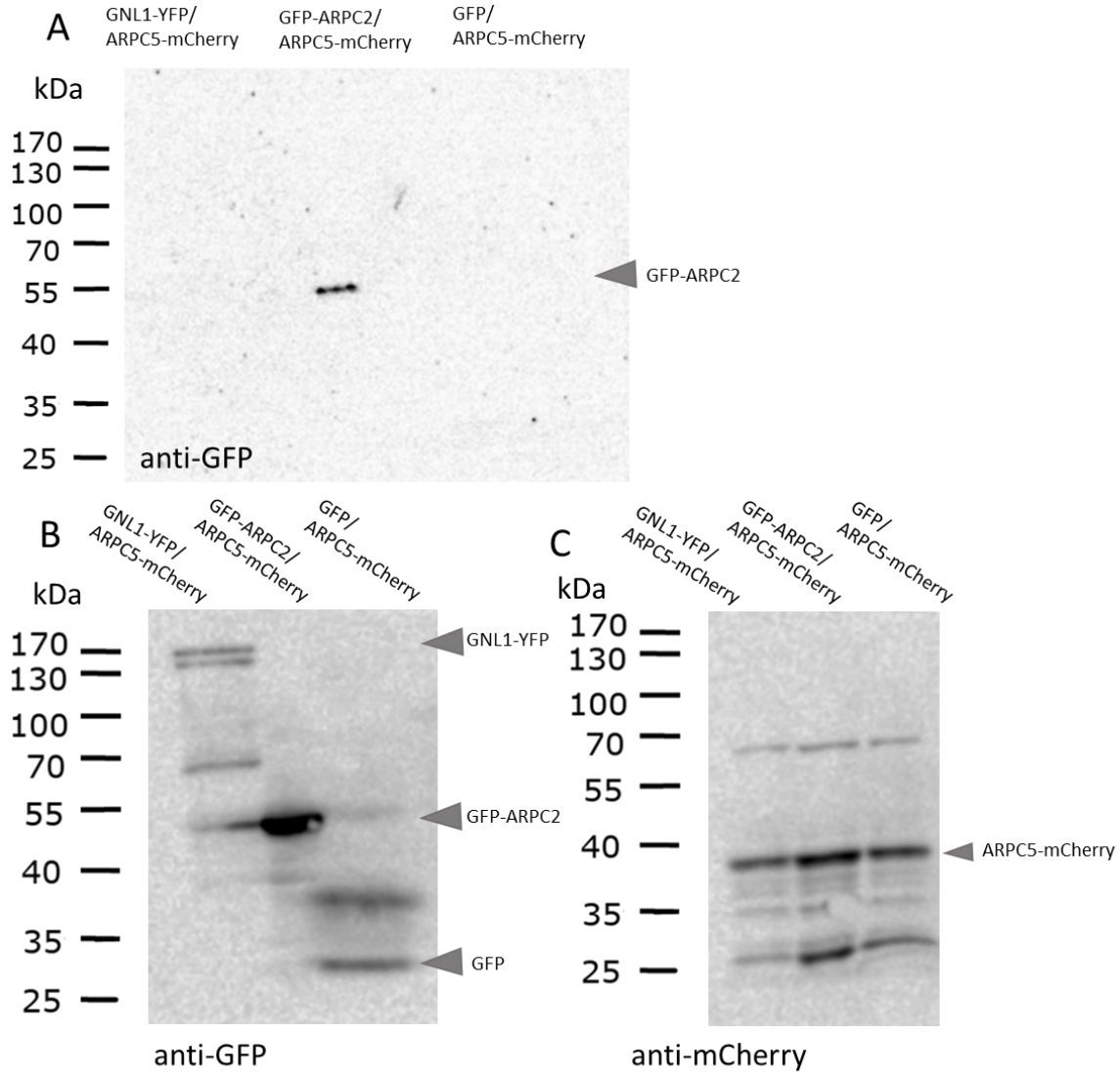
6.4 Koimunoprecipitace markerů GA a podjednotek ARP2/3

Interakci mezi markery GA a ARP2/3 nebylo možné hodnotit opticky, protože ne všechny markery byly u PM detekovatelné v mikroskopu. Další metodou hodnocení interakce, využívanou v této práci, je proto koimunoprecipitace. Tato metoda zároveň umožňuje využití stejného rostlinného materiálu, připraveného pro kolokalizaci, protože je založená na separaci a detekci pomocí protilátek anti-GFP nebo anti-mCherry.

6.4.1 GNL1 a ARPC5

Pro ověření interakce mezi GNL1 a ARP2/3 byla použitá dvojitá linie *Arabidopsis*, exprimující GNL1-YFP a ARPC5-mCherry, kterou jsem získala křížením. Jako pozitivní kontrola byla použitá linie GFP-ARPC2/ARPC5-mCherry, která byla publikována jako dvojice proteinů, které spolu koimunoprecipitují (Jelínková 2021). Linie ARPC5-mCherry/GFP z databáze laboratoře sloužila jako negativní kontrola. V tomto experimentu byl použit RFP-trap, protože všechny tři vzorky obsahovaly ARPC5-mCherry. Použitá byla totální proteinová frakce. Detekce GNL1-YFP pomocí anti-GFP protilátky přítomnost GNL1-YFP neukázala (Obr.27 A). GNL1-YFP a ARPC5-mCh byly

detekovány v proteinové frakci před separaci v kolonkách (*input*) (Obr.27 B–C), a proto lze uzavřít, že k interakci mezi těmito proteiny nedochází.

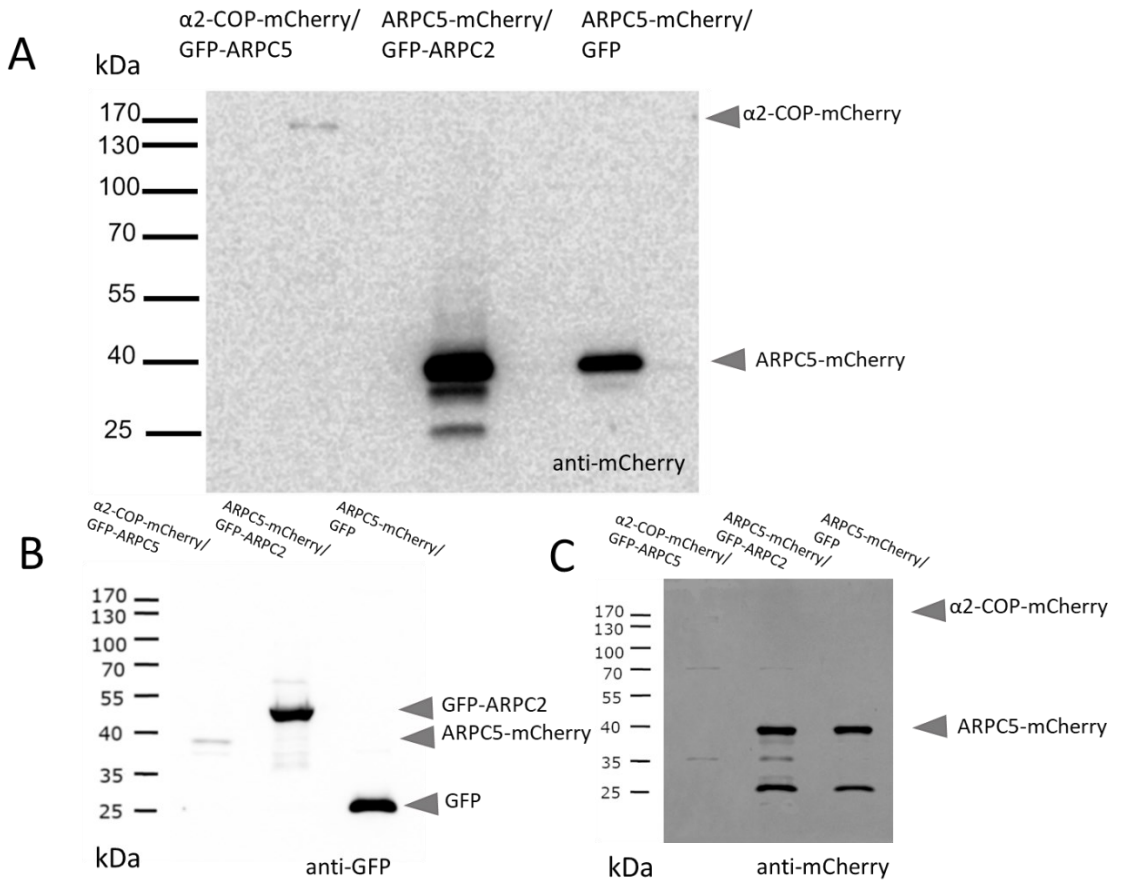


*Obrázek 27: Koimunoprecipitace GNL1-YFP/ARPC5-mCh. Western blot detekce anti-GFP protilátkou, totální frakce po koimunoprecipitaci. Přítomnost GNL1-YFP (~ 180 kDa) v koimunoprecipitačním vzorku nebyla detekovaná, na rozdíl od pozitivní kontroly GFP-ARPC2 (~ 60 kDa) (**A**). Western blot detekce anti-GFP protilátkou, input (**B**), Western blot detekce anti-mCherry protilátkou, input (**C**). Přítomnost GNL1-YFP, GFP-ARPC2, ARPC5-mCherry (~ 40 kDa) a GFP (~ 25 kDa) v inputech byla detekovatelná potvrdila přítomnost proteinů. Šipka ukazuje na proužek, odpovídající GNL1-YFP na B a GFP-ARPC5-mCherry na C.*

6.4.2 α2-COP a ARPC5

Pro ověření interakce mezi α2-COP a ARPC5 byla použitá dvojitá linie α2-COP-mCh/GFP-ARPC5, kterou jsem připravila transformací. Pro koimunoprecipitaci byl použit GFP-trap. Jako pozitivní a negativní kontroly byly využité stejné linie GFP-ARPC2/ARPC5-mCherry, resp. ARPC5-mCherry/GFP. Protože jsem použila GFP-trap na rozdíl od předchozího pokusu, pro Western blot detekci koimunoprecipitace byla použitá anti-mCherry protilátka.

Výsledky pokusu nebyly konkluzivní: detekce pomoci anti-RFP prokázala přítomnost slabého proužku, odpovídajícího velikosti α2-COP-mCherry. Zároveň však byl detekován i pruh v negativní kontrole (ARPC5-mCherry) (Obr.28 A). Signál α2-COP-mCherry může být slabý kvůli tomu, že v inputu je malé množství jak α2-COP-mCherry (Obr.28 C), tak i GFP-ARPC5 (Obr.28 B). Z důvodu nedostatku času nebyl pokus opakován před ukončením této diplomové práce. V budoucnosti je třeba tento experiment opakovat s jiným materiálem, ve kterém je větší množství obou proteinů, aby bylo možné udělat přesný závěr.



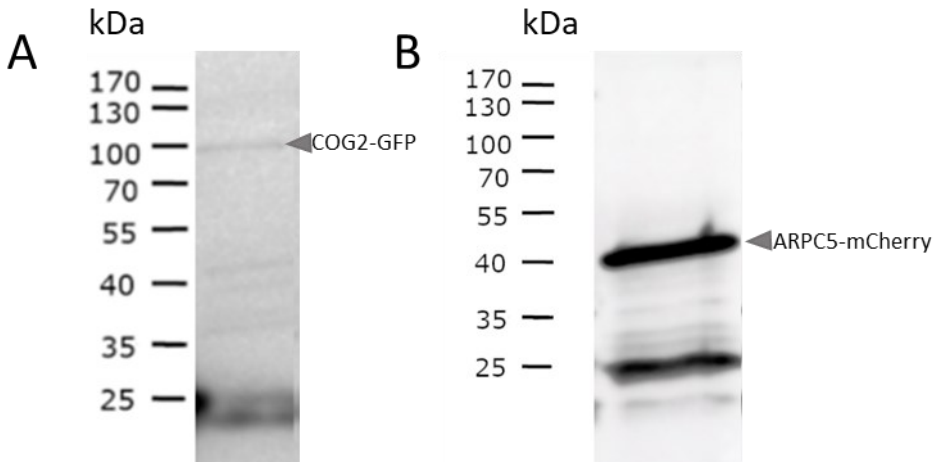
*Obrázek 28: Western blot detekce pomoci anti-mCherry protilátky z totální proteinové frakce. Přítomnost α2-COP-mCherry (~ 170 kDa) a ARPC5-mCherry (~ 40 kDa) je detekovatelná v koimunoprecipitačním vzorku. Detekovatelná je však i negativní kontrola, také ARPC5-mCherry (**A**), Western blot detekce anti-GFP protilátkou, input (**B**), Western blot detekce anti-mCherry protilátkou, anti-mCherry (**C**). Šipka ukazuje na proužek, odpovídající α2-COP-mCherry na A a C a GFP-ARPC5 na B. Pořadí vzorků je pro všechny bloty stejné.*

6.4.3 COG2 a ARPC5

Jak bylo řečeno v předchozích kapitolách, vytvořila jsem vektor COG3 ve fúzi s RFP, avšak vektor nebyl v rostlinách exprimován. Z tohoto důvodu jsem využila existující linii COG2-GFP a zkřížila ji s ARPC5-mCherry linií, kterou jsem dále využila na koimunoprecipitační test interakce COG a ARP2/3 komplexů. Předchozí ko-imunoprecipitační pokus pro detekci α2-COP a ARPC5 ukázal, že malé množství α2-COP-mCherry a GFP-ARPC5 v celkovém proteinovém extraktu není vhodné pro detekci interakce. Proto před dalším experimentem byla provedena kontrolní izolace COG2-GFP

a ARPC5-mCh z rostlinného materiálu s následující Western blot detekcí. Tato izolace měla ověřit, zda jsou tyto proteiny exprimované v dostatečném množství pro provedení koimunoprecipitace.

Jak je vidět z výsledných blotů, ve dvojité COG2-GFP/ARPC5-mCherry linii je nízká exprese COG2-GFP. Protein je slabě detekovatelný na membráně po Western blotu jako slabý proužek (Obr.29 A). Naopak exprese ARPC5-mCherry je poměrně vysoká (Obr. 29 B). Koimunoprecipitace proto nebyla provedena: exprese COG2-GFP byla příliš nízká pro důvěryhodné hodnocení interakce s ARPC5-mCherry.



*Obrázek 29: Western blot detekce množství COG2-GFP (~ 100 kDa) (**A**) a ARPC5-mCherry (~ 40 kDa) (**B**) v celkovém proteinovém extraktu z totální buněčné frakce. Oranžová šipka ukazuje na slabý proužek, který by mohl odpovídat velikosti COG2-GFP.*

7. Diskuze

7.1 Klonování COG3 a α2-COP

Prvním cílem této práce byla výroba fluorescenčních markerů α2-COP a COG3. Pro jejich tvorbu byl využit klonovací systém GoldenBraid2.0.

Úspěšná výroba a transformace rostlin konstruktem α2-COP-mCherry ukazuje, že modulární klonovací systém GoldenBraid2.0 je robustní alternativa klasického restrikčního klonování, které se doposud běžně používá. Tato metoda umožňuje výrobu modulárních konstruktů s větším výběrem z různých promotorů a fluoroforů. Její další výhodou je restrikční-ligační reakce. Na rozdíl od klasického restrikčního klonování při sestavení modulárních konstruktu se nemusí dělat digesce a izolace DNA z gelu, protože je to součástí této reakce. Goldenbraid2.0 systém proto bude dále v laboratoři využíván.

Neúspěšná výroba COG3-mCherry však naznačuje, že i při použití systému GoldenBraid2.0 může vzniknout nefunkční konstrukt. Tento problém může být výsledkem mnoha problémů v restrikční-ligační reakci samotné nebo např. v sekvencích vektorů, ve kterých se udržují modulární časti. Proto se před reakci provádí kontrolní digesce plazmidů. Výsledný plazmid také musí být zkontrolován, případně osekvenován pomocí vhodných primerů. Neúspěšná transformace *Arabidopsis* také být způsobena chybami v transformačním protokolu či při kultivací. Je také možné, že rekombinantní protein interferuje se základními buněčnými procesy, a proto nejsou transformovavé buňky životaschopné. Tato poslední možnost je spíše nepravděpodobná, neboť COG2-GFP je možno exprimovat v rostlinách bez zásadních potíží. K vyloučení těchto možností by bylo třeba zkontrolovat plazmid sekvenováním a opakovat transformaci za různých podmínek. V rámci této práce to nebylo možné z časových důvodů.

7.2 Mikroskopie COG2 a α2-COP

Protože transformace rostlin konstruktem COG3-mCherry nebyla úspěšná, pro pozorování lokalizace komplexu COG jsem použila rostliny, exprimující COG2-GFP. Pro pozorování COPI byl použit konstrukt α2-COP-mCherry vytvořený v rámci této práce.

Oba markery značí GA membrány. Tato lokalizace je detekovatelná pomocí konfokální mikroskopie a VAEM. Pro následující výzkum lokalizace těchto markerů v rámci GA cisteren může být zajímavá jejich kolokalizace s dalšími markery endomembránového

systému a GA, příp. pozorovaní různých subdomén GA pomocí metod superrezoluční mikroskopie. Tato pozorování by mohla definovat přesnou roli studovaných proteinů ve specifických doménách GA a ve vztahu k jiným endomembránovým kompartmentům, např. endoplazmatickému retikulu nebo markerům TGN, organizovaným do různých zón, popsaných v Shimizu *et al.* 2021. Dalším důležitým pokusem, který bude třeba provést, je komplementace mutantních linii těmito konstrukty jako validace toho, že tyto proteiny jsou funkční i s C-terminálním fluoroforem a dokážou funkčně plně nahradit endogenní protein. Dále tyto rekombinantní proteiny můžou být použitelné pro např. potvrzení interakce COG a COPI, popsané v kvasinkách (Suvorova *et al.* 2002), nebo COG a SNARE proteinů, popsané v savčích buňkách (Laufman *et al.* 2013), u rostlin. Tyto otázky jsou důležité, protože o rostlinných COG a COPI máme informace většinou pouze ze studia mutantních fenotypů (např. Tan *et al.* 2016 a Gimeno-Ferrer *et al.* 2016). Vzhledem k tomu, že rostlinný COG má unikátn funkci v syntéze buněčné stěny v xylému a kolokalizaci s komplexem exocyst (Oda *et al.* 2015, Vukašinovič *et al.* 2017) mohl by být zajímavý výzkum architektury celého komplexu, který nemusí odpovídat publikovaným výsledkům ze savců nebo kvasinek (Ungar *et al*. 2005). V případě buněk xylému se například neví, jestli tato funkce je specifická pouze pro podjednotku COG2 nebo jestli se na tomto procesu podílí celý komplex COG.

Lokalizace těchto dvou markerů pozorovaná v mé práci odpovídá předpokládané funkci. Markery značí tečkovité struktury vytvářející kruhovitý útvar, který je velmi pohyblivý. Lze předpokládat, že se jedná o jednu či více cisteren GA, na jejichž okraji se odštěpují váčky, které jsou tvořené COPI obalem (v případě α2-COP-mCherry) a které nesou i COG komplex (COG2-GFP, Ungar *et al.* 2002). Pomocí VAEM lze pozorovat i dynamiku váčků na okraji otáčejících se cisteren, které vznikají a odštěpují se. Kromě struktur GA oba markery však značí i další struktury v cytoplazmě, nezávislé na GA cisternách. Tyto struktury jsou pozorovatelné pouze pomocí VAEM. Jedná se o samostatně se pohybující váčky. Význam těchto struktur v následujícím výzkumu může odhalit např. kolokalizace s markery endomembránového systému. V případě COG2 může být zajímavé opakování kolokalizace demonstrované v Oda *et al.* 2015 s mikrotubulárním cytoskeletem a komplexem exocyst pomocí VAEM a kvantifikace kolokalizace pomocí metod, zavedených v laboratoři.

V případě těchto struktur zároveň však nelze vyloučit artefakt overexprese: oba konstrukty jsou exprimované pod silným promotorem ve WT pozadí. Proto podporou by mohl být pokus s komplementací konstruktem exprimovaným pod např. nativním promotorem. Protože mutantní linie *cog2* nebo *α2-cop* nejsou momentálně v laboratoři k dispozici, tento pokus nebyl proveden.

7.3 ARPC4-mCherry nelokalizuje v rovině TIRFM

Jedním z výstupů této práce je konstrukt ARPC4-mCherry ve vektoru pGreen0129. ARPC4-mCherry lokalizuje na peroxisomech jako celkem výrazná struktura (Martinek *et al.* 2023) a v cytoplazmě lze pozorovat difúzní signál (lze např. pozorovat negativně značené organely). Proti GFP-ARPC5 a GFP-ARPC2 (Jelínková 2021) však ARPC4-mCherry nevytváří v rovině PM drobné dynamické struktury, detekovatelné pomocí TIRFM.

Jedním z předběžných výsledků naší laboratoře je to, že proteiny, označené mCherry nebo RFP, jsou hůře detekovatelné v rovině TIRF než GFP-fúzované proteiny. Momentálně v laboratoři není k dispozici mCherry-fúzovaný marker ARP2/3, který by byl v rovině PM detekovatelný. To znemožňuje analýzu kolokalizace ARP2/3 s GNL1-YFP, která byla jedním z původních cílů této práce. Jedním z důvodů, proč mCherry nebo RFP-fúzované podjednotky nejsou pozorovatelné v TIRFM v rovině PM jako drobné struktury, může být nízká hodnota jasu mCherry oproti např. GFP (15,84 $cm^{-1}M^{-1}$ oproti 33,54 $cm^{-1}M^{-1}$ podle online dostupného zdroje https://www.fpbase.org/). Možným řešením je tvorba nového konstruktu APRC4 nebo jiné podjednotky ARP2/3 s jasnějším fluoroforem, např. mScarlet (Bindels *et al.* 2017, jas 70 $cm^{-1}M^{-1}$), a jeho exprese v rostlinách. Na tvorbě mScarlet-ARPC5 pomocí systému GoldenBraid2.0 se momentálně pracuje v laboratoři.

7.4 GNL1 lokalizuje v rovině PM v podobě dynamických teček v TIRFM

GNL1 vytváří dynamické tečkovité struktury v rovině PM, které rychle vznikají a zanikají. Tyto struktury jsou pozorovatelné pouze pomocí TIRFM/VAEM mikroskopie a v konfokálním mikroskopu detekovatelné nejsou kvůli jejich malé jasnosti, malé velikosti a velké dynamice. Tyto struktury jsou dynamické a jejich *lifetime* je většinou (70 % případů) 0,25 až 0,5 vteřin. Je proto otázkou, jestli přítomnost těchto struktur má biologickou relevanci a není pouze artefaktem např. overexprese proteinu. Protiargumentem toho, že GNL1 pozitivní struktury jsou artefaktem overexprese je to, že se jedná o linii, exprimující GNL1-YFP v mutantním *gnl1-1* pozadí pod nativním promotorem (Richter *et al.* 2007). V již publikované literatuře bylo zároveň ukázáno, že GNL1-YFP dokáže komplementovat funkci endogenního proteinu (Teh a Moore 2007). Může se jednat o váčky asociované s GA cisternami váčky, které se dostávají do roviny TIRFM náhodně z rychle se pohybujících diktyosomů v rovině, která není zobrazena. Dalším argumentem

pro biologicky relevantní strukturu je fakt, že zbytek detekovaných teček (okolo 30 %) vykazuje delší lifetime (viz Obr.22 B). Tyto struktury již nepochybně biologicky relevantní jsou.

Obecně se při měření *lifetime* PM-asociovaných struktur nejkratší časy vynechávají. V případě manuální analýzy nejkratší události nejsou detekovány. V případě automatizované analýzy CME autoři studií započítávají jenom události, odpovídající známým hodnotám trvání endocytózy v buňce (Johnson *et al.* 2020). Faktem však je, že automatické analýzy ukazují, že i v případě markerů CME je mnoho detekovaných událostí lokalizovaných v nejkratších časových intervalech (nepublikované výsledky laboratoře a Narasimhan *et al.* 2020). Např. Narasimhan *et al.* 2020 popisuje tři kategorie detekovaných událostí, spojených s CME: 1 vteřina, 8 vteřin a 42 vteřiny. Je třeba si uvědomit, že kdybychom aplikovali běžné postupy v analýze CME (například hodnotit pouze události, které zůstávají v místě více než jeden snímek), ztratili bychom více než polovinu detekovaných událostí. V tomto případě se těžko stanoví nejkratší možný čas, který lze počítat za biologicky relevantní, nebo pevná hranice, oddělující náhodné jevy od nenáhodných, protože není známo, zda události s velmi krátkým lifetime jsou artefakt, či biologicky relevantní událost (např. CME událost, která byla ukončena záhy po své iniciaci – tzv. abortovaná endocytotická událost).

Měření dynamiky GNL1-YFP v mutantním *arpc5* pozadí nebo po ošetření LatB ukazuje malý vliv ARP2/3 nebo aktinového cytoskeletu na jejich dynamiku, příp. výsledky nejsou konkluzivní. Statisticky signifikantní rozdíl je mezi proporcemi lifetime 0,25-0,5 vteřin u GNL1-YFP WT a v *arpc5* pozadí. Interpretace těchto výsledků je však obtížná vzhledem k již zmíněné problematice hodně krátkých časů. Z těchto výsledků lze však říct, že GNL1-YFP v *arpc5* pozadí má tendenci mít delší lifetime než ve WT pozadí. Může funkce ARP2/3 souviset s rychlejším transportem GNL1 struktur z roviny PM do buňky, který se v *arpc5* pozadí zpomaluje?

Přesná funkce ARP2/3 v tomto procesu se však těžko stanovuje právě proto, že spojení rostlinného komplexu ARP2/3 nebo aktinového cytoskeletu a markerů endomembránového systému v rovině není dobře prozkoumané téma. Např. recentní práce Narasimhan *et al.* 2020 popisuje, že tvorba endocytotického váčků na PM je nezávislá na aktinu. Na aktinu je však závislý následující transport a zánik váčku z roviny PM. Autoři popisují tzv. *actin whipping* – vznik kratší větve aktinového cytoskeletu v blízkosti staršího endocytotického váčku těsně před jeho zánikem. Autoři předpokládají, že aktinový cytoskelet „sbírá“ váčky do časného endozómu/TGN. Může *actin whipping* souviset s funkcí ARP2/3 a nějakým způsobem ovlivňovat zánik GNL1

z roviny PM? Je potřeba provést několik pokusů, které by mohly tuto hypotézu podpořit nebo zamítnout. Autoři porovnávají lokalizaci endocytického markerů s aktinovým cytoskeletem a analogický pokus lze provést s GNL1. Spojení ARP2/3 s těmito *actin whip* strukturami lze zkoumat např. pomocí pozorování těchto události v mutantním pozadí *arp2/3*. Je však důležité si uvědomit, že Narasimhan *et al.* 2020 popisuje *actin whipping* v kontextu markerů CME a internalizaci endocytotických váčků. Může podobný mechanismus fungovat při zániku dynamických GNL1 struktur z roviny PM?

Četnost GNL1 struktur, které v rovině PM zůstávají déle než 2 vteřiny, je nižší než četnost struktur s kratším *lifetime*. Jakou funkci by mohly tyto struktury plnit? Protože GNL1 je ARF GEF, jednou z možných interpretací je funkce těchto stabilnějších GNL1 struktur v aktivaci GTPázy a tvorbě váčků na PM. Podobná role již byla navržená pro homolog GNL1, GN (Naramoto *et al.* 2010). V případě GN se tato funkce vztahuje k regulaci endocytózy (Naramoto *et al.* 2010) nebo sekreci internalizovaného materiálu (Geldner *et al.* 2003). O menší roli GNL1 v endocytóze určitých proteinů (PIN1) v buňkách *Arabidopsis thaliana* se též uvažovalo ve starší literatuře (Teh a Moore 2007). Homolog GNL1 v *Nicotiana tabacum* je také spojován endocytózou (Jelínková *et al.* 2015). Také výsledky mých analýz kolokalizace GNL1-YFP markeru s markery endocytózy a exocytózy (viz níže) naznačily, že GNL1-YFP v nízké frekvenci kolokalizuje s endocytotickým markerem. Lze tedy uzavřít, že je možné, že GNL1 protein se na endocytóze, nebo na části endocytotických událostí, podílí.

Jedním z dalších nástrojů studia GNL1 v endocytóze by mohlo být měření jeho dynamiky pomocí TrackMate, které je však komplikované kvůli velkému počtů krátkých *lifetime* a poměrné vzácnosti dlouhých *lifetime*. Dalším nástrojem může být (dynamická) kolokalizace GNL1 struktur s markery endocytózy, viz dále.

Další změnou, která by mohla usnadnit pozorování GNL1 v TIRFM a ovlivnit I výsledky měření dynamiky, může být použití konstruktu s jasnějším fluoroforem než YFP. Jak je vidět na obrázku 19, GNL1-YFP struktury v TIRFM jsou špatně viditelné a mají nízký *signal-to-noise* ratio. Tento problém může ovlivňovat jak pozorování těchto struktur, tak i jich analýzu pomocí automatizovaných metod jako je TrackMate nebo ComDet.

7.5 Analýza kolokalizace GNL1 s TPLATE a EXO84b

Dalším výstupem této práce je sada skriptů pro analýzu kolokalizace tečkovitých struktur. Tato metoda je robustní a umožňuje práci s větším množstvím dat. Obrazová dekonvoluce pomocí Huygens PRO zároveň umožňuje odstranění šumu a segmentaci

obrazu, což bylo pro detekci pomocí ComDet nezbytné. Toto nebylo případem TrackMate: detekce v TrackMate umožňuje detekci GNL1-YFP struktur bez předchozích úprav (viz kap. 5.2.3, Obr.22 A). Nevýhodou použití dekonvoluce je poměrně vysoká výpočetní náročnost.

Nevýhodou pluginu ComDet může být nutnost použití projekce několika snímků a nemožnost hodnocení kolokalizace dvou dynamických bodů v čase. Použití projekce je vhodné pro stabilnější komplexy, ale může docházet ke ztrátě informace nebo tvorbě artefaktů u rychlejších struktur, kterými jsou GNL1 struktury. Alternativní metodou může být např. použití TrackMate a jiných programů pro porovnání trajektorií dvou markerů v čase a jejich dynamickou kolokalizaci (Bibeau *et al.* 2020).

Kolokalizace GNL1-YFP s mCherry-*At*ARPC4 nebyla možná z důvodů, zmíněných v kapitole 6.3. Proto nelze uzavřít, že GNL1 kolokalizuje nebo nekolokalizuje s ARP2/3 komplexem. Kapitola 6.3 zároveň jíž navrhuje řešení tohoto problému.

Zároveň mě zajímala kolokalizace GNL1-YPF s jinými markery, lokalizujícími v rovině PM, která je tedy pozorovatelná pomocí TIRFM. Proto výše zmíněná metoda hodnocení kolokalizace byla otestovaná na jiných vzorcích. Tyto kolokalizační pokusy zároveň měly za cíl ukázat, jestli GNL1 pozitivní struktury jsou srovnatelné s jinými markery, lokalizujícími v rovině PM. Jak již bylo zmíněno výše, GNL1 je spojován s endocytózou v literatuře (Teh and Moore 2007, Jelínková *et al.* 2015) a jeho homolog GN již byl kolokalizován s markery CME v rovině PM (Naramoto *et al.* 2010). Proto byla hodnocena kolokalizace mezi GNL1-YFP a TPLATE-RFP, markerem CME. 12 % GNL1-YFP struktur kolokalizuje s TPLATE-RFP. Míra kolokalizace není vysoká, ale je výrazná oproti 1 % u negativní kontroly. Kvůli již zmíněným nedostatkům ComDet při práci s videi je důležité provést dynamickou kolokalizací pomocí TrackMate nebo kymogramů, které by kromě kolokalizace mohly srovnat *lifetime* dvou kolokalizujících TPLATE a GNL1. Naopak nízká je kolokalizace GNL1-YFP a EXO84b-RFP. Proto je málo pravděpodobně, že tyto GNL1 pozitivní struktury souvisejí s exocytotickými jevy, regulovanými komplexem exocyst.

Pro budoucí výzkum může být zajímavá kolokalizace GNL1-YFP v TIRF/VAEM s např. jinými markery GA. Bylo by zajímavé zjistit, jestli nějaký další marker GA se chová podobně jako GNL1 (kromě GA lokalizuje též u PM s delšími lifetime). V mé práci, kde jsem testovala tři GA markery (COG2, COPI a GNL1) se takto choval pouze marker GNL1. GNL1 jako ARF GEF může mít kromě membrán GA i další regulační role, třeba během endocytózy na PM. Tento váček může být specifický pro určitý typ endocytotické události, což vysvětluje poměrně nízké procento kolokalizace. O roli GNL1 pouze

v speciálních případech endocytózy se spekuluje i v Teh a Moore 2007. Z tohoto důvodu by mohlo být důležité biochemické potvrzení interakce GNL1 a endocytotických markerů nebo kolokalizace s dalšími endocytotickými markery: podobně jako TPLATE, AP-2, DRP a klathrin mají lokalizaci v blízkosti PM, pozorovatelnou pomocí TIRFM (Konopka *et al.* 2008, Gadeyne *et al.* 2014). Důležitá také je identifikace Arf1 GTPázy, kterou by GNL1 v tomto procesu reguloval, a její pozorování v rovině PM pomocí TIRFM. Její identifikace může být však obtížná kvůli většímu počtu paralogů u Arabidopsis (Yorimitsu *et al.* 2014). Žádný z nich nebyl pozorován pomocí TIRFM nebo v kontextu endocytózy popsán. Role Arf1 GTPáz v endocytóze byla popsaná v živočišných buňkách (Kumari a Mayor 2008).

7.6 Koimunoprecipitace GA markerů s komplexem ARP2/3

Jako druhý způsob hodnocení interakce komplexu ARP2/3 a markerů sekretorické dráhy jsem zvolila koimunoprecipitaci. Použití mCherry fluoroforů při pozorování vzorků v TIRFM již bylo diskutováno výše. Tento problém však nemusí ovlivňovat výsledky koimunoprecipitace, založené na jiných principech. Přestože ARPC5-mCherry a ARPC4-mCherry znemožňují pozorování komplexu ARP2/3 v rovině PM a analýzu kolokalizace s markery GA, tyto konstrukty můžou být nadále používané pro biochemické potvrzení interakce.

Interakce GNL1 a ARP2/3 nebyla pomocí koimunoprecipitace detekovaná. To neznamená, že jejich interakce nemůže být detekovatelná pomoci jiných metod. Bez výsledků kolokalizace v TIRFM a dalších důkazu interakce však lze uzavřít, že GNL1 nejspíš s komplexem ARP2/3 neinteraguje.

Interpretace výsledků je složitější u dvou dalších markerů, α2-COP-mCherry a COG2-GFP. V obou případech se pokus musí opakovat s vhodnějším materiálem se silnější expresí proteinů, což z časových důvodů v rámci této diplomové práce nebylo možné. Před provedením experimentu se musí provést pečlivá optická selekce na kvalitu fluorescence a kontrola množství proteinů v celkovém proteinovém extraktu pomoci Western blot detekce (viz kapitola 5.4.4). Pouze potom bude možno spolehlivě porovnat dvě metody studia interakce proteinů, použité v této diplomové práci – mikroskopickou kolokalizaci a biochemickou metodu koimunoprecipitace.

Proto nelze uzavřít, že α2-COP-mCherry interaguje s komplexem ARP2/3, přesto, že na Western blot detekci je viditelný slabý pruh, odpovídající velikosti α2-COP-mCherry (viz kapitola 5.4.3). Tyto výsledky nejsou důvěryhodné i proto, že je viditelný silný proužek i v případě negativní kontroly. Z časových důvodů se tento experiment neopakoval, ale

jeho opakování s jiným materiálem je pro další výzkum interakce ARP2/3 s GA markery velmi důležité.

8. Závěry

1. Byly připraveny nové fluorescenční markery COG3 a α2-COP pro studium interakce COPI a COG komplexu s ARP2/3 komplexem.
2. Pomocí VAEM byly detekovány váčky značené markery COG2, GNL1 α2-COP, které se vyskytovaly na okrajích cisteren jednotlivých diktyosomů. VAEM prokázal existenci dosud nepopsaných GNL1-pozitivních struktur s typickou dynamikou v blízkosti PM. COG3 a α2-COP tuto lokalizaci nemají.
3. GNL1 struktury u PM většinou mají *lifetime* 0,25–0,5 vteřin. Tuto dynamiku neovlivnila aplikace Latrunkulinu B. *arpc5* rostliny měly větší podíl stabilních GNL1 struktur. GNL1-pozitivní váčky vykazují slabou kolokalizaci s markerem pro endocytózu a nevykazují kolokalizaci s markery exocytózy.
4. Koimunoprecipitační pokus ukázal, že GNL1 s komplexem ARP2/3 neinteraguje. Potvrzení mikroskopických výsledků pomocí koimunoprecipitace COG2 a α2-COP s podjednotkami ARP2/3 se nezdařilo kvůli slabé expresi testovaných markerů.
5. V laboratoři byl zaveden unikátní postup analýzy dynamiky (TrackMate) a kolokalizace (ComDet, Huygens PRO) struktur detekovaných ve VAEM mikroskopu.

Seznam literatury

Ahn H-K, Kang YW, Lim HM, Hwang I, Pai H-S. **2015**. Physiological Functions of the COPI Complex in Higher Plants. *Molecules and Cells* **38**: 866–875.

Anders N, Nielsen M, Keicher J, *et al.* 2008. Membrane Association of the *Arabidopsis* ARF Exchange Factor GNOM Involves Interaction of Conserved Domains. *The Plant Cell* **20**: 142–151.

Antonin W, Fasshauer D, Becker S, Jahn R, Schneider TR. **2002**. Crystal structure of the endosomal SNARE complex reveals common structural principles of all SNAREs. *Nature Structural Biology* **9**: 107–111.

Appenzeller-Herzog C, Hauri H-P. **2006**. The ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC): in search of its identity and function. *Journal of Cell Science* **119**: 2173–2183.

Arora D, Damme DV. **2021**. Motif-based endomembrane trafficking. *Plant Physiology* **186**: 221–238.

Bandmann V, Müller JD, Köhler T, Homann U. **2012**. Uptake of fluorescent nano beads into BY2-cells involves clathrin-dependent and clathrin-independent endocytosis. *FEBS Letters* **586**: 3626–3632.

Bannykh SI, Rowe T, Balch WE. **1996**. The organization of endoplasmic reticulum export complexes. *Journal of Cell Biology* **135**: 19–35.

Bashline L, Li S, Anderson CT, Lei L, Gu Y. **2013**. The endocytosis of cellulose synthase in Arabidopsis is dependent on μ2, a clathrin-mediated endocytosis adaptin. *Plant Physiology* **163**: 150–160.

Bashline L, Li S, Zhu X, Gu Y. **2015**. The TWD40-2 protein and the AP2 complex cooperate in the clathrin-mediated endocytosis of cellulose synthase to regulate cellulose biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**: 12870–12875.

Basu D, El-Assal SE-D, Le J, Mallery EL, Szymanski DB. **2004**. Interchangeable functions of *Arabidopsis* PIROGI and the human WAVE complex subunit SRA1 during leaf epidermal development. *Development* **131**: 4345–4355.

Basu D, Le J, El-Essal SE-D, *et al.* 2005. DISTORTED3/SCAR2 Is a Putative Arabidopsis WAVE Complex Subunit That Activates the Arp2/3 Complex and Is Required for Epidermal Morphogenesis. *The Plant Cell* **17**: 502–524.

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

Beck R, Sun Z, Adolf F, *et al.* 2008. Membrane curvature induced by Arf1-GTP is essential for vesicle formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 11731–11736.

Ben-Tekaya H, Miura K, Pepperkok R, Hauri H-P. **2005**. Live imaging of bidirectional traffic from the ERGIC. *Journal of Cell Science* **118**: 357–367.

Bibeau JP, Furt F, Mousavi SI, *et al.* 2020. In vivo interactions between myosin XI, vesicles and filamentous actin are fast and transient in Physcomitrella patens. *Journal of Cell Science* **133**: jcs234682.

Bindels DS, Haarbosch L, van Weeren L, et al. 2017. mScarlet: a bright monomeric red fluorescent protein for cellular imaging. Nature Methods 14: 53–56.

Böhlenius H, Mørch SM, Godfrey D, Nielsen ME, Thordal-Christensen H. **2010**. The Multivesicular Body-Localized GTPase ARFA1b/1c Is Important for Callose Deposition and ROR2 Syntaxin-Dependent Preinvasive Basal Defense in Barley. *The Plant Cell* **22**: 3831–3844.

Brembu T, Winge P, Seem M, Bones AM. **2004**. *NAPP* and *PIRP* Encode Subunits of a Putative Wave Regulatory Protein Complex Involved in Plant Cell Morphogenesis. *The Plant Cell* **16**: 2335–2349.

Brumm S, Singh MK, Kriechbaum C, *et al.* 2022. N-terminal domain of ARF-GEF GNOM prevents heterodimerization with functionally divergent GNL1 in Arabidopsis. *The Plant Cell* **112**: 772–785.

Brumm S, Singh MK, Nielsen ME, *et al.* 2020. Coordinated Activation of ARF1 GTPases by ARF-GEF GNOM Dimers Is Essential for Vesicle Trafficking in Arabidopsis. *The Plant Cell* **32**: 2491–2507.

Cai Y, Chin HF, Lazarova D, *et al.* 2008. The Structural Basis for Activation of the Rab Ypt1p by the TRAPP Membrane-Tethering Complexes. *Cell* **133**: 1202–1213.

Chen Z, Borek D, Padrick SB, *et al.* 2010. Structure and control of the actin regulatory WAVE complex. *Nature* **468**: 533–538.

Choi C, Davey M, Schluter C, *et al.* 2011. Organization and assembly of the TRAPPII complex. *Traffic* **12**: 715–725.

Chow C-M, Neto H, Foucart C, Moore I. **2008**. Rab-A2 and Rab-A3 GTPases Define a *trans*-Golgi Endosomal Membrane Domain in *Arabidopsis* That Contributes Substantially to the Cell Plate. *The Plant Cell* **20**: 101–123.

Cifrová P, Oulehlová D, Kollárová E, *et al.* 2020. Division of Labor Between Two Actin Nucleators—the Formin FH1 and the ARP2/3 Complex—in Arabidopsis Epidermal Cell Morphogenesis. *Frontiers in Plant Science* **11**: 148.

Cocucci E, Aguet F, Boulant S, Kirchhausen T. **2012**. The First Five Seconds in the Life of a Clathrin-Coated Pit. *Cell* **150**: 495–507.

Crowell EF, Bischoff V, Desprez T, *et al.* 2009. Pausing of Golgi Bodies on Microtubules Regulates Secretion of Cellulose Synthase Complexes in Arabidopsis. *The Plant Cell* **21**: 1141–1154.

Dahhan DA, Reynolds GD, Cárdenas JJ, *et al.* 2022. Proteomic characterization of isolated Arabidopsis clathrin-coated vesicles reveals evolutionarily conserved and plant-specific components. *The Plant Cell* **34**: 2150–2173.

Dai A, Yu L, Wang H-W. **2019**. WHAMM initiates autolysosome tubulation by promoting actin polymerization on autolysosomes. *Nature Communications* **10**: 3699.

daSilva LLP, Snapp EL, Denecke J, Lippincott-Schwartz J, Hawes C, Brandizzi F. **2004**. Endoplasmic Reticulum Export Sites and Golgi Bodies Behave as Single Mobile Secretory Units in Plant Cells. *The Plant Cell* **16**: 1753–1771.

Deeks MJ, Kaloriti D, Davies B, Malhó R, Hussey PJ. **2004**. Arabidopsis NAP1 Is Essential for Arp2/3-Dependent Trichome Morphogenesis. *Current Biology* **14**: 1410–1414.

Dettmer J, Hong-Hermesdorf A, Stierhof Y-D, Schumacher K. **2006**. Vacuolar H+-ATPase Activity Is Required for Endocytic and Secretory Trafficking in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **18**: 715–730.

Dhonukshe P, Aniento F, Hwang I, *et al.* 2007. Clathrin-Mediated Constitutive Endocytosis of PIN Auxin Efflux Carriers in Arabidopsis. *Current Biology* **17**: 520–527.

Di Rubbo S, Irani NG, Kim SY, *et al.* 2013. The Clathrin Adaptor Complex AP-2 Mediates Endocytosis of BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1 in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **25**: 2986–2997.

Ding B, Narvaez-Ortiz HY, Singh Y, Hocky GM, Chowdhury S, Nolen BJ. **2022**. Structure of Arp2/3 complex at a branched actin filament junction resolved by single-particle cryo-electron microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **119**: e2202723119.

Donohoe BS, Kang B-H, Staehelin LA. **2007**. Identification and characterization of COPIa- and COPIb-type vesicle classes associated with plant and algal Golgi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**: 163–168.

Doyle SM, Haeger A, Vain T, *et al.* 2015. An early secretory pathway mediated by GNOM-LIKE 1 and GNOM is essential for basal polarity establishment in Arabidopsis thaliana. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**: E806–E815.

Drakakaki G, van de Ven W, Pan S, *et al.* 2012. Isolation and proteomic analysis of the SYP61 compartment reveal its role in exocytic trafficking in Arabidopsis. *Cell Research* **22**: 413–424.

Driouich A, Follet-Gueye M-L, Bernard S, *et al.* 2012. Golgi-Mediated Synthesis and Secretion of Matrix Polysaccharides of the Primary Cell Wall of Higher Plants. *Frontiers in Plant Science* **3**: 79.

Dyachok J, Shao M-R, Vaughn K, *et al.* 2008. Plasma Membrane-Associated SCAR Complex Subunits Promote Cortical F-Actin Accumulation and Normal Growth Characteristics in Arabidopsis Roots. *Molecular Plant* **1**: 990–1006.

Fendrych M, Synek L, Pečenková T, *et al.* 2010. The *Arabidopsis* Exocyst Complex Is Involved in Cytokinesis and Cell Plate Maturation. *The Plant Cell* **22**: 3053–3065.

Fendrych M, Synek L, Pečenková T, *et al.* 2013. Visualization of the exocyst complex dynamics at the plasma membrane of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Biology of the Cell* **24**: 510–520.

Ford MGJ, Pearse BMF, Higgins MK, *et al.* 2001. Simultaneous Binding of PtdIns(4,5)P2 and Clathrin by AP180 in the Nucleation of Clathrin Lattices on Membranes. *Science* **291**: 1051–1055.

Fuji K, Shirakawa M, Shimono Y, *et al.* 2016. The Adaptor Complex AP-4 Regulates Vacuolar Protein Sorting at the trans-Golgi Network by Interacting with VACUOLAR SORTING RECEPTOR1. *Plant Physiology* **170**: 211–219.

Fujimoto M, Arimura S, Nakazono M, Tsutsumi N. **2007**. Imaging of plant dynamin-related proteins and clathrin around the plasma membrane by variable incidence angle fluorescence microscopy. *Plant Biotechnology* **24**: 449–455.

Fujiwara M, Uemura T, Ebine K, *et al.* 2014. Interactomics of Qa-SNARE in Arabidopsis thaliana. *Plant and Cell Physiology* **55**: 781–789.

Gadeyne A, Sánchez-Rodríguez C, Vanneste S, *et al.* 2014. The TPLATE Adaptor Complex Drives Clathrin-Mediated Endocytosis in Plants. *Cell* **156**: 691–704.

García-González J, Kebrlová Š, Semerák M, *et al.* 2020. Arp2/3 Complex Is Required for Auxin-Driven Cell Expansion Through Regulation of Auxin Transporter Homeostasis. *Frontiers in Plant Science* **11**: 486.

Geldner N, Anders N, Wolters H, *et al.* 2003. The Arabidopsis GNOM ARF-GEF Mediates Endosomal Recycling, Auxin Transport, and Auxin-Dependent Plant Growth. *Cell* **112**: 219–230.

Gimeno-Ferrer F, Pastor-Cantizano N, Bernat-Silvestre C, *et al.* 2016. α2-COP is involved in early secretory traffic in Arabidopsis and is required for plant growth. *Journal of Experimental Botany* **68**: 391–401.

Goley ED, Welch MD. **2006**. The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **7**: 713–726.

Goode BL, Eskin JA, Wendland B. **2015**. Actin and Endocytosis in Budding Yeast. *Genetics* **199**: 315–358.

Grones P, De Meyer A, Pleskot R, *et al.* 2022. The endocytic TPLATE complex internalizes ubiquitinated plasma membrane cargo. *Nature Plants*: 8, 1467–1483.

Gutierrez R, Lindeboom JJ, Paredez AR, Emons AMC, Ehrhardt DW. **2009**. Arabidopsis cortical microtubules position cellulose synthase delivery to the plasma membrane and interact with cellulose synthase trafficking compartments. *Nature Cell Biology* **11**: 797–806.

Hála M, Cole R, Synek L, *et al.* 2008. An Exocyst Complex Functions in Plant Cell Growth in *Arabidopsis* and Tobacco. *The Plant Cell* **20**: 1330–1345.

Hanton SL, Chatre L, Matheson LA, Rossi M, Held MA, Brandizzi F. **2008**. Plant Sar1 isoforms with near-identical protein sequences exhibit different localisations and effects on secretion. *Plant Molecular Biology* **67**: 283–294.

Hara-Kuge S, Kuge O, Orci L, *et al.* 1994. En Bloc Incorporation of Coatomer Subunits during the Assembly of COP-coated Vesicles. *The Journal of Cell Biology* **124**: 10.

Heinze L, Freimuth N, Rößling A-K, *et al.* 2020. EPSIN1 and MTV1 define functionally overlapping but molecularly distinct *trans* -Golgi network subdomains in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **117**: 25880–25889.

Hirst J, Schlacht A, Norcott JP, *et al.* 2014. Characterization of TSET, an ancient and widespread membrane trafficking complex. *eLife* **3**: e02866.

Hong Z, Bednarek SY, Blumwald E, *et al.* 2003. A unified nomenclature for Arabidopsis dynamin-related large GTPases based on homology and possible functions. *Plant Molecular Biology* **53**: 261–265.

Hong Z, Delauney AJ, Verma DPS. **2001**. A Cell Plate–Specific Callose Synthase and Its Interaction with Phragmoplastin. *The Plant Cell* **13**: 755–768.

Ishikawa T, Machida C, Yoshioka Y, Ueda T, Nakano A, Machida Y. **2008**. EMBRYO YELLOW gene, encoding a subunit of the conserved oligomeric Golgi complex, is required for appropriate cell expansion and meristem organization in Arabidopsis thaliana. *Genes to Cells* **13**: 521–535.

Ito Y, Boutté Y. **2020**. Differentiation of Trafficking Pathways at Golgi Entry Core Compartments and Post-Golgi Subdomains. *Frontiers in Plant Science* **11**: 609516.

Ito Y, Uemura T, Nakano A. **2017**. Golgi entry core compartment functions as the COPII-independent scaffold for ER-Golgi transport in plant cells. *Journal of Cell Science* **131**: jcs.203893.

Ito Y, Uemura T, Shoda K, Fujimoto M, Ueda T, Nakano A. **2012**. *cis* -Golgi proteins accumulate near the ER exit sites and act as the scaffold for Golgi regeneration after brefeldin A treatment in tobacco BY-2 cells (T Yoshimori, Ed.). *Molecular Biology of the Cell* **23**: 3203–3214.

Itoh T, Koshiba S, Kigawa T, Kikuchi A, Yokoyama S, Takenawa T. **2001**. Role of the ENTH Domain in Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate Binding and Endocytosis. *Science* **291**: 1047–1051.

Jackson LP, Lewis M, Kent HM, *et al.* 2012. Molecular Basis for Recognition of Dilysine Trafficking Motifs by COPI. *Developmental Cell* **23**: 1255–1262.

Jackson MR, Nilsson T, Peterson PA. **1990**. Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *The EMBO journal* **9**: 3153–3162.

Janson lM, Toomik R, O'Farrell F, Ek P. **1998**. KDEL Motif Interacts with a Specific Sequence in Mammalianerd2Receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **247**: 447–451.

Jelínková B. **2021**. Analýza lokalizace endomembránových markerů v kortikální vrstvě rostlinných buněk a jejich interakce s komplexem Arp2/3. *Diplomová práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra experimentální biologie rostlin. Vedoucí práce Schwarzerová, Kateřina.*

Jelínková A, Müller K, Fílová-Pařezová M, Petrášek J. 2015. NtGNL1a ARF-GEF acts in endocytosis in tobacco cells. BMC Plant Biology 15: 272.

Johnson A, Dahhan DA, Gnyliukh N, *et al.* 2021. The TPLATE complex mediates membrane bending during plant clathrin–mediated endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **118**: e2113046118.

Johnson A, Gnyliukh N, Kaufmann WA, *et al.* 2020. Experimental toolbox for quantitative evaluation of clathrin-mediated endocytosis in the plant model Arabidopsis. *Journal of Cell Science* **133**: jcs248062.

Johnson A, Vert G. **2017**. Single Event Resolution of Plant Plasma Membrane Protein Endocytosis by TIRF Microscopy. *Frontiers in Plant Science* **8**: 612.

Kaksonen M, Toret CP, Drubin DG. **2005**. A Modular Design for the Clathrin- and Actin-Mediated Endocytosis Machinery. *Cell* **123**: 305–320.

Kalde M, Elliott L, Ravikumar R, *et al.* 2019. Interactions between Transport Protein Particle (TRAPP) complexes and Rab GTPases in Arabidopsis. *The Plant Journal* **100**: 279–297.

Kanazawa T, Nishihama R, Ueda T. **2022**. Normal oil body formation in Marchantia polymorpha requires functional coat protein complex I proteins. *Frontiers in Plant Science* **13**: 979066.

Kang B-H, Nielsen E, Preuss ML, Mastronarde D, Staehelin LA. **2011**. Electron Tomography of RabA4b- and PI-4Kβ1-Labeled Trans Golgi Network Compartments in Arabidopsis. *Traffic*: 313–329.

Konopka CA, Backues SK, Bednarek SY. **2008**. Dynamics of *Arabidopsis* Dynamin-Related Protein 1C and a Clathrin Light Chain at the Plasma Membrane. *The Plant Cell* **20**: 1363–1380.

Kotchoni SO, Zakharova T, Mallery EL, Le J, El-Assal SE-D, Szymanski DB. **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 Physiology* **151**: 2095–2109.

Koumandou VL, Dacks JB, Coulson RM, Field MC. **2007**. Control systems for membrane fusion in the ancestral eukaryote; evolution of tethering complexes and SM proteins. *BMC Evolutionary Biology* **7**: 29.

Kraynack BA, Chan A, Rosenthal E, *et al.* 2005. Dsl1p, Tip20p, and the Novel Dsl3(Sec39) Protein Are Required for the Stability of the Q/t-SNARE Complex at the Endoplasmic Reticulum in Yeast□D. *Molecular Biology of the Cell* **16**.

Kulich I, Cole R, Drdová E, *et al.* 2010. Arabidopsis exocyst subunits SEC8 and EXO70A1 and exocyst interactor ROH1 are involved in the localized deposition of seed coat pectin. *New Phytologist* **188**: 615–625.

Kulich I, Vojtíková Z, Glanc M, Ortmannová J, Rasmann S, Žárský V. **2015**. Cell wall maturation of Arabidopsis trichomes is dependent on exocyst subunit EXO70H4 and involves callose deposition. *Plant Physiology* **168**: 120–131.

Kulich I, Vojtíková Z, Sabol P, *et al.* 2018. Exocyst Subunit EXO70H4 Has a Specific Role in Callose Synthase Secretion and Silica Accumulation. *Plant Physiology* **176**: 2040–2051.

Kumari S, Mayor S. 2008. ARF1 is directly involved in dynamin-independent endocytosis. Nature Cell Biology 10: 30–41.

Lamaze C, Fujimoto LM, Yin HL, Schmid SL. **1997**. The Actin Cytoskeleton Is Required for Receptor-mediated Endocytosis in Mammalian Cells. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 20332–20335.

Laufman O, Hong W, Lev S. **2013**. The COG complex interacts with multiple Golgi SNAREs and enhances fusogenic SNARE complexes assembly. *Journal of Cell Science*: jcs.122101.

Le J, El-Assal SE-D, Basu D, Saad ME, Szymanski DB. **2003**. Requirements for Arabidopsis ATARP2 and ATARP3 during Epidermal Development. *Current Biology* **13**: 1341–1347.

Lechler T, Jonsdottir GA, Klee SK, Pellman D, Li R. **2001**. A two-tiered mechanism by which Cdc42 controls the localization and activation of an Arp2/3-activating motor complex in yeast. *Journal of Cell Biology* **155**: 261–270.

Lee MCS, Orci L, Hamamoto S, Futai E, Ravazzola M, Schekman R. **2005**. Sar1p N-Terminal Helix Initiates Membrane Curvature and Completes the Fission of a COPII Vesicle. *Cell* **122**: 605–617.

Li S, Blanchoin L, Yang Z, Lord EM. **2003**. The Putative Arabidopsis Arp2/3 Complex Controls Leaf Cell Morphogenesis. *Plant Physiology* **132**: 2034–2044.

Li R, Liu P, Wan Y, *et al.* 2012. A Membrane Microdomain-Associated Protein, Arabidopsis Flot1, Is Involved in a Clathrin-Independent Endocytic Pathway and Is Required for Seedling Development. *The Plant Cell* **24**: 2105–2122.

Li L, Shimada T, Takahashi H, *et al.* 2013. MAG2 and three MAG2-INTERACTING PROTEINs form an ER-localized complex to facilitate storage protein transport in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal* **76**: 781–791.

Lippincott-Schwartz J, Donaldson JG, Schweizer A, *et al.* 1990. Microtubule-dependent retrograde transport of proteins into the ER in the presence of brefeldin A suggests an ER recycling pathway. *Cell* **60**: 821–836.

Liu C, Mentzelopoulou A, Muhammad A, *et al.* 2023. An actin remodeling role for *Arabidopsis* processing bodies revealed by their proximity interactome. *The EMBO Journal* **42**: e111885.

Lohi O, Lehto V-P. **1998**. VHS domain marks a group of proteins involved in endocytosis and vesicular trafficking. *FEBS Letters* **440**: 255–257.

Mallery EL, Yanagisawa M, Zhang C, *et al.* 2022. Tandem C2 domains mediate dynamic organelle targeting of a DOCK family guanine nucleotide exchange factor. *Journal of Cell Science* **135**: jcs259825.

Martinek J, Cifrová P, Vosolsobě S, *et al.* 2023. ARP2/3 complex associates with peroxisomes to participate in pexophagy in plants. *bioRxiv*.

Mathur J, Mathur N, Kernebeck B, Hülskamp M. **2003a**. Mutations in Actin-Related Proteins 2 and 3 Affect Cell Shape Development in Arabidopsis. *The Plant Cell* **15**: 1632–1645.

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

McFarlane HE, Watanabe Y, Yang W, Huang Y, Ohlrogge J, Samuels AL. **2014**. Golgi- and Trans-Golgi Network-Mediated Vesicle Trafficking Is Required for Wax Secretion from Epidermal Cells. *Plant Physiology* **164**: 1250–1260.

Muller J, Oma Y, Vallar L, Friederich E, Poch O, Winsor B. **2005**. Sequence and Comparative Genomic Analysis of Actin-related Proteins. *Molecular Biology of the Cell* **16**.

Mullins RD, Heuser JA, Pollard TD. **1998**. The interaction of Arp2/3 complex with actin: Nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**: 6181–6186.

Naramoto S, Kleine-Vehn J, Robert S, *et al.* 2010. ADP-ribosylation factor machinery mediates endocytosis in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**: 21890–21895.

Naramoto S, Otegui MS, Kutsuna N, *et al.* 2014. Insights into the Localization and Function of the Membrane Trafficking Regulator GNOM ARF-GEF at the Golgi Apparatus in Arabidopsis. *The Plant Cell* **26**: 3062–3076.

Narasimhan M, Johnson A, Prizak R, *et al.* 2020. Evolutionarily unique mechanistic framework of clathrin-mediated endocytosis in plants. *eLife* **9**: e52067.

Nielsen ME, Feechan A, Böhlenius H, Ueda T, Thordal-Christensen H. **2012**. Arabidopsis ARF-GTP exchange factor, GNOM, mediates transport required for innate immunity and focal accumulation of syntaxin PEN1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**: 11443–11448.

Oda Y, Iida Y, Nagashima Y, Sugiyama Y, Fukuda H. **2015**. Novel Coiled-Coil Proteins Regulate Exocyst Association with Cortical Microtubules in Xylem Cells via the Conserved Oligomeric Golgi-Complex 2 Protein. *Plant and Cell Physiology* **56**: 277–286.

Oikawa T, Yamaguchi H, Itoh T, *et al.* 2004. PtdIns(3,4,5)P3 binding is necessary for WAVE2-induced formation of lamellipodia. *Nature Cell Biology* **6**: 420–426.

Ortmannová J, Sekereš J, Kulich I, *et al.* 2022. Arabidopsis EXO70B2 exocyst subunit contributes to papillae and encasement formation in antifungal defence. *Journal of Experimental Botany* **73**: 742–755.

Ozawa M, Muramatsu T. **1993**. Reticulocalbin, a novel endoplasmic reticulum resident Ca(2+)-binding protein with multiple EF-hand motifs and a carboxyl-terminal HDEL sequence. *Journal of Biological Chemistry* **268**: 699–705.

Panchal SC, Kaiser DA, Torres E, Pollard TD, Rosen MK. **2003**. A conserved amphipathic helix in WASP/Scar proteins is essential for activation of Arp2/3 complex. *Nature Structural & Molecular Biology* **10**: 591–598.

Pang L, Ma Z, Zhang X, *et al.* 2022. The small GTPase RABA2a recruits SNARE proteins to regulate the secretory pathway in parallel with the exocyst complex in Arabidopsis. *Molecular Plant* **15**: 398–418.

Paredez AR, Somerville CR, Ehrhardt DW. **2006**. Visualization of Cellulose Synthase Demonstrates Functional Association with Microtubules. *Science* **312**: 1491–1495.

Park M, Song K, Reichardt I, *et al.* 2013. *Arabidopsis* µ-adaptin subunit AP1M of adaptor protein complex 1 mediates late secretory and vacuolar traffic and is required for growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**: 10318–10323.

Pereira-Leal JB, Seabra MC. **2001**. Evolution of the Rab Family of Small GTP-binding Proteins. *Journal of Molecular Biology* **313**: 889–901.

Pinheiro H, Samalova M, Geldner N, Chory J, Martinez A, Moore I. **2009**. Genetic evidence that the higher plant Rab-D1 and Rab-D2 GTPases exhibit distinct but overlapping interactions in the early secretory pathway. *Journal of Cell Science* **122**: 3749–3758.

Pizarro-Cerdá J, Chorev DS, Geiger B, Cossart P. **2017**. The Diverse Family of Arp2/3 Complexes. *Trends in Cell Biology* **27**: 93–100.

Pratap Sahi V, Cifrová P, García-González J, *et al.* 2017. Arabidopsis thaliana plants lacking the ARP2/3 complex show defects in cell wall assembly and auxin distribution. *Annals of Botany* **122**: 777–789

Qin L, Liu L, Tu J, *et al.* 2021. The ARP2/3 complex, acting cooperatively with Class I formins, modulates penetration resistance in Arabidopsis against powdery mildew invasion. *The Plant Cell* **33**: 3151–3175.

Ren H, Dang X, Yang Y, *et al.* 2016. SPIKE1 Activates ROP GTPase to Modulate Petal Growth and Shape. *Plant Physiology* **172**: 358–371.

Richter S, Geldner N, Schrader J, *et al.* 2007. Functional diversification of closely related ARF-GEFs in protein secretion and recycling. *Nature* **448**: 488–492.

Robinson DG, Brandizzi F, Hawes C, Nakano A. **2015**. Vesicles versus Tubes: Is Endoplasmic Reticulum-Golgi Transport in Plants Fundamentally Different from Other Eukaryotes? *Plant Physiology* **168**: 393–406.

Robinson DG, Herranz M-C, Bubeck J, Pepperkok R, Ritzenthaler C. **2007**. Membrane Dynamics in the Early Secretory Pathway. *Critical Reviews in Plant Sciences* **26**: 199–225.

Robinson RC, Turbedsky K, Kaiser DA, *et al.* 2001. Crystal Structure of Arp2/3 Complex. *Science* **294**: 1679–1684

Rohatgi R, Ho HH, Kirschner MW. **2000**. Mechanism of N-Wasp Activation by Cdc42 and Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate. *Journal of Cell Biology* **150**: 1299–1310.

Rottner K, Hänisch J, Campellone KG. **2010**. WASH, WHAMM and JMY: regulation of Arp2/3 complex and beyond. *Trends in Cell Biology* **20**: 650–661.

Rout MP, Field MC. **2017**. The Evolution of Organellar Coat Complexes and Organization of the Eukaryotic Cell. *Annual Review of Biochemistry* **86**: 637–657.

Rui Q, Wang J, Li Y, Tan X, Bao Y. **2020**. Arabidopsis COG6 is essential for pollen tube growth and Golgi structure maintenance. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **528**: 447–452.

Rutherford S, Moore I. **2002**. The Arabidopsis Rab GTPase family: another enigma variation. *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 518–528.

Rybak K, Steiner A, Synek L, *et al.* 2014. Plant Cytokinesis Is Orchestrated by the Sequential Action of the TRAPPII and Exocyst Tethering Complexes. *Developmental Cell* **29**: 607–620.

Saint-Jore CM, Evins J, Batoko H, Brandizzi F, Moore I, Hawes C. **2002**. Redistribution of membrane proteins between the Golgi apparatus and endoplasmic reticulum in plants is reversible and not dependent on cytoskeletal networks. *The Plant Journal* **29**: 661–678.

Sánchez-Rodríguez C, Shi Y, Kesten C, *et al.* 2018. The Cellulose Synthases Are Cargo of the TPLATE Adaptor Complex. *Molecular Plant* **11**: 346–349.

Sánchez-Simarro J, Bernat-Silvestre C, Gimeno-Ferrer F, *et al.* 2020. Loss of Arabidopsis β-COP Function Affects Golgi Structure, Plant Growth and Tolerance to Salt Stress. *Frontiers in Plant Science* **11**: 430.

Sanderfoot AA, Assaad FF, Raikhel NV. **2000**. The Arabidopsis Genome. An Abundance of Soluble N-Ethylmaleimide-Sensitive Factor Adaptor Protein Receptors1. *Plant Physiology* **124**: 1558–1569.

Sarrion-Perdigones A, Vazquez-Vilar M, Palací J, *et al.* 2013. GoldenBraid 2.0: A Comprehensive DNA Assembly Framework for Plant Synthetic Biology. *Plant Physiology* **162**: 1618–1631.

Schlacht A, Dacks JB. **2015**. Unexpected Ancient Paralogs and an Evolutionary Model for the COPII Coat Complex. *Genome Biology and Evolution* **7**: 1098–1109.

Schwob E, Martin RP. **1992**. New yeast actin-like gene required late in the cell cycle. *Nature* **355**: 179–182.

Shaaban M, Chowdhury S, Nolen BJ. **2020**. Cryo-EM reveals the transition of Arp2/3 complex from inactive to nucleation-competent state. *Nature Structural & Molecular Biology* **27**: 1009–1016.

Shimizu Y, Takagi J, Ito E, *et al.* 2021. Cargo sorting zones in the trans-Golgi network visualized by super-resolution confocal live imaging microscopy in plants. *Nature Communications* **12**: 1901.

Simon C, Kusters R, Caorsi V, *et al.* 2019. Actin dynamics drive cell-like membrane deformation. *Nature Physics* **15**: 602–609.

Song J, Lee MH, Lee G-J, Yoo CM, Hwang I. **2006**. *Arabidopsis* EPSIN1 Plays an Important Role in Vacuolar Trafficking of Soluble Cargo Proteins in Plant Cells via Interactions with Clathrin, AP-1, VTI11, and VSR1. *The Plant Cell* **18**: 2258–2274.

Stefano G, Renna L, Chatre L, *et al.* 2006. In tobacco leaf epidermal cells, the integrity of protein export from the endoplasmic reticulum and of ER export sites depends on active COPI machinery. *The Plant Journal* **46**: 95–110.

Steffen A, Rottner K, Ehinger J, *et al.* 2004. Sra-1 and Nap1 link Rac to actin assembly driving lamellipodia formation. *The EMBO Journal* **23**: 749–759.

Stenmark H. **2009**. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **10**: 513–525.

Sutton RB, Fasshauer D, Jahn R, Brunger AT. **1998**. Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* **395**: 347–353.

Suvorova ES, Duden R, Lupashin VV. **2002**. The Sec34/Sec35p complex, a Ypt1p effector required for retrograde intra-Golgi trafficking, interacts with Golgi SNAREs and COPI vesicle coat proteins. *Journal of Cell Biology* **157**: 631–643.

Sweitzer SM, Hinshaw JE. **1998**. Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation. *Cell* **93**: 1021–1029.

Takagi J, Kimori Y, Shimada T, Hara-Nishimura I. **2020**. Dynamic Capture and Release of Endoplasmic Reticulum Exit Sites by Golgi Stacks in Arabidopsis. *iScience* **23**: 101265.

Tan X, Cao K, Liu F, *et al.* 2016. Arabidopsis COG Complex Subunits COG3 and COG8 Modulate Golgi Morphology, Vesicle Trafficking Homeostasis and Are Essential for Pollen Tube Growth. *PLOS Genetics* **12**: e1006140.

Teh O, Moore I. **2007**. An ARF-GEF acting at the Golgi and in selective endocytosis in polarized plant cells. *Nature* **448**: 493–496.

Teh O, Shimono Y, Shirakawa M, *et al.* 2013. The AP-1 μ Adaptin is Required for KNOLLE Localization at the Cell Plate to Mediate Cytokinesis in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology* **54**: 838–847.

Tinevez J-Y, Perry N, Schindelin J, *et al.* 2017. TrackMate: An open and extensible platform for single-particle tracking. *Methods* **115**: 80–90.

Ueda T. **2001**. Ara6, a plant-unique novel type Rab GTPase, functions in the endocytic pathway of Arabidopsis thaliana. *The EMBO Journal* **20**: 4730–4741.

Uemura T, Nakano RT, Takagi J, *et al.* 2019. A Golgi-Released Subpopulation of the Trans-Golgi Network Mediates Protein Secretion in Arabidopsis. *Plant Physiology* **179**: 519–532.

Uemura T, Suda Y, Ueda T, Nakano A. **2014**. Dynamic Behavior of the trans-Golgi Network in Root Tissues of Arabidopsis Revealed by Super-Resolution Live Imaging. *Plant and Cell Physiology* **55**: 694–703.

Uemura T, Ueda T, Ohniwa RL, Nakano A, Takeyasu K, Sato MH. **2004**. Systematic Analysis of SNARE Molecules in *Arabidopsis*: Dissection of the post-Golgi Network in Plant Cells. *Cell Structure and Function* **29**: 49–65.

Uhrig JF, Mutondo M, Zimmermann I, *et al.* 2007. The role of *Arabidopsis SCAR* genes in ARP2-ARP3-dependent cell morphogenesis. *Development* **134**: 967–977.

Ungar D, Oka T, Brittle EE, *et al.* 2002. Characterization of a mammalian Golgi-localized protein complex, COG, that is required for normal Golgi morphology and function. *Journal of Cell Biology* **157**: 405–415.

Ungar D, Oka T, Vasile E, Krieger M, Hughson FM. **2005**. Subunit Architecture of the Conserved Oligomeric Golgi Complex. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 32729–32735.

Van Damme D, Coutuer S, De Rycke R, Bouget F-Y, Inzé D, Geelen D. **2007**. Somatic Cytokinesis and Pollen Maturation in *Arabidopsis* Depend on TPLATE, Which Has Domains Similar to Coat Proteins. *The Plant Cell* **18**: 3502–3518.

Vernoud V, Horton AC, Yang Z, Nielsen E. **2003**. Analysis of the Small GTPase Gene Superfamily of Arabidopsis. *Plant Physiology* **131**: 1191–1208.

Viotti C, Bubeck J, Stierhof Y-D, *et al.* 2010. Endocytic and Secretory Traffic in *Arabidopsis* Merge in the Trans-Golgi Network/Early Endosome, an Independent and Highly Dynamic Organelle. *The Plant Cell* **22**: 1344–1357.

Vukašinović N, Oda Y, Pejchar P, *et al.* 2017. Microtubule-dependent targeting of the exocyst complex is necessary for xylem development in Arabidopsis. *New Phytologist* **213**: 1052–1067.

Wachsman G, Zhang J, Moreno-Risueno MA, Anderson CT, Benfey PN. **2020**. Cell wall remodeling and vesicle trafficking mediate the root clock in Arabidopsis. *Science* **370**: 819–823.

Wang X, Cai Y, Wang H, *et al.* 2014. *Trans* -Golgi Network-Located AP1 Gamma Adaptins Mediate Dileucine Motif-Directed Vacuolar Targeting in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **26**: 4102–4118.

Wang P, Pleskot R, Zang J, *et al.* 2019. Plant AtEH/Pan1 proteins drive autophagosome formation at ER-PM contact sites with actin and endocytic machinery. *Nature Communications* **10**: 5132.

Wang P, Richardson C, Hawes C, Hussey PJ. **2016**. Arabidopsis NAP1 Regulates the Formation of Autophagosomes. *Current Biology* **26**: 2060–2069.

Waters MG, Serafini T, Rothman JE. **1991**. “Coatomer”: a cytosolic protein complex containing subunits of non-clathrin-coated Golgi transport vesicles. *Nature* **349**: 248–251.

Welch MD, DePace AH, Verma S, Iwamatsu A, Mitchison TJ. **1997**. The Human Arp2/3 Complex Is Composed of Evolutionarily Conserved Subunits and Is Localized to Cellular Regions of Dynamic Actin Filament Assembly. *Journal of Cell Biology* **138**: 375–384.

Witkos TM, Lowe M. **2016**. The Golgin Family of Coiled-Coil Tethering Proteins. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **3**: 86.

Woo CH, Gao C, Yu P, *et al.* 2015. Conserved function of the lysine-based KXD/E motif in Golgi retention for endomembrane proteins among different organisms. *Molecular Biology of the Cell* **26**: 4280–4293.

Xu G, Liu Y. **2012**. Plant ERD2s self-interact and interact with GTPase-activating proteins and ADP-ribosylation factor 1. *Plant Signaling & Behavior* **7**: 1092–1094.

Yanagisawa M, Alonso JM, Szymanski DB. **2018**. Microtubule-Dependent Confinement of a Cell Signaling and Actin Polymerization Control Module Regulates Polarized Cell Growth. *Current Biology* **28**: 2459-2466.e4.

Yanagisawa M, Desyatova AS, Belteton SA, Mallery EL, Turner JA, Szymanski DB. **2015**. Patterning mechanisms of cytoskeletal and cell wall systems during leaf trichome morphogenesis. *Nature Plants* **1**: 1–8.

Yang Y, Elamawi R, Bubeck J, Pepperkok R, Ritzenthaler C, Robinson DG. **2005**. Dynamics of COPII Vesicles and the Golgi Apparatus in Cultured *Nicotiana tabacum* BY-2 Cells Provides Evidence for Transient Association of Golgi Stacks with Endoplasmic Reticulum Exit Sites. *The Plant Cell* **17**: 1513–1531.

Yang S, Tang Y, Liu Y, *et al.* 2022. Arf GTPase activates the WAVE regulatory complex through a distinct binding site. *Science Advances* **8**: eadd1412.

Yorimitsu T, Sato K, Takeuchi M. **2014**. Molecular mechanisms of Sar/Arf GTPases in vesicular trafficking in yeast and plants. *Frontiers in Plant Science* **5**: 411.

Yperman K, Papageorgiou AC, Merceron R, *et al.* 2021a. Distinct EH domains of the endocytic TPLATE complex confer lipid and protein binding. *Nature Communications* **12**: 3050.

Yperman K, Wang J, Eeckhout D, *et al.* 2021b. Molecular architecture of the endocytic TPLATE complex. *Science Advances* **7**: eabe7999.

Yu I-M, Hughson FM. **2010**. Tethering Factors as Organizers of Intracellular Vesicular Traffic. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **26**: 137–156.

Žárský V, Cvrčková F, Potocký M, Hála M. **2009**. Exocytosis and cell polarity in plants – exocyst and recycling domains. *New Phytologist* **183**: 255–272.

Žárský V, Sekereš J, Kubátová Z, Pečenková T, Cvrčková F. 2020. Three subfamilies of exocyst EXO70 family subunits in land plants: early divergence and ongoing functional specialization. *Journal of Experimental Botany* **71**: 49–62.

Zeng Y, Chung KP, Li B, *et al.* 2015. Unique COPII component AtSar1a/AtSec23a pair is required for the distinct function of protein ER export in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**: 14360–14365.

Zhang X, Henriques R, Lin S-S, Niu Q-W, Chua N-H. **2006**. Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana using the floral dip method. *Nature Protocols* **1**: 641–646.

Zhang W, Huang L, Zhang C, Staiger CJ. **2021**. Arabidopsis myosin XIK interacts with the exocyst complex to facilitate vesicle tethering during exocytosis. *The Plant Cell* **33**: 2454–2478.

Zhang Y, Persson S, Hirst J, Robinson MS, van Damme D, Sánchez-Rodríguez C. **2015**. Change your Tplate, change your fate: plant CME and beyond. *Trends in Plant Science* **20**: 41–48.

Zhang GF, Staehelin LA. **1992**. Functional Compartmentation of the Golgi Apparatus of Plant Cells. *Plant Physiology* **99**: 1070–1083.

Zhu X, Li S, Pan S, Xin X, Gu Y. **2018**. CSI1, PATROL1, and exocyst complex cooperate in delivery of cellulose synthase complexes to the plasma membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **115**: E3578–E3587.

Zouhar J, Sauer M. **2014**. Helping Hands for Budding Prospects: ENTH/ANTH/VHS Accessory Proteins in Endocytosis, Vacuolar Transport, and Secretion. *The Plant Cell* **26**: 4232–4244.

Přílohy

Příloha 1. ImageJ Macro skript, použitý pro tvorbu hyperstacku z obrazů, upravených dekonvolucí (join_my_tiff.ijm). Tento skript se používá pro celou složku s několika soubory.

```
input  = getDirectory("Choose Source Directory");
flist=getFileList(input);
for(i=0;i<flist.length;i++){
   if( matches(flist[i], ".*ch00.tif$") ){
      open(flist[i]);
   }
}
run("Concatenate...", "all_open title=green");
title = File.getName(input)
saveAs("tif", input+title+"_green");
close();

//TIFF concatenation - red channel 1
flist=getFileList(input);
for(i=0;i<flist.length;i++){
   if( matches(flist[i], ".*ch01.tif$") ){
      open(flist[i]);
   }
}
run("Concatenate...", "all_open title=red");
title = getTitle
title = File.getName(input)
saveAs("tif", input+title+"_red");
close();

//TIFF concatenation - making a two channel hyperstack
flist=getFileList(input);
for(i=0;i<flist.length;i++){
   if( matches(flist[i], ".*green.tif$") ){
      open(flist[i]);
   }
}
for(i=0;i<flist.length;i++){
   if( matches(flist[i], ".*red.tif$") ){
      open(flist[i]);
   }
}

run("Merge Channels...", "c2=["+title +"_green.tif] c6=["+title +"_red.tif] create keep ignore");
run("Channels Tool...");
Property.set("CompositeProjection", "null");
Stack.setDisplayMode("color");
frame1 = nSlices;
frame2 =frame1/2;
run("Stack to Hyperstack...", "order=xyczt(default) channels=2 slices=1 frames="+frame2+"
display=Color");
run("Rotate 90 Degrees Left");
run("Rotate 90 Degrees Left");
dir2 = getDirectory("Choose Saving Directory");
saveAs("tif", dir2+title+"_ready");
```

```
run("Close All");
```

Příloha 2. ImageJ Macro skript, použitý pro tvorbu časové projekce ze dvou kanálu ve FIJI (avgproj.ijm). Tento skript se používá pro celou složku s několika soubory.

```
//defining my directories
input = getDirectory("Choose Source Directory");
output = getDirectory("Get Saving Directory");
setBatchMode(true);
list = getFileList(input);

//looping through images
for (i = 0; i < list.length; i++){
	averageproj(input, output, list[i]);
}

//function that generates average projections
function averageproj (input, output, filename)
{
for (n = 0; n < list.length; n++) {
if (endsWith(list[i],".tif")){
open(input + list[i]);
frame1 = nSlices;
itera = 17;
for (j = 0; j < itera; j++) {
run("Grouped Z Project...", "start="+j+" stop="+j+5+" projection=[Average Intensity]");
filename = getTitle();
filename = replace(filename, ".tif", "");
saveAs("tif", output+filename+"_"+j);
close();
}
}
}
}
```

Příloha 3. ImageJ Macro skript, použitý analýzu jedné projekce pomocí ComDet ve FIJI (comdet_batch.ijm). Tento skript se používá pro celou složku s několika soubory.

```
//defining my directories
input = getDirectory("Choose Source Directory");
output = getDirectory("Choose Destination Directory");
setBatchMode(true);
list = getFileList(input);

//looping through images
for (i = 0; i < list.length; i++){
	docomdet (input, output, list[i]);
	run("Close All");
}

function docomdet(input, output, filename) {
open(input + list[i]);
filename = getTitle();
filename = replace(filename, ".tif", "");
run("Detect Particles", "calculate max=4 plot rois=Ovals add=Nothing summary=Reset ch1i ch1l
ch1a=6 ch1s=40 ch2i ch2l ch2a=6 ch2s=40");
```

```
saveAs("tif", output + filename + "_roi");
selectWindow("Results");
saveAs("results", output + filename + "result.csv");
run("Close");
selectWindow("Summary");
saveAs("results", output + filename + "summary.csv");
run("Close");
}
```

Příloha 4. ImageJ Macro skript, použitý analýzu jedné projekce (negativní kontrola) pomocí ComDet ve FIJI (comdet_batch_negative.ijm). Tento skript se používá pro celou složku s několika soubory.

```
//defining my directories
input = getDirectory("Choose Source Directory");
output = getDirectory("Choose Destination Directory");
setBatchMode(true);
list = getFileList(input);

//looping through images
for (i = 0; i < list.length; i++){
	docomdet (input, output, list[i]);
	run("Close All");
}

function docomdet(input, output, filename) {
open(input + list[i]);
filename = getTitle();
filename = replace(filename, ".tif", "");
run("Split Channels");
selectWindow("C2-"+filename+);
run("Rotate 90 Degrees Right");
run("Merge Channels...", "c2=[C1-"+filename+"] c6=[C2-"+filename+"] create keep");
run("Detect Particles", "calculate max=4 plot rois=Ovals add=Nothing summary=Reset ch1i ch1l
ch1a=6 ch1s=40 ch2i ch2l ch2a=6 ch2s=40");
saveAs("tif", output + filename + "_roi_negative");
selectWindow("Results");
saveAs("results", output + filename + "result_negative.csv");
run("Close");
selectWindow("Summary");
saveAs("results", output + filename + "summary_negative.csv");
run("Close");
}
```

Příloha 5. ImageJ Macro skript, použitý pro tvorbu čtvercového výřezu ve FIJI (crop_my_tiff.ijm). Tento skript se používá pro celou složku s několika soubory.

```
//defining my directories
input = getDirectory("Choose Source Directory");
output = getDirectory("Choose Destination Directory");
setBatchMode(true);
list = getFileList(input);

//looping through images and saving results
for (i = 0; i < list.length; i++){
```

```
        cutmyimage(input, output, list[i]);
}

//defining the function

function cutmyimage(input, output, filename){
open(input + list[i]);
filename = getTitle();
w = getWidth();
h = getHeight();
s = h/2;
f = w/2;
if (w>h) {
run("Specify...", "width="+h+" height="+h+" x="+s+" y="+s+" slice=1 constrain centered");
run("Crop");
} else {
run("Specify...", "width="+w+" height="+w+" x="+f+" y="+f+" slice=1 constrain centered");
run("Crop");
   }
saveAs("tif", output+filename+"-squared");
}
```