

Souhrn

Forminy jsou multidoménové proteiny obsahující konzervovanou FH2 doménu (forminohomology

2 domain), která je schopna katalyzovat nukleaci aktinových filament *de novo*.

Funkce forminu, stejně jako jejich regulace, byly podrobně studovány především u kvasinek a

živočichu, zatímco mnohem méně je známo o rostlinných forminech, které se od kvasinkových i živočišných zástupců značně liší v doménovém uspořádání. Forminy vyšších rostlin se dělí do dvou skupin, třídy I a třídy II a experimentální údaje jsou doposud k dispozici pouze pro první skupinu. V této dizertaci předkládám výsledky z experimentální studie několika zástupců velké rodiny forminu u *Arabidopsis*, včetně charakterizace forminu AtFH16 z třídy II.

Genom *Arabidopsis* obsahuje 21 genu kódujících forminy, a přestože se hladina a rozložení jejich exprese značně liší, všechny jsou transkripčně aktivní. V celkem 14-ti forminových genech jsme získali 17 homozygotních mutantů s T-DNA inzercí. Za standardních kultivačních podmínek jsme nenašli zjevné odlišnosti ve fenotypích mutantů v porovnání s kontrolami. Abychom vyradili z funkce dva dominantní pylové forminy, připravili jsme dvojitěho mutantu *atfh3atfh5*, avšak i v tomto případě se vývoj mikrospor a následné klíčení a rust pylových láček nezmenily. Stejně tak nedošlo k narušení polarizovaného rustu pylových láček u tabáku působením antisense oligonukleotidu (ODNs), které byly směřovány na forminy třídy I. Mimo to jsem provedla klonování cDNA genu *AtFH3* a upravila jsem jeho stávající predikce (Cvrčková et al., 2004).

Abychom mohli studovat lokalizaci pylove specifického AtFH3, dalších forminu a regulátoru buněčné polarity *in situ*, připravili jsme a následně testovali sadu krysích polyklonálních protilátek proti syntetickým oligopeptidům konjugovaným s KLH. Nicméně většina protilátek rozeznávala u *Arabidopsis* a tabáku tentýž antigen, který jsme pojmenovali KRAP (KLH-related antigen of plants), a který jsme charakterizovali co do velikosti a buněčné lokalizace. Také jsme zkoumali možné příčiny, jež způsobily nezdar většiny imunizací (Oulehlová et al., 2009).

Podrobněji jsme charakterizovali formin AtFH16 z třídy II, který má neobvyklé doménové uspořádání. Za určitých pomínek (na tvrdém nakloněném agaru nebo v permanentní tmě) se fenotyp mutantu *atfh16* odlišoval od kontrol; především došlo ke zkrácení a zvlnění etiolovaných hypokotylu, což se ještě zvýraznilo po působení cytoskeletálních drog. Tyto výsledky naznačují, že v semenáčcích *Arabidopsis* se AtFH16 nejspíše podílí na buněčné expanzi. Kromě toho jsem naklonovala kompletní cDNA genu *AtFH16*. *In vivo* jsme pozorovali a následně popsali buněčnou lokalizaci variant odvozených z AtFH16. Z kolokalizačních studie vyšlo najevo, že AtFH16 může asociovat s vláknitými cytoskeletálními strukturami; v některých případech znací stabilizované aktinové svazky prostřednictvím svého

N-konce, avšak především AtFH16 dekoruje mikrotubuly. Dále jsme zjistili, že k lokalizaci na mikrotubuly je nezbytná přítomnost konzervované domény FH2.

Naše výsledky naznačují, že forminy třídy I nemusí být nezbytné pro vývoj mikrospor a pro polarizovaný rust pylových láček. Dále, formin AtFH16 z třídy II je schopný asociovat s mikrotubuly a mohl by potenciálně propojovat cytoskeletální struktury.