

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra experimentální biologie rostlin**

Studijní obor: Biologie-Anatomie a fyziologie rostlin



**Klonování a charakterizace vybraných forminů  
II. třídy**

Cloning and characterization of selected class II  
formins

**Bc. Lenka Stillerová**

Diplomová práce

Školitel: Doc. RNDr. Fatima Cvrčková, Dr.rer.nat.

Praha, 2012

Prohlašuji, že jsem závěrečnou diplomovou práci zpracovala samostatně pod vedením Doc. RNDr. Fatimy Cvrčkové, Dr.rer.nat., a uvedla jsem zde všechny použité zdroje a literaturu.

V Praze 22.8.2012, podepsána Bc. Lenka Stillerová

## **Poděkování**

Tímto bych chtěla poděkovat své školitelce Doc. RNDr. Fatimě Cvrčkové, Dr.rer.nat. za vedení a korekci při vypracovávání mé diplomové práce a v neposlední řadě za poskytnutí financí z grantového projektu. Další díky patří kolegům z laboratoře 202 na Katedře experimentální biologie rostlin (PřF UK), jmenovitě Mgr. Ivanu Kulichovi, Mgr. Radku Bezvodovi, Mgr. Michalu Gruntovi, Mgr. Michalu Hálovi, Ph.D., Mgr. Sylvě Přerostové a Martě Čadyové za cenné rady, výpomoc a nápady.

Tato práce vznikla za finanční podpory grantů GAČR P305/10/0433 a UK SVV 265203/2012 v letech 2011-2012.

Lenka Stillerová

# OBSAH

|   |    |
|---|----|
| Obsah .....   | 4  |
| Seznam použitých zkratek .....                                      | 6  |
| 1. Abstrakt .....   | 8  |
| 1. Abstract .....   | 9  |
| 2. Úvod – cíle práce .....  | 10 |
| 3. Literární přehled .....  | 12 |
| 3.1 Cytoskeletální proteiny .....                                   | 12 |
| 3.2 Forminy .....   | 13 |
| 3.2.1 Molekulární stavba forminů .....                              | 13 |
| 3.2.2 Funkce forminů v reorganizaci cytoskeletu u opisthokont ..... | 16 |
| 3.3 Forminy rostlin .....   | 18 |
| 3.3.1 PTEN doména .....   | 24 |
| 3.3.2 AtFH14 a AtFH13 .....   | 26 |
| 4. Materiál a metody .....  | 27 |
| 4.1 Biologický materiál .....                                       | 27 |
| 4.1.1 Rostliny .....  | 27 |
| 4.1.2 Bakterie .....  | 27 |
| 4.2 Pěstování rostlin .....   | 28 |
| 4.2.1 <i>Arabidopsis thaliana</i> .....                             | 28 |
| 4.2.2 <i>Nicotiana benthamiana</i> .....                            | 28 |
| 4.3 Predikce sekvence – bioinformatická analýza .....               | 28 |
| 4.4 Primery .....   | 29 |
| 4.5 Izolace genomové DNA z <i>Arabidopsis thaliana</i> .....        | 31 |
| 4.6 Polymerase Chain Reaction (PCR) .....                           | 31 |
| 4.7 Klonování .....   | 32 |
| 4.7.1 Namnožení (reamplifikace) PCR produktu .....                  | 32 |
| 4.7.2 Restrikce .....   | 32 |
| 4.7.3 Ligace .....  | 33 |
| 4.7.4 Elektroporace .....   | 33 |
| 4.8 Plazmidy .....  | 34 |
| 4.8.1 Klonovací vektory .....                                       | 34 |
| 4.8.2 Izolace plazmidové DNA .....                                  | 37 |
| 4.9 Sekvenování .....   | 37 |
| 4.10 Gateway <sup>®</sup> klonování .....                           | 38 |
| 4.11 Transformace rostlin .....                                     | 38 |
| 4.11.1 Tranzientní transformace <i>Nicotiana benthamiana</i> .....  | 38 |
| 4.11.2 Stablní transformace <i>Arabidopsis thaliana</i> .....       | 39 |

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 4.12   | Fluorescenční a konfokální mikroskopie .....  | 39 |
| 4.13   | Expres a afinitní purifikace rekombinantního proteinu v bakteriích.....               | 40 |
| 4.13.1 | Expres proteinu .....   | 40 |
| 4.13.2 | SDS-PAGE.....   | 40 |
| 5.     | Výsledky .....  | 42 |
| 5.1    | PTEN doména AtFH14 a její klonování .....   | 42 |
| 5.1.1  | Bioinformatická analýza <i>AtFH14</i> .....   | 42 |
| 5.1.2  | Izolace PTEN domény AtFH14 .....  | 43 |
| 5.1.3  | Klonování PTEN domény AtFH14.....   | 44 |
| 5.1.4  | Lokalizace PTEN domény AtFH14 v listech tabáku-tranzientně.....                       | 45 |
| 5.1.5  | Kolokalizace PTEN domény AtFH14 s Golgiho aparátem v listech tabáku-tranzientně ..... | 47 |
| 5.1.6  | Lokalizace PTEN domény AtFH14 v <i>Arabidopsis thaliana</i> -stabilně .....           | 51 |
| 5.2    | <i>AtFH13</i> a jeho klonování .....  | 53 |
| 5.2.1  | Bioinformatická analýza <i>AtFH13</i> .....   | 53 |
| 5.2.2  | Izolace <i>AtFH13</i> .....   | 54 |
| 5.2.3  | Klonování <i>AtFH13</i> .....   | 54 |
| 5.3    | PTEN doména AtFH13-stabilní transformace .....  | 55 |
| 5.4    | Produkce proteinu PTEN ( <i>AtFH13</i> ) v bakteriích.....                            | 55 |
| 6.     | Diskuze .....   | 57 |
| 6.1    | PTEN doména AtFH14.....   | 57 |
| 6.2    | Lokalizace PTEN domény AtFH14 v listech <i>Nicotiana benthamiana</i> .....            | 58 |
| 6.3    | Lokalizace PTEN domény AtFH14 v <i>Arabidopsis thaliana</i> .....                     | 59 |
| 6.4    | Kolokalizace PTEN domény AtFH14 s Golgiho aparátem .....                              | 59 |
| 6.5    | Dynamika PTEN z AtFH14 .....  | 60 |
| 6.6    | Lokalizace PTEN domény AtFH13 v <i>Arabidopsis thaliana</i> .....                     | 61 |
| 6.7    | AtFH13.....   | 61 |
| 6.8    | Izolace proteinu PTEN AtFH13.....   | 61 |
| 7.     | Souhrn .....  | 63 |
| 8.     | Seznam literatury .....   | 65 |

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

|                |  |
|----------------|--|
| Arp2/3 komplex | komplex proteinů příbuzných aktinu (Actin-related proteins 2 and 3)                        |
| AtPTEN         | PTEN doména <i>Arabidopsis thaliana</i>  |
| Bni            | kvasinkový formin (Bud Neck Involved)  |
| Cap            | „čepičkující“ protein vázající rozštěpené (barbed) konce aktinového vlákna                 |
| CC             | motiv coiled-coil  |
| DAAM           | aktivátor morfogeneze (Dishevelled-Associated Activator of Morphogenesis)                  |
| DAD            | diaphanous auto-regulační doména (Diaphanous Auto-regulatory Domain)                       |
| Dia            | protein Diaphanous   |
| DID            | auto-inhibiční doména proteinu Dia   |
| DRFs           | forminy příbuzné forminu Diaphanous (Diaphanous Related Formins)                           |
| EOS            | fotokonvertabilní protein EosFP  |
| F-aktin        | polymerní vláknitý aktin   |
| FH             | forminový homolog (Formin Homology)  |
| FHOD           | protein obsahující forminovou homologní doménu (Formin Homology Domain-containing protein) |
| FMN            | formin   |
| FRAP           | obnovení fluorescence po vysvícení (Fluorescence Recovery After Photobleaching)            |
| FRL            | forminům příbuzný gen u leukocytů (Formin Related gene in Leukocytes)                      |
| FYVE           | doména s motivy zinkových prstů  |
| G-aktin        | monomerní globulární aktin   |
| GAP            | G-protein-Activating Protein   |
| GBD            | GTPázová vazebná doména (GTPase Binding Domain)  |
| GEF            | Guanine nucleotide Exchange Factor   |
| GFP            | zelený fluorescenční protein (Green Fluorescent Protein)                                   |
| GOE            | doména forminů AtFH4,7 a 8 (Group One E podle skupiny forminů, u nichž se našla)           |
| GST            | glutathion-S-transferáza (Glutathione-S-Transferase)                                       |
| GTP/GDP        | guanin nukleotid tris-/bis- fosfát   |
| INF            | invertovaný formin (Inverted Formin)   |
| IPTG           | izopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galaktopyranozid  |
| PCR            | řetězová polymerázová reakce (Polymerase Chain Reaction)                                   |
| PDZ            | doména zprostředkovávající protein-proteinové interakce (Post-synaptic Density Protein)    |
| PIP2           | fosfatidylinositol-(4,5)-bisfosfát (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate)                 |
| PLD            | fosfolipáza D  |

|                 |   |
|-----------------|---|
| PTEN            | homolog fosfatáz a tenzinu ležící na 10. Chromozómu (Phosphatase and Tensin Homolog on Chromosome Ten)        |
| PtdIns(3,4,5)P3 | fosfatidylinositol-(3,4,5)-trisfosfát   |
| RBD             | Rho vazebná doména (Rho Binding Domain)   |
| RFP             | červený fluorescenční protein (Red Fluorescent Protein)   |
| RT-PCR          | polymerázová řetězová reakce spojená s reverzní transkripcí (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) |
| SH              | Src homologní doména (Src Homology)   |
| SRF             | faktor sérové odpovědi (Serum Response Factor)  |
| UTR             | nepřekládaná oblast mRNA (Untranslated Region)  |
| WW              | motiv obsahující 2 tryptofany   |
| YFP             | žlutý fluorescenční protein (Yellow Fluorescent Protein)  |

Poznámka k formě označení genů a proteinů:

*atfh1* - mutovaný gen

*AtFH1* - gen

AtFH1 - protein

# 1. ABSTRAKT

Forminy jsou proteiny, které se účastní regulací a výstavby aktinových vláken eukaryotních organismů. Tím se řadí mezi proteiny, které regulují cytokinezi a polarizovaný růst, a tak ovlivňují i vývoj celého organismu. U *Arabidopsis thaliana* se forminy dělí na 2 třídy. FH1 a FH2 domény (formin homology 1 a 2) jsou přítomny u forminů obou tříd. I. třída se liší od II. třídy přítomností N-koncové transmembránové domény. Některé forminy II. třídy mají na N-konci PTEN doménu (Phosphatase and Tensin Homolog). Její sekvenční analýza naznačila, že by se mohla vázat na membrány skrze fosfatázovou nebo C2 subdoménu.

V této práci jsem se zaměřila na formin AtFH14, v první řadě na jeho PTEN doménu. Na základě predikované sekvence jsem klonovala úsek DNA kódující tuto doménu, sekvenčně jsem jej ověřila a zaklonovala do vektoru pro fúzi s YFP a EOS. Takto značený protein jsem vizualizovala metodou tranzientní exprese v listech *Nicotiana benthamiana* a připravila jsem transformované rostliny *Arabidopsis thaliana* pro stabilní expresi značeného proteinu. Ten byl lokalizován v kortikální cytoplazmě, cytoplazmatických provazcích, pravděpodobně na jaderné membráně nebo kolem jádra. Nejpozoruhodnější byly „měchýřkovité“ útvary, které mohly být způsobeny vazbou PTEN na membránu některé buněčné organely. Taktéž byly pozorovány vláknité struktury, které by snad mohly značit asociaci s cytoskeletem.

Při kolokalizačním experimentu byla porovnána lokalizace Golgiho aparátu a PTEN domény. Tím byla vyloučena možná vazba na Golgiho aparát. V tomto experimentu byl také sledován pohyb Golgiho aparátu a zároveň PTEN. Překvapivě se některé „tečky“ PTEN pohybovaly po podobné trajektorii jako Golgiho aparát, což by mohlo naznačovat nějakou spojitost.

Pro možnost porovnání výsledků jsem též stabilně natransformovala rostliny konstruktem PTEN-YFP a PTEN-EOS z blízké příbuzného forminu AtFH13. Rozdíly v lokalizaci oproti PTEN doméně z AtFH14 jsem nepozorovala. Dále jsem zaklonovala fragment DNA kódující formin AtFH13 s ověřenou sekvencí do pomocného vektoru pro další analýzy.

Klíčová slova: aktin, formin, PTEN, *Arabidopsis thaliana*, Yellow fluorescent protein, Golgiho aparát



# 1. ABSTRACT

Formins are proteins involved in regulation and construction of actin filaments of eucaryotic organism. They participate in regulating cytokinesis, polar tip growth, and thus participate in development of whole organisms. There are 2 classes of formins in *Arabidopsis thaliana*. Both classes include FH1 and FH2 domains (formin homology 1 a 2). Class I formins have N-terminal transmembrane domain, unlike class II formins. Some formins of class II have a N-terminal PTEN domain (Phosphatase and Tensin Homolog). Sequence analyses predicted membrane binding via phosphatase or C2 subdomain of PTEN.

This thesis was focused on the formin AtFH14, specifically its PTEN domain. Based on predicted sequence, a DNA fragment encoding the PTEN domain was amplified, sequenced and cloned to destination vectors for YFP and EOS fusions. Marked protein was visualized by transient expression in *Nicotiana benthamiana*. Stably transformed *Arabidopsis* lines were prepared for stably expression of protein. The tagged protein was localized in cortical cytoplasm, cytoplasmatical strands, probably in nuclear membrane or perinuclear cytoplasm, as well as in peculiar „folicle-like“ structures that might be due to binding of PTEN at the periphery of some membrane organelles. Also were seen filament structures, maybe caused by PTEN binding with cytoskeletal protein or with protein associated with cytoskeleton.

I watched colocalization of PTEN domain and Golgi apparatus. PTEN does not colocalize with Golgi, but some „PTEN dots“ moved really dynamically, sometimes followed Golgi apparatus, suggesting a possible connection.

For comparison I stably transformed *Arabidopsis* with constructs for expression of the PTEN domain of the related formin AtFH13 marked with YFP and EOS. There were no differences in localization of PTENs. Next I cloned *AtFH13* with verified sequence into assistant vector for another analyses.

Key words: actin, formin, PTEN, *Arabidopsis thaliana*, Yellow fluorescent protein, Golgi apparatus

## 2. ÚVOD-CÍLE PRÁCE

Forminy patří mezi proteiny, které zásadně ovlivňují výstavbu aktinového cytoskeletu a mohou interagovat také s mikrotubuly. Účastí v klíčových buněčných procesech, například v cytokinezi a polarizovaném růstu, získávají jednu z hlavních rolí při vývoji buněk a celého organismu.

Tato práce je zaměřena na forminy *Arabidopsis thaliana*. Zatím bylo popsáno 21 forminů, které se dělí do 2 tříd. Hlavním forminem, kterým se tato práce zabývá, je formin II. třídy AtFH14. Ten obsahuje typickou N-koncovou PTEN doménu (Phosphatase and Tensin Homolog on Chromosome Ten), která byla objevena až na základě porovnávacích sekvenčních analýz (Cvrckova et al., 2004a). Její funkce zatím nebyla odhalena. Sekvenčně se podobá živočišným proteinům, které fungují jako antionkogeny. U rostlin se zdá, že jsou některé sekvence pozměněny, a není zcela jasné jakou funkci přesně zastává. Nejpravděpodobnější je vazba na membránové fosfolipidy, na jaké přesně a které vnitrobuněčné membrány se zatím neví (Grunt et al., 2008).

Důvodem, proč tato práce vznikla, bylo tedy především objasnit roli PTEN domény rostlinných forminů a připravit konstrukty a rostliny pro další analýzy.

Formin AtFH14 byl podroben analýze roku 2010. Byl fúzovaný s GFP a vizualizován ve stabilně transformovaných buňkách BY-2. Byl lokalizován v preprofázním prstenci, dělicím vřeténku a fragmoplastu. Také bylo ukázáno, že se váže jak k aktinu tak i preferenčně k tubulinu. Což bylo u forminů objeveno prvně. Mutace v *AtFH14* způsobuje vady dělení buněk mikrospor (Li et al., 2010). Zjištění lokalizace PTEN by mohlo být v porovnání s lokalizací AtFH14 velmi zajímavé.

Cílem mé diplomové práce bylo:

- 1) naklonovat úsek DNA kódující PTEN doménu a případně další části predikovaného forminu II. třídy AtFH14
- 2) připravit konstrukci pro expresi fluorescenčně značené PTEN domény z AtFH14
- 3) ověřit tyto konstrukty tranzientní expresí v *Nicotiana benthamiana* a předběžně charakterizovat lokalizaci proteinu
- 4) v případě úspěchu transienční exprese připravit transgenní rostliny stabilně exprimující značený protein
- 5) případně pro srovnání obdobně charakterizovat i PTEN doménu příbuzného genu *AtFH13*, pro níž už jsou klony dostupné v laboratoři

Hlavním cílem práce tedy bylo ověřit sekvenci PTEN domény AtFH14 a zaklonovat ji do vektorů s fluorescenčně značenými proteiny. Takto vizualizovaný

protein bylo možné pozorovat jak v tranzientně transformovaných buňkách *Nicotiana benthamiana*, tak také v stabilně transformovaných buňkách *Arabidopsis thaliana*. V další řadě bylo možné pozorovat kolokalizace s dalšími značenými proteiny. Tyto experimenty obnášely v první řadě hlavně prozkoumání sekvenčních databází, návržení primerů a osvojení technik klonování s Gateway® klonovacími vektory.

Pro další experimenty bylo potřeba vytvořit rostlinu *Arabidopsis thaliana*, která by stabilně exprimovala PTEN protein značený fluorescenčními značkami. Ty by se posléze daly využít pro křížení s rostlinami, které mají jinak fluorescenčně značené proteiny a bylo by možné pozorovat oba a více proteinů najednou ve stabilně transformovaných rostlinách.

Vedlejším cílem práce bylo vytvořit stabilně transformované rostliny *Arabidopsis thaliana* s fluorescenčně značenou PTEN doménou z AtFH13. Formin AtFH13 byl zatím studován pouze jednou, nicméně zatím nepřinesl dostatečně uspokojivé výsledky. Transkript *AtFH13* podléhá pravděpodobně alternativnímu sestřihu (Přerostová, 2011), proto jsem vytvářela fluorescenčně značené konstrukty s krátkou verzí a dlouhou verzí PTEN. Lokalizace značené PTEN z AtFH13 jsem poté mohla porovnávat s lokalizací PTEN z AtFH14.

Vzhledem k existenci připravených expresních vektorů se dvěma zaklonovanými sestřihovými variantami PTEN z AtFH13 jsem pokračovala v testování exprese proteinů v bakteriálních kmenech. V případě úspěšné izolace bylo plánováno použít další metody testování predikované asociace PTEN s membránami.

V návaznosti na práci S. Přerostové, která navrhla primery pro klonování *AtFH13*, ale klonování se jí nepodařilo, jsem optimalizovala podmínky pro klonování tohoto forminu (Přerostová, 2011). Podařilo se mi ho zaklonovat do pomocného vektoru a ověřit sekvenci. Zaklonování do vektoru pro translační fúzi s fluorescenčními proteiny by mohlo být další metodou jak blíže charakterizovat forminy třídy II a porovnat rozdíly v lokalizaci samotné PTEN domény a celého forminu.

## 3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 3.1 CYTOSKELETÁLNÍ PROTEINY

Cytoskelet je nedílná součást eukaryotické buňky, bez které by nemohla existovat. V rostlinách se bez něj prakticky žádný proces neobejde. V buňce má opěrnou funkci, ale hlavně se účastní všech dynamických procesů - směřování a umístování organel, buněčného pohybu, tvorby, směřování a transportování váčků a v neposlední řadě dělení buněk a tvorby fragmoplastu či následně buněčné stěny. Cytoskeletální proteiny jsou v průběhu buněčného cyklu permanentně přestavovány a v buňce se vyskytují v podobě monomerů, polymerních vláken, tubulů a složitějších útvarů, především sítí a provazců. Jedním z hlavních cytoskeletálních proteinů je aktin.

Forminy, jakožto důležitý článek v utváření cytoskeletu, regulují především výstavbu aktinových nevětvených struktur (Zigmond, 2004). Aktinová vlákna vznikají *de novo* nukleací monomerních jednotek G-aktinu. V buňkách se aktin nachází v monomerní G-aktin formě a vláknité F-aktin formě. Neustále dochází k obratu mezi monomerními a polymerními jednotkami aktinu, kdy vlákno roste a G-aktin je přidáván na rychleji rostoucí rozštěpený (barbed) konec, ale i na pomaleji (z důvodu samovolné polymerace, neregulované) rostoucí špičatý (pointed) konec vlákna, nebo dochází k depolymeraci

Při regulaci tvorby aktinových vláken hraje podstatnou roli protein profilin. Ten se váže na monomerní G-aktin a inhibuje růst na špičatém konci aktinového vlákna, nicméně nemá vliv na rostoucí rozštěpený konec (Pollard and Cooper, 1984). Z rozštěpeného konce profilin disociuje v okamžiku, kdy se na aktin naváže komplex G-aktin-profilin (Kang et al., 1999). Přestože se profilin na rozštěpený konec vlákna neváže silnou vazbou, vysoké koncentrace mohou elongaci vlákna inhibovat, naopak nízké koncentrace polymeraci podporují (Gutsche-Perelroizen et al., 1999; Sagot et al., 2002)

V evoluci vznikly nejméně 4 mechanismy nukleace aktinových vláken. Jedná se o Arp2/3 proteinový komplex, Spire (Spir), Cordon-bleu (Cobl) a forminy (Pollard, 2007; Renault et al., 2008). Arp2/3 komplex a forminy se vyskytují prakticky ve všech eukaryotních buňkách, ostatní nukleátory se vyskytují ve specifických organismech a buněčných typech (Cordon-bleu a Spire pravděpodobně jen u živočichů).

## 3.2 FORMINY

Forminy (taktéž FH nebo forminové homology) jsou rodinou velmi evolučně konzervovaných proteinů eukaryotických buněk. Nejvíce prozkoumané jsou u teplokrevných obratlovců. Byly zkoumány například na modelových organismech *Arabidopsis thaliana*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophilla melanogaster*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Physcomitrella patens* (Deeks et al., 2002; Grunt et al., 2008; Higgs, 2005; Wallar and Alberts, 2003; Wasserman, 1998). Nelze je nalézt u prokaryotních buněk (Grunt et al., 2008). Mají celou řadu odlišných funkcí. Můžeme je najít předně v souvislosti s aktinem, hlavně při procesech buněčné polarizace a cytokinezi (shrnuto v Blanchoin and Staiger, 2010).

Prvním identifikovaným forminovým genem byl myší *LIMB DEFORMITY*, jehož mutace způsobovala vývojové deformace neboli špatné „formování“ myších končetin a ledvin v průběhu embryogeneze, odtud odvozený název pro forminy (Kleinebrecht et al., 1982; Woychik et al., 1985). V roce 2004 pak bylo dokázáno, že tento fenotypový projev není následkem mutovaného forminu, ale změnou exprese sousedního genu *GREMLIN* (Zuniga et al., 2004), i když formin se na fenotypu může nějakým způsobem podílet (Zhou et al., 2009).

Nej Konzervovanějšími součástmi forminů jsou dvě formin homologní domény FH1 (formin homology domain 1) a FH2 (formin homology domain 2), která byla prozatím nalezena u všech zkoumaných forminů (Higgs and Peterson, 2005; Rivero et al., 2005). Jako FH1 byla označena oblast s vysokým podílem prolinu a polyprolinovými motivy, jako FH2 označena 130 aminokyselinová konzervovaná sekvence. Navíc je také alespoň u některých forminů konzervována i spojovací oblast mezi těmito dvěma doménami (Castrillon and Wasserman, 1994). Nedávno provedené fylogenetické analýzy, při kterých byla porovnána data řady rozličných eukaryotních organismů, poukázaly na zásadní rozdíly ve stavbě forminů mezi opisthokonty a rostlinami (Cvrckova et al., 2004a; Grunt et al., 2008; Rivero et al., 2005).

### 3.2.1 MOLEKULÁRNÍ STAVBA FORMINŮ

Forminy jsou velké proteiny, které jsou dlouhé v průměru více jak 1000bp. Molekulární stavba forminů není u všech organismů jednotná a liší se i mezi říšemi. Nicméně u všech doposud zkoumaných forminů byla nalezena konzervovaná FH2 doména (~400bp), která je zásadní pro reakce s aktinem. Další nejčastější součástí forminů je doména FH1 (Castrillon and Wasserman, 1994; Grunt et al., 2008). Zásadním rozdílem v organizaci forminových domén mezi rostlinnými forminy a amébami, metazoi a houbami, je přítomnost Rho GTPázové vazebné domény, viz **obr. 1** (GBD-GTPase binding domain/FH3 neboli RBD-Rho binding

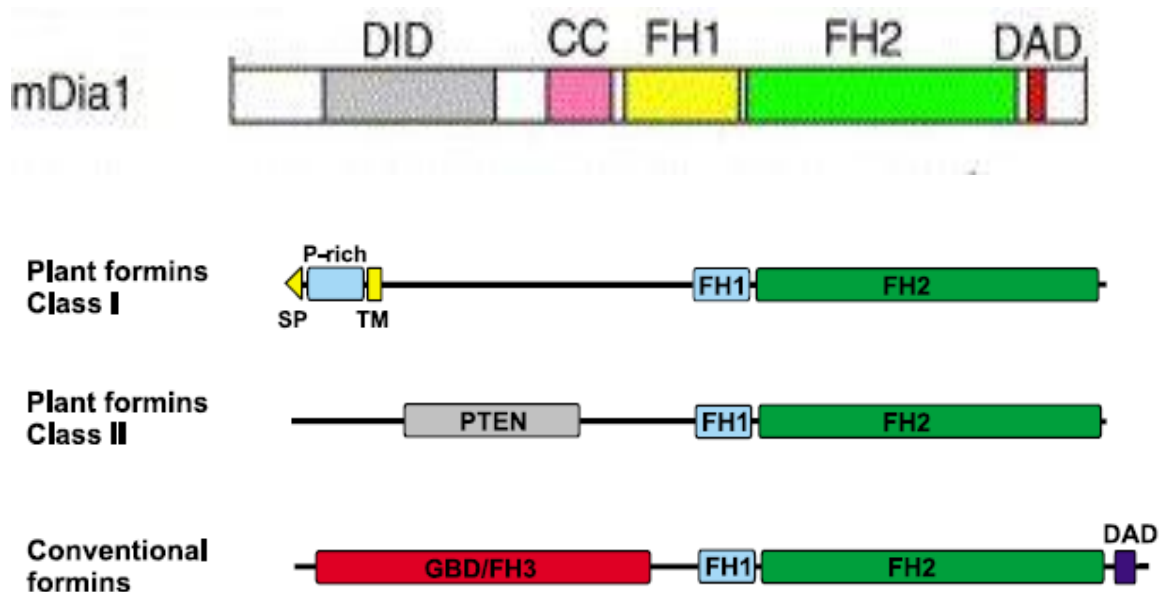
domain)(Rivero et al., 2005) ve forminech opisthokont a její absence u rostlin. Savčí mDia1 formin sestává z několika domén, již zmiňované N-koncové GBD domény, která se částečně překrývá s auto-inhibiční doménou DID, motivu coiled-coil (CC), FH1, FH2 a C-koncové DAD auto-regulační domény. U dobře charakterizovaného mDia1 dochází k interakcím mezi DAD a DID doménou. DAD tak může regulovat vazbu a auto-inhibici Rho GTPázy na GBD doméně (Alberts, 2001; Watanabe et al., 1999). U semenných rostlin včetně *Arabidopsis thaliana* nebyly nalezeny tyto, ani podobné domény, které mají schopnost auto-regulace pomocí Rho GTPáz. Konkrétní struktura rostlinných forminů bude diskutována v části 3.3.

Některé forminy mohou obsahovat mezi GBD a FH1 konzervovaný motiv FH3, který určuje vnitrobuněčnou lokalizaci forminu (Petersen et al., 1998). Na prolin bohatá FH1 doména se váže na G-aktin vazebný protein profilin (Wasserman, 1998). Tato interakce je zásadní pro růst aktinového vlákna, tedy i pro funkci forminu ve vývoj rostliny (viz 3.2.2). Další doména SH3 (Src homology 3) a motiv WW/WWP objeveny u myši mají schopnost vazby na FH1 prolin bohatou doménu (Chan et al., 1996). Dále například nalezená doména SH3 u kvasinkového Hof1p, který se účastní cytokineze, se váže na FH1 doménu Bnr1p (Kamei et al., 1998).

Podobně savčí SH3 doména u nереceptorových tyrosin kináz Src se váže na mDia-příbuzné forminy DRFs (Diaphanous related formins, viz dále)(Tominaga et al., 2000).

Několik set členů forminové rodiny bylo identifikováno na základě přítomnosti FH2 homologní domény u rozličných eukaryotních organismů (Grunt et al., 2008; Higgs and Peterson, 2005; Rivero et al., 2005). Fylogenetická analýza poukázala na vzájemnou příbuznost forminů. Díky konzervovaným oblastem forminů bylo u metazoi klasifikováno 7 skupin: DIA (Diaphanous), FMN (Formin), FHOD (protein obsahující forminovou homologní doménu, formin homology domain-containing protein), INF (inverted formin), FRL (forminům říbný gen u leukocytů, formin related gene in leukocytes), DAAM (dishevelled-associated activator of morphogenesis) a Delfilin (Higgs and Peterson, 2005). Neživočišné forminy (rostliny, *Dictyostelium*, kvasinky a další) byly porovnány mezi sebou a na základě podobnosti FH2 domén jim byly přiděleny vlastní skupiny (Deeks et al., 2005; Grunt et al., 2008).

Strukturní analýza kvasinkového Bni1 ukázala, že FH2 doména může způsobit dimerizaci forminu. Obě podjednotky dimeru se mohou vázat na rostoucí konec aktinového vlákna, umožňují další růst vlákna a zároveň tento konec chrání před vazbou inhibičních capping proteinů. Tento proces nukleace byl popsán jako „krácející“ model aktinové nukleace, kterého se navíc účastní protein profilin, který



**Obr. 1:** Rozdíl ve struktuře savčích, rostlinných forminů a běžných forminů, např. *Dictyostelium discoideum* nebo hub. Všechny typy forminových homologů mají společnou FH2 doménu, kdežto FH1 doména přítomna být nemusí (zde neukázáno). Savčí formin mDia1 jakožto modelový zástupce konvenčních forminů má auto-inhibiční doménu DID, která se částečně překrývá s Rho GTPázovou vazebnou doménou GBD (GTPase binding domain/FH3), a diaphanous auto-regulační doménu DAD. DID doména nemá u rostlinných ani běžných forminů homology. Rostlinné forminy postrádají DAD nebo GBD/FH3 doménu, namísto které mohou mít např. PTEN doménu či jiné motivy (uvedeno níže). Savčí mDia1 formin obsahuje motiv CC (Coiled coil). Třída I rostlinných forminů má na C-konci vedle prolin bohaté sekvence signální peptid (SP) a transmembránovou doménu (TM). Třída II rostlinných forminů má na C-konci PTEN doménu (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten) (Grunt et al., 2008; Higgs, 2005; Rivero et al., 2005)

má schopnost vazby k forminu i aktinovému monomeru (Moseley et al., 2004; Xu et al., 2004; Zigmond et al., 2003). Existují i další modely nukleace (Paul and Pollard, 2009b).

FH1 doména není příliš konzervovaná a je co do délky velmi variabilní (15-229 bp). Je ligandem pro SH3 a WW domény signálních proteinů a většinou obsahuje sekvenci, která umožňuje vazbu profilinu (Macias et al., 2002).

Nejvíce zkoumanou skupinou forminů jsou DRFs (Diaphanous related formins), které přímo interagují s rodinou Rho GTPáz (Higgs, 2005; Rivero et al., 2005). Do DRFs spadají DIA, DAAM, FRL, kvasinkové Bni1, Bnr1 a Sep1 proteiny. Mají konzervovanou strukturu: C-koncovou oblast, která se přímo účastní remodelace aktinu a N-koncovou oblast, která intramolekulárně interaguje s C-koncem, čili udržuje formin v auto-inhibovaném stavu. Na základě schopnosti interakce s N-koncovou GBD oblastí s navázanou Rho GTPázou aktivovanou GTP,

kteřá byla původně nalezena u mDial proteinu, byly DRFs charakterizovány (Kohno et al., 1996; Watanabe et al., 1999).

Jak již bylo zmíněno, forminy DRFs jsou regulovány doménou GBD, na kterou se vážou malé GTPázy z rodiny Rho s navázaným GTP, ačkoliv tomu tak nemusí být vždy. V roce 2002 byl objeven lidský protein Nir2, který má na N-konci Rho inhibiční doménu homologní s forminovou GBD a preferenčně váže malé GTPázy z rodiny Rho s navázaným GDP (Tian et al., 2002). Malé GTPázy se účastní široké škály buněčných procesů, například buněčného dělení stejně jako forminy (Wasserman, 1998). Vazba malé GTPázy je regulována nasednutím DAD domény na DID doménu uvnitř molekuly, čímž na krátký čas zabrání nasednutí GTPázy a tím inhibuje funkci forminu (**obr. 2**). Ta je v aktivním stavu nakonec schopna DAD vytěsnit, navíc i zablokovat její schopnost nukleace aktinu (Evangelista et al., 1997; Higgs and Peterson, 2005).

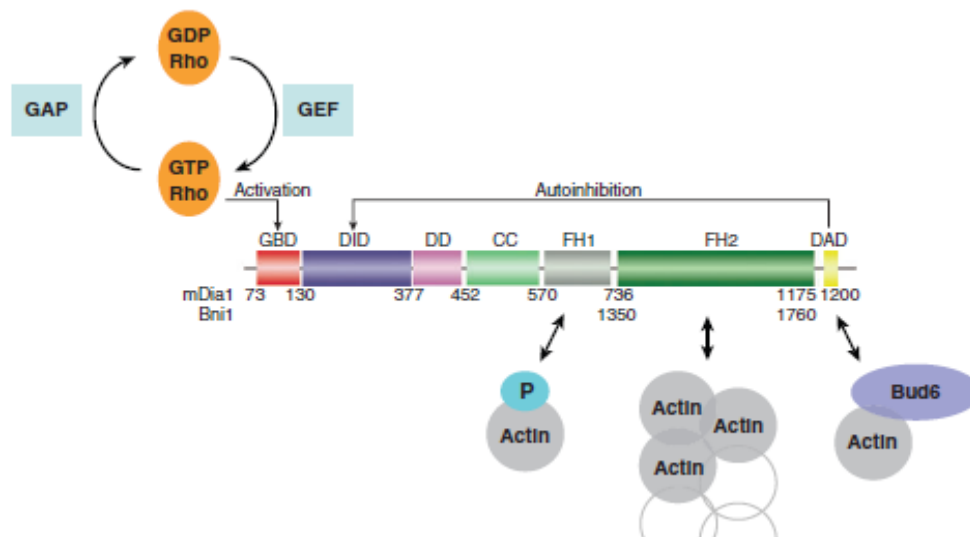
V případě forminů, které nespádají do DRFs, existují jiné regulační cesty a mechanismy. Například u savčích Delfilinů můžeme najít N-koncovou PDZ doménu, která se váže na glutamátový receptor  $\delta 2$ , který se účastní postsynaptické signalizace, a ve své podstatě reguluje aktivitu delfilinů analogicky jako Rho GTPázami zprostředkovaná regulace DRFs (Miyagi et al., 2002). Rostlinný formin AHF1 (AtFH1) a příbuzné proteiny (dále) mají na N-konci transmembránovou doménu, která by mohla mít lokalizační nebo regulační vlastnosti (Banno and Chua, 2000; Cvrckova, 2000).

Forminy mohou v ojedinělých případech obsahovat i jiné domény, které mohou být typické pro konkrétní proteinové izoformy nebo pro určité skupiny organismů (Grunt et al., 2008). Rostlinné forminy budou vzhledem k zaměření diplomové práce na modelový organismus *Arabidopsis thaliana* zmíněny v části 3.3.

### 3.2.2 FUNKCE FORMINŮ V REORGANIZACI CYTOSKELETU U OPISTHOKONT

Rodina forminů se účastní rozličných procesů, které souvisí s reorganizací aktinového a tubulinového cytoskeletu: tvorby lamelipodií, filopodií, ustanovení buněčné polarity, cytokineze (kontraktilní prstenec), váčkového transportu, vývoje embryí a jaderné signalizace (shrnuto v Goode and Eck, 2007; Wallar and Alberts, 2003). V některých případech bylo prokázáno, že formin setrvává na rozštěpeném konci aktinového vlákna prostřednictvím FH2 domény a napomáhá přidávání G-aktinu a elongaci, navíc chrání konec před capping proteiny. Ty blokují růst vláken (Pruyne et al., 2002; Zigmond et al., 2003). Je ale zajímavé, že aktinové vlákno s navázaným forminovým dimerem může růst také pomaleji, než rostloucí konec bez forminu.





**Obr. 2:** Struktura savčího mDia1 forminu nebo kvasinkového Bni1 forminu. Velikosti jednotlivých domén jsou uvedeny v horním řádku pro mDia1 a ve spodním rozdílky pro Bni1. Navíc je zde znázorněna dimerizační doména (DD). Intramolekulární autoinhibice je způsobena nasednutím DAD domény na DID. Nasednutím malé Rho GTPázy v aktivovaném stavu (aktivovaný stav zajišťují GAP (G-protein-activating protein) a GEF (guanine nucleotide exchange factor) na GBD dojde k uvolnění forminu z autoinhibovaného stavu. FH1 doména asociuje s G-aktin-profilinovým komplexem a urychluje elongaci vlákna, FH2 asociuje s rozštěpeným koncem vlákna a DAD doména u hub asociuje s Bud6-aktinovým komplexem (Moseley and Goode, 2005). Obrázek převzat z (Goode and Eck, 2007).

Je to způsobeno tím, že monomerní jednotky G-aktinu musí nejprve projít “bránou” vytvořenou forminem. U *Saccharomyces pombe* dokonce homologní CDC12p inhibuje polymeraci o 99% (Kovar et al., 2003; shrnuto v Paul and Pollard, 2009a).

Krystalografická struktura FH2 domény Bni1 forminu ukázala, že FH2 doména v homodimeru obsahuje mnoho vazebných míst pro vazbu s rostoucím rozštěpeným koncem vlákna (Xu et al., 2004). Díky tomu, že na rostoucí konec nasedá formin ve formě dimeru, může docházet k posunům FH2 domén tak, že část těchto domén “trčí” volně do prostoru a může tak podpořit vazbu dalšího monomeru. Po nasednutí monomeru na rostoucí vlákno aktinu dochází k disociaci a posunu forminového dimeru. Délka tohoto uvolnění může být závislá na délce spojovací oblasti mezi subdoménami v FH2 doméně forminu (shrnuté v Paul and Pollard, 2009a). Je možné, že při posunech forminového dimeru vzniká napětí, které umožňuje přidávat aktinový monomer pouze v určitém směru. Vzniká tak vlákno ve tvaru šroubovice. Nicméně rotace a vznik šroubovic z aktinu jsou stále otázkou (Shemesh et al., 2005).

Přítomnost FH1 a FH2 domén forminu způsobila zvýšení polymerace aktinu *in vitro*. Polymerace byla také přímo závislá na dostupnosti monomerního G-aktinu. V souvislosti s capping aktivitou mDia1 nebo Bni1 byla testována schopnost

forminu vázat se na rozštěpené konce aktinového vlákna (Pruyne et al., 2002). Tuto schopnost formin má, nicméně ani vysoká koncentrace forminu nezpůsobuje úplné zastavení polymerace, tedy se pravděpodobně váže jen částečně. Kromě capping aktivity se formin váže na F-aktin (filamentární/polymerní aktin) a má schopnost tvořit větve vláken. Přítomnost FH1 domény a komplexu profilin-G-aktin stimuluje prodlužování vláken.

Bylo zjištěno, že se komplex profilin-G-aktin může na rozštěpený konec vlákna vázat dvěma možnými způsoby: samovolně, v závislosti na okolní koncentraci G-aktinu, nebo regulovaně přes vazbu profilinu na FH1 doménu forminu na rozštěpeném konci filamenta (Paul and Pollard, 2009b). Schopnost profilinu vázat se na FH1 doménu, vysvětluje fakt, že vysoké koncentrace volného profilinu kompetují s komplexem G-aktin-profilin o vazebné místo na FH1 (Vavylonis et al., 2006).

Forminy se účastní přestaveb nejen aktinu, ale i mikrotubulů (shrnutí v Bartolini and Gundersen, 2010). V nedávné době bylo ukázáno, že některé savčí forminy, například mDia1, či formin Cappucino z *Drosophila melanogaster*, mohou přímo interagovat s mikrotubuly přes svou FH2 doménu (shrnutí v Bartolini and Gundersen, 2010). Hrají tedy zásadní roli v řízení cytokineze, rozchodu chromozomů při mitóze a meióze, migraci a adhezi buněk, buněčné polaritě a intracelulárním váčkovém transportu (Goode and Eck, 2007; Wallar and Alberts, 2003). Účast forminů při cytokinezi byla prokázána již v roce 1994, kdy Castrillon a Wasserman zkoumali savčí mDia1 formin, kdy u mutantů *diaphanous* došlo k selhání buněčného dělení při embryogenezi (Castrillon and Wasserman, 1994). Kvasinkový Bni1 protein byl prvně klonován roku 1996. Bylo prokázáno, že *in vitro* interaguje s malými Rho GTPázami (Kohno et al., 1996).

Další výraznou úlohou forminů je buněčná signalizace, která byla zkoumána zatím pouze na několika forminech a není příliš probádanou oblastí. Ta může být zprostředkována přímo přes interakce aktinu nebo nepřímo přes regulační proteiny asociované s cytoskeletem. Forminy jako efektorové proteiny fungují jako aktivátory malých Rho GTPáz (Rho, Rac, Cdc), savčí DRFs aktivují kinázy, například Src kinázu, která obsahuje formin vazebno doménu SH3, a může regulovat SRF (Serum Response Factor), transkripční regulátory v jádře (shrnutí v Young and Copeland, 2010).

### 3.3 FORMINY ROSTLIN

Rostliny mají buněčnou stěnu, čímž se výrazně liší od metazoí. Musí existovat cesta jak propojit buněčnou stěnu s aktinovým cytoskeletem. Existence

tohoto forminového “mostu” byla predikována F. Cvrčkovou (Cvrckova, 2000). V roce 2011 byla tato predikce potvrzena (Martiniere et al., 2011).

U modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* bylo nalezeno 21 izoforem na základě bioinformatického důkazu přítomnosti FH2 domény (Cvrckova et al., 2004a; Deeks et al., 2002). Všechny tyto forminy mají také na prolin bohatou FH1 doménu. Rostlinné forminy lze obecně rozdělit do tří fylogenetických subrodin (**Obr. 3**). Pro semenné rostliny je charakteristická třída I (zahrnující u *Arabidopsis* AtFH1-AtFH11) a třída II (zahrnující AtFH12-AtFH21), u nižších výtrusných rostlin a řas byla objevena ještě třída III, která jako jediná má doménu potenciálně vážící malé GTPázy, avšak nepříbuznou GBD (Cvrckova et al., 2004a; Deeks et al., 2002; Grunt et al., 2008). Třída I (vyjma AtFH7) má FH1 a FH2 a typickou N-koncovou transmembránovou doménu, která pravděpodobně směřuje formin sekreční drahou k plazmatické membráně (Banno and Chua, 2000; Cvrckova, 2000; Favery et al., 2004). Třída II obsahuje různorodé domény, predikovaná PTEN doména (sekvenčně prokázaná u genů *AtFH13*, *AtFH14*, *AtFH18* a *AtFH20* z *Arabidopsis*) by mohla způsobovat lokalizaci či vazbu forminu do membrány prostřednictvím vazby fosfolipidů (Cvrckova et al., 2004a). Tento mechanismus cílení forminu do membrány byl později prokázán u mechu *Physcomitrella patens* (van Gisbergen et al., 2012; Vidali et al., 2009) Proteiny této třídy mohou podléhat alternativnímu sestřihu, takže jejich počet není jasný (Grunt et al., 2008). Hlavním rozdílem mezi živočišnými a rostlinnými forminy je, že u rostlin nenajdeme GBD a jak již bylo zmíněno, dochází u nich pravděpodobně k jiným autoregulacím, popřípadě u vyšších rostlin zatím nebyla nalezena doména, která by s rostlinnými Rho GTPázami přímo či nepřímo interagovala (Grunt et al., 2008).

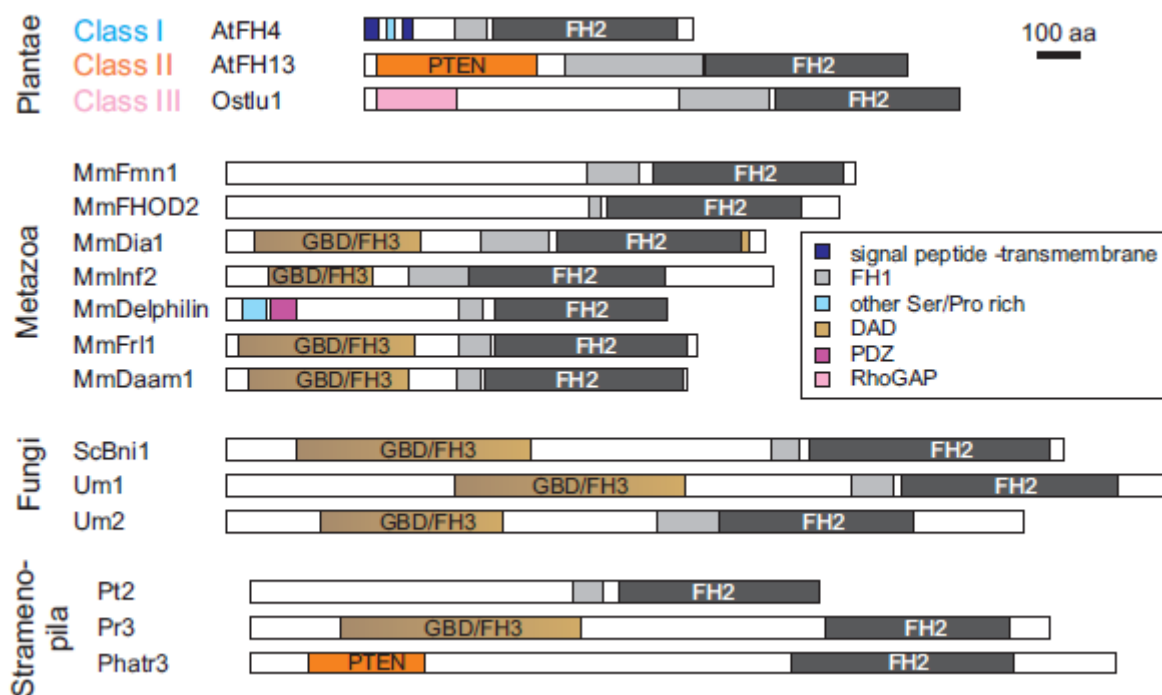
Forminy se u různých organismů účastní polarizovaného buněčného růstu a sekrece (shrnuto v Goode and Eck, 2007; Wallar and Alberts, 2003). U rostlin jsou proto často cílem výzkumu forminů kořenové vlásky, pylové láčky, epidermální buňky a trichomy. Přesto byla i u nejlépe charakterizovaného modelu *A. thaliana* dosud charakterizována jen malá část diverzity forminů, a to převážně zástupci I. třídy.

Formin AtFH1, jehož cDNA byla klonována v roce 2000, obsahuje FH1 a FH2 doménu a sekvence, které by mohly zprostředkovat asociaci s membránou. (Banno and Chua, 2000). Overexprese tohoto forminu způsobuje tvorbu aktinových “kabelů”, depolarizuje růst pylových láček a může ovlivnit či nějakým způsobem narušit endocytózu. Bylo také ukázáno pomocí translační fúze s GFP, že N-koncová transmembránová doména je lokalizována do membrány (Cheung and Wu, 2004). AtFH1 fluorescenčně značený YFP (yellow fluorescent protein), GFP (green fluorescent protein) a RFP (red fluorescent protein) kolokalizuje se signálním fosfolipidem PIP2 (fosfatidylinositol-(4,5)-bisfosfát) a do membrány je transportován přes endoplazmatické retikulum čili sekreční drahou. Byl také

vytvořen fúzní konstrukt s odstraněnou intracelulární doménou a konstrukt s transmembránovou doménou, jejichž lokalizace potvrdily, že formin lokalizuje do membrány. Navíc je formin v membráně mobilní, což bylo ukázáno pomocí metody Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP), kdy po vysvícení fluorescence forminu, došlo k postupnému obnovení fluorescence laterálně cestujícími proteiny (Martiniere et al., 2011). Na AtFH1 byla také objevena sekvence označená jako doména C, která formin ukotvuje k buněčné stěně a jeho mobilitu omezuje. Je tvořena pouze 15 aminokyselinami a obsahuje motiv SPPPP, který je typický pro proteiny buněčné stěny extensiny (Banno and Chua, 2000; Martiniere et al., 2011). V *in vitro* systému bylo ukázáno, že AtFH1 neprodlužuje vlákno z existujících rozštěpených konců, ale váže se na bok existujícího vlákna a dává vznik nové aktinové větvi (Michelot et al., 2005).

AtFH3, experimentálně charakterizovaný v roce 2009, má typickou stavbu pro třídu I. Na N-konci má signální peptid, transmembránovou doménu a FH1 a FH2 doménu na C-konci. Byl vytvořen jeho fúzní konstrukt a byl sledován vliv na elongaci rozštěpených konců aktinových vláken v přítomnosti G-aktinu nebo komplexu G-aktin-profilin. V přítomnosti komplexu docházelo k rychlému prodlužování vlákna. Podobně jako u AtFH1, i zde bylo ukázáno, že overexprese forminu způsobuje nadměrné svazkování aktinu. V pylové láčce se *AtFHI* neexprimuje, ale overexpresí genu *AtFH3* vznikají dlouhé “kabely” longitudálně v pylové láčce (Ye et al., 2009).

Při charakterizaci AtFH4, který spadá do subrodiny Ie rostlinných forminů, byla definována nová doména GOE (Deeks et al., 2010). Již v dřívějších pracech bylo zjištěno, že subrodina forminů třídy I má homologii mezi FH2 a transmembránovou doménou (Cvrckova et al., 2004a). Byl vytvořen konstrukt s FH1, FH2 a GOE z AtFH4 fúzovaný s GFP, který byl natransformován do *Nicotiana benthamiana* společně se značeným kinesinem, který asociuje s mikrotubuly. Výsledkem byla kolokalizace obou proteinů podél kortikálních mikrotubulů. Asociace GOE s mikrotubuly byla prokázána dalšími delečními konstrukty AtFH4, které neobsahovaly GOE a nelokalizovaly k mikrotubulům (Deeks et al., 2010). Přestože interakce forminů s mikrotubuly i aktinem jsou prokázány jen v několika případech, je možné, že jsou zcela běžné. Vývojové procesy v buňce vyžadují koordinaci mezi aktinovými vlákny a mikrotubuly. Podobné asociace s více cytoskeletálními proteiny nejsou v buňce výjimečné (shrnutí v Petrasek and Schwarzerova, 2009). Například PLD (fosfolipáza D/phospholipase D) patří mezi proteiny, které asociují s oběma systémy. Fosfatidová kyselina, která vzniká její aktivitou, asociuje s capping proteiny a stimuluje tak polymeraci F-aktinu (Huang et al., 2006).



**Obr. 3:** Přehled skupin forminů a jejich domén u jednotlivých říší. U rostlin je jako jako zástupce třídy I (Class I) vybrán AtFH4, pro třídu II AtFH13 z *Arabidopsis thaliana*, pro třídu III Ostlu1 z *Ostreococcus lucimarinus*. U metazoi jsou skupiny forminů odvozené od modelového živočicha *Mus musculus* (Mm). Názvy skupin metazoi: Fmn-formin, Fhod-FH domain-containing protein, Dia-Diaphanous, Inf-Inverted formin, FRr1-Formin related gene in leukocytes, Daam-Dishevelled-associated activator of morphogenesis. Pro houby byly vybrány modelové organismy *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) a *Ustilago maydis* (Um). Názvy skupin hub: Bni-Bud neck involved. Pro stramenopila byly použity organismy *Paramecium tetraurelia* (Pt), *Phytophthora ramonum* (Pr) a *Phaeodactylum tricornutum* (Pt). Popisky domén: FH-formin homology, DAD-Diaphanous autoregulatory domain, PDZ-Postsynaptic-density protein, RhoGAP-GTPase-activator protein for Rho-like GTPases, GBD-GTPase-binding domain, PTEN-Phosphatase and tensin-related. Převzato Grunt et al. 2008.

Fluorescenčně značený AtFH5-GFP je lokalizován v místě buněčného dělení v buněčné desce. V místě splývání této desky s buněčnou stěnou a membránou docházelo k rychlé degradaci proteinu. Navíc ztrátou funkce forminu AtFH5 dochází k poškození morfogeneze endospermu pyly (Ingouff et al., 2005). Stejně značený formin je silně exprimován v apikální zóně pylové láčky u *Arabidopsis* i tabáku a jeho lokalizace se mění i v závislosti na změně směru růstu láčky. AtFH5 byl lokalizován v místě tvorby aktinových vláken v rostoucí pylové láčce, kde indukuje tvorbu aubapikálních aktinových struktur. V případě ztráty funkce forminu AtFH5 byl narušen vrcholový růst pylové láčky tabáku. Láčka vykazovala spirálovitý a klikatý fenotyp. (Cheung et al., 2010).

Také u *Oryza sativa* byl nalezen gen kódující formin FH5/BENT UPPERMOST INTERNODE1 (BUI1). Mutant v tomto genu *bui1* vykazuje nižší vzrůst, buňky nejsou tak dlouhé jako u divoké rýže a také semena jsou menší. Semenáčky mají navíc narušený gravitropismus. Z toho důvodu bylo také zjištěno, jak u mutanta *bui1* vypadají aktinová vlákna. K označení aktinových vláken byl specificky použit faloidin. U mutanta *bui1* bylo narozdíl od divoké rýže mnohem méně aktinových vláken a byla dezorganizována. FH5 tedy hraje roli v aktinové polymeraci a jak bylo ukázáno, váže se na rozštěpený konec vlákna a chrání ho před depolymerací (Yang et al., 2011).

Ve stejném období byl tento formin u rýže charakterizován taktéž jako RICE MORPHOLOGY DETERMINANT (RMD). Také u mutanta pozorovali vývojové vady na vegetativních i generativních částech rostliny. Navíc ale ukázali, že mutací v FH5 forminu dochází nejen k abnormální stavbě aktinové sítě, ale také u mikrotubulů *in vivo*. V neposlední řadě také ukázali, že FH5 může pravděpodobně asociovat s membránou plastidů (Zhang et al., 2011b).

Forminy, jakožto proteiny, které se účastní přestaveb cytoskeletu, byly nalezeny v kořenových buňkách *Arabidopsis*, které byly napadeny hád'átkem *Meloidogyne incognita*. To se projevuje "obřím" neforemným vzhledem buněk, které jsou navíc mnohojaderné. V těchto buňkách se exprimují forminy AtFH1, AtFH6 a AtFH10, které se v kořenech u běžné divoké formy *Arabidopsis thaliana* nevyskytují. Bylo ukázáno, že fúzní protein AtFH6 s GFP se váže na plazmatickou membránu. Účastní se přestaveb aktinových vláken, které jsou zásadní pro polarizovaný růst buněk, který je u buněk napadených hád'átkem narušen (Favery et al., 2004).

V roce 2005 byl charakterizován další formin I. třídy AtFH8. Overexprese tohoto proteinu ovlivňuje morfogenezi a vrcholový růst tím, že pozměňuje rozložení aktinu v kořenových vláscích. Ty jsou kratší, vlnité či "zduřelé" oproti běžným vláskům (Yi et al., 2005).

U AtFH8 bylo o několik let později ukázáno, že forminy mohou *in vitro* tvořit dimery. Vzhledem k tomu, že není příliš jasné jak je prostřednictvím forminů organizován aktin, byly použity konstrukty AtFH8 ke sledování vlivu na aktin. U konstruktu s FH1 a FH2 daného forminu bylo pozorováno, že vznikají extrémně tlustá a dlouhá vlákna aktinu. Jak bylo později ukázáno, nejednalo se o jednotlivá vlákna, ale o celý svazek z několika vláken. Navíc určitá koncentrace FH1 a FH2 (400nM) s profilinem způsobila "hvězdné" specifické struktury aktinu, taktéž tvořené jednotlivými vlákny aktinu (Xue et al., 2011).

U AtFH8 byla provedena pěkná analýza vnitrobuněčné lokalizace jednotlivých částí fúzovaných s GFP a samotného celého forminu. Celý AtFH8 značený taktéž GFP a N-konec forminu (obsahující transmembránovou doménu) byly lokalizovány převážně do jaderného obalu interfázní buňky a do nově

vznikající buněčné přepážky při mitóze. C-konec, tedy FH1 a FH2 doména, postrádající transmembránovou doménu, byl lokalizován do jádra (Xue et al., 2011).

*AtFH8* sdílí s *AtFH4* ze 71% identickou sekvenci a jsou si strukturně podobné až z 80%. Na základě porovnání těchto sekvencí s ostatními známými forminy třídy I vzniklo několik podtříd. *AtFH4* a *AtFH8* spadají do podtřídy Ie. Overexprese těchto značených proteinů ukázala, že jsou lokalizovány v příčných buněčných přepážkách mezi nedávno rozdělenými buňkami. To ukazuje na fakt, že se forminy této podtřídy váží na membrány. Navíc bylo ukázáno, že delece FH2 domény *AtFH8* způsobuje poruchy buněčného růstu u kořenových vlásků *A. thaliana* (Deeks et al., 2005).

Z třídy II byly zatím u *A. thaliana* částečně charakterizovány pouze forminy *AtFH12* a *AtFH14*. Mutantní rostliny s forminem *AtFH12* s deletovanou PTEN doménou nevykazovaly žádný abnormální fenotyp. Křížením byl vytvořen mutant, který obsahoval *in vivo* aktinový marker GFP:m-talin, který umožňuje fluorescenční pozorování aktinu a zároveň inhibuje jeho depolymeraci, a mutovaný *AtFH12* s deletovanou PTEN. V pokožkových buňkách kořene a hypokotylu těchto mutantů byly pozorovány zvláštní struktury aktinových vláken, jako nadměrné svazkování aktinových vláken, tvorbu aktinových "kruhů" a jiných shluků, ze kterých se dá jen těžko usuzovat na proces, který byl takto forminy zasažen (Cvrčková et al., 2012).

*AtFH14* má 3 funkční domény: N-koncovou PTEN doménu, FH1 a FH2. *AtFH14* fúzovaný s GFP byl vizualizován ve stabilně transformovaných buňkách BY-2. Byl lokalizován v preprofázním prstenci, dělicím vřetenku a fragmoplastu. Také bylo ukázáno, že se váže jak k aktinu tak i preferenčně k tubulinu. Což bylo u forminů objeveno prvně. Mutace v *AtFH14* způsobuje vady dělení buněk mikrospor (Li et al., 2010).

Funkce forminů je v hojné míře také studována na již zmiňovaném mechu *Physcomitrella patens*. U mechu byly nalezeni zástupci všech 3 forminových tříd, i třídy III, která se nevyskytuje u krytosemenných rostlin. Třída I se skládá ze 3 podtříd For1 forminů rozdělených na základě podobnosti jejich FH2 domén (Grunt et al., 2008). Všech 6 genů třídy I (For1A-F) bylo experimentálně umlčeno. Rostliny byly oproti kontrolním rostlinám menší, obsahovaly méně buněk, což mohlo být způsobeno narušením buněčného dělení. Polarita buněk narušena nebyla (Vidali et al., 2009). Umlčení 2 genů třídy II (For2G-H) způsobilo narušení polarizovaného růstu, buňky byly malé a kulaté, F-aktin orientován elipticky v kulaté buňce. Samotná přítomnost vláken ale napovídá, že bude přítomen ještě další aktinový nukleátor (Vidali et al., 2009).

Bylo řečeno, že rostlinné forminy postrádají N-koncovou Rho vazebnou doménu (Cvrckova et al., 2004b). U *Physcomitrella patens* byla objevena regulace forminů třídy II pomocí signálních fosfolipidů (regulace fosfolipidy shrnuta v

Zarsky et al., 2009). Fosfoinositol-3,5-bisfosfát (PI(3,5)P(2)) se váže na PTEN doménu forminu třídy II a může tak regulovat polarizovaný růst aktinového vlákna. Tyto forminy spolu s fosfoinositoly nasedají na aktinová vlákna v kortikální cytoplazmě a mohou je přestavovat. Jak je tento proces řízen není jasné (van Gisbergen et al., 2012)

### 3.3.1 PTEN DOMÉNA

V roce 2004 byla sekvenční analýzou zjištěna charakteristická stavba některých forminů skupiny II. Byla u nich odhalena PTEN doména, jejímž prototypem je stejnojmenný lidský antionkogen (Cvrckova et al., 2004a; Li et al., 1997). PTEN je zkratka pro homolog fosfatáz a tenzinu ležícího na chromozomu 10 u člověka. Ta byla odhalena sekvenční analýzou tumorového genu. Ten obsahoval velkou homologní oblast stejnou jako má gen pro kuřecí tensin a hovězí auxilin, navíc byla nalezena i subdoména homologní s fosfatázou. Mutace PTEN způsobují nádory prsní žlázy, štítné žlázy či prostaty (Li et al., 1997). PTEN patří mezi fosfatázy s duální specifitou, tedy mohou defosforylovat fosfátovou skupinu z tyrozinu, serinu nebo threoninu.

Lidská PTEN má tedy dvě části: lipidovou fosfatázu (N-konec) a doménu podobnou C2 (C-konec). Lipidová fosfatáza má silnou afinitu k vazbě PtdIns(4,5)P2 (fosfatidylinositol-(4,5)-bisfosfát) a slabou tyrosin fosfatázovou aktivitu, a proto může defosforylovat jak proteiny tak lipidy (shrnuto v Leslie et al., 2008).

Fosfatázová doména vykazuje podobnost s N-koncovou doménou tensinu. Ten se váže na aktinová filamenta a zároveň také na integriny přes fosfotyrosinovou doménu, což se uplatňuje v buněčném pohybu a buněčné adhezi (shrnuto v Lo 2004 (Lo, 2004)). Podobná doména byla nalezena i u některých auxilinů metazoi a u cyklinů asociovaných s G-protein kinázami (Li et al., 1997). Tensin může také hrát roli v celkové reorganizaci cytoskeletu, protože se může vázat jednak na rozštěpený konec vlákna, ale také působit jako propojující prvek vláken (Lo et al., 1994).

C2 doménu můžeme najít v celé škále proteinů, které se účastní fúze membrán, váčkového transportu, regulace GTPázami, proteinové fosforylace, regulace a degradace. Tato doména zprostředkovává protein-proteinové nebo protein-membránové interakce, často závislé na přítomnosti  $Ca^{2+}$ . Nicméně k samotné vazbě na proteiny C2 doména  $Ca^{2+}$  nepotřebuje, vazba je umožněna elektrostatickými interakcemi (Lee et al., 1999; Murray and Honig, 2002).

Zdá se, že C2 doména může být také regulována pomocí fosforylace a defosforylace serinů a threoninů za C2 doménou, kterou umožňuje zatím neznámá kináza. Fosforylace těchto zbytků inaktivuje C2 doménu, tedy i vazbu PTEN na



membrány (Raftopoulou et al., 2004). Nicméně tento motiv byl u rostlinných forminů opět pozměněn (Cvrckova et al., 2004a).

U *Arabidopsis thaliana* byly nalezeny PTEN domény s podobnou stavbou jako u metazoi. V databázi TAIR existují tři homology PTEN bez homologie s forminy-AtPTEN: 1, 2, 3 (Swarbreck et al., 2008). Doménu příbuznou s PTEN můžeme najít i u některých forminů z třídy II (viz 3.3). Jak se ukázalo v sekvenční analýze rostlinných forminů, argininový zbytek, který hraje pravděpodobně zásadní roli ve funkci fosfatázové domény, je zde nahrazen hydrofóbní či malou polární aminokyselinou. Tedy zde nejspíš ztrácí svou fosfatázovou funkci (Cvrckova et al., 2004a).

Prvním blíže charakterizovaným rostlinným homologem PTEN je AtPTEN1. Kóduje tyrozin fosfatázu, která je blíže příbuzná lidské PTEN. Má i stejnou funkci. Defosforyluje fosfotyrosinové a fosfatidylinositolové substráty. Tyrozin fosfatázy byly u vyšších rostlin objeveny až v roce 1998 (Gupta et al., 1998). Na AtPTEN1 byla demonstrována schopnost tohoto proteinu hydrolyzovat fosfotyrosin a defosforylovat fosfatidylinositol (např. PtdIns(3,4,5)P3), stejně jako je tomu u lidské PTEN (Gupta et al., 2002; Maehama and Dixon, 1998). Fosforylace PtdIns(3,4,5)P3 v pozici 3 za vzniku fosfatidylinositolu-(4,5)-bisfosfátu může umožnit další regulace mnoha signálních drah, podobně jako u lidské PTEN (Maehama and Dixon, 1998). AtPTEN1 je specificky exprimována v prašníku a pylových zrnech. Její mutace způsobovala poruchy ve vývoji pylu a praskání exiny (Gupta et al., 2002).

AtPTEN2 kóduje dva proteiny AtPTEN2a a AtPTEN2b. V *in vitro* podmínkách vykazují slabou tyrosin fosfatázovou aktivitu. Narozdíl od živočišných PTEN vykazují u 3' fosfátové skupiny fosfatázovou aktivitu u substrátů: fosfatidylinositol-3-fosfát, fosfatidylinositol-3,4-bisfosfát a fosfatidylinositol-3,5-bisfosfát. AtPTEN2a se navíc silně váže k fosfatidové kyselině, jednomu z hlavních druhých poslů v rostlinné signalizaci. Obě zjištění poukazují na fakt, že PTEN u *Arabidopsis* bude hrát roli v buněčné signalizaci (Pribat et al., 2012; Zarsky et al., 2009).

Fosfatidylinositol-3,5-bisfosfát byl použit k testování vlivu této molekuly na polarizovaný růst buněk u *Physcomitrella patens*. Umlčením kinázy, která tyto molekuly produkuje, došlo v buňce k redukci množství forminů v kortikální cytoplazmě a narušení polarizovaného růstu, který je zprostředkováván právě remodelací kortikálního aktinového cytoskeletu via forminy (van Gisbergen et al., 2012). Bylo také ukázáno, že PTEN lokalizuje forminy do buněčného povrchu, fragmoplastu a buněčné kortex, kde se jeví jako dynamické pohyblivé kortikální body (van Gisbergen et al., 2012). Dynamika těchto bodů byla závislá na aktivitě aktinové polymerace, navíc jak se ukázalo, za pohybujícími se body vznikala polarizovaná aktinová filamenta. Forminy tedy mají schopnost remodelovat

stávající aktinovou síť, nicméně jakým způsobem je indukován polarizovaný růst je nejasné (van Gisbergen et al., 2012).

Zajímavým zjištěním bylo, že *Arabidopsis thaliana* AtPTEN1 reguluje autofagii u pylových láček. Jeho overexprese způsobila akumulaci autofagických tělísek v souvislosti s narušením dynamiky fosfatidylinositolu-3-fosfátu (Zhang et al., 2011a)

Celkově se o rostlinných PTEN dá říci, že toho o nich mnoho nevíme. PTEN doména byla nalezena pouze u několika dalších rostlinných druhů, popřípadě hub: u *Oryza sativa*, některých mechů, kaprad'orostů a *Phytophthora ramorum* (Grunt et al., 2008). Na funkci PTEN se dá většinou pouze odkazovat do živočišné říše, zdá se ale, že první fakta o rostlinných PTEN pomohou objasnit i celkovou funkci forminů v buněčné morfogenezi a signalizaci. Ta je v souvislosti s rostlinnou životní strategií odlišná od živočichů.

### 3.3.2 *AtFH14* A *AtFH13*

Tato práce byla původně zaměřena na formin AtFH14 z *Arabidopsis thaliana*. Na základě dat z databáze Genevestigator (Hruz et al., 2008) lze zjistit míru exprese v částech *Arabidopsis*. Na základě dat z TAIR byla predikována sekvence *AtFH14* i její PTEN domény (Swarbreck et al., 2008). O tomto forminu se mnoho neví (viz 3.3) a o jeho PTEN doméně neexistují ani žádné práce.

V návaznosti na práci Mgr. Sylvie Přerostové jsem pracovala také s forminem AtFH13. O tomto forminu lze doposud říci, že má ověřenou sekvenci PTEN domény, která podléhá alternativnímu sestřihu. Další data jsou pouze predikována na základě databází TAIR a Genevestigator (Hruz et al., 2008; Swarbreck et al., 2008).

## 4. MATERIÁL A METODY

### 4.1 BIOLOGICKÝ MATERIÁL

#### 4.1.1 ROSTLINY

Ve své práci jsem používala rostliny *Arabidopsis thaliana*, z osiva ze sbírek laboratoře buněčné morfogeneze na Katedře experimentální biologie rostlin PřF UK. Pro izolaci rostlinné DNA a stabilní transformaci metodou floral dip byly používány rostliny *Arabidopsis thaliana Col-0* (wt).

Izolaci PTEN domény forminu 14 jsem prováděla s již připravenou cDNA knihovnou pACT2 (suspenní kultura *Arabidopsis thaliana*), kterou do laboratoře věnovala Doc. RNDr. Pavla Binarová, CSc (Ústav experimentální botaniky rostlin AV ČR).

Na tranzientní transformace jsem používala mladé *Nicotiana benthamiana*, které byly vypěstovány ze sbírek laboratoře.

Podmínky kultivace jsou uvedeny v následující kapitole 4.2.

#### 4.1.2 BAKTERIE

Plazmidy, které jsem si upravila pro klonování, jsem elektroporací vnášela do kompetentních buněk bakterií *Escherichia coli DH5α*. Dále jsem používala kmen *Escherichia coli BL21codon(+)* pro expresi proteinů. Oba kompetentní kmeny byly připraveny Mgr. Ivanem Kulichem a Mgr. Radkem Bezvodou dle standardních laboratorních protokolů. Pěstovány byly při 37°C s přidanými příslušnými antibiotiky (Asubel et al., 1992 (str. 1-24)) a byly uskladňovány v mrazničce při -70°C v 50μl suspenzích.

Pro stabilní a tranzientní expresi fúzního proteinu jsem používala *Agrobacterium tumefaciens GV3101*, které nese resistenci vůči 15mM rifampicinu a 10 mM gentamycinu. Při tranzientní transformaci jsem navíc používala *Agrobacterium tumefaciens* s vneseným plazmidem p19 (inhibitor umlčování genů), které je odolné 15mM rifampicinu, 10 mM gentamycinu a 100mM kanamycinu (konečné koncentrace v médiu). *Agrobacterium* bylo rovněž uchováváno v mrazničce při -70°C a připraveno dle laboratorního protokolu při 37°C s příslušnými antibiotiky (Asubel et al., 1992).

## 4.2 PĚSTOVÁNÍ ROSTLIN

### 4.2.1 *ARABIDOPSIS THALIANA*

Rostliny *Arabidopsis thaliana* jsem pro sběr semen pěstovala na rašelinových peletách. Semena jsem nejprve vernalizovala přes noc v chladové místnosti. Rostliny jsem pěstovala v kultivační místnosti: konstantně 20°C, vlhkost 40%, 16 hod. světlo/8 hod. tma, ozáření 100 $\mu$ mol/m<sup>2</sup>/s.

Pro mikroskopická pozorování byly rostliny pěstovány asepticky na čtvercových Petriho miskách s vyklávaným (121°C, 0,144 MPa, 20 min. na autoklávu Omega<sup>TM</sup>Media ) ½ MS médiem (Murashige and Skoog, 1962). Semena pro tento typ výsevu jsem sterilizovala ve flow-boxu ALPINA 20 min. 20% SAVEM a 4x promyla sterilní destilovanou vodou. Po výsevu na čtvercové misky jsem je uložila na noc do chladové místnosti a druhý den přenesla do kultivační místnosti: konstantně 20°C, vlhkost 40%, 16 hod. světlo/8 hod. tma, ozáření 100 $\mu$ mol/m<sup>2</sup>/s.

### 4.2.2 *NICOTIANA BENTHAMIANA*

Rostliny tabáku *Nicotiana benthamiana* byly pěstovány na vyklávané směsi hlíny, písku a perlitu. Po výsevu jsem rostliny přenesla do kultivační místnosti: konstantně 20°C, vlhkost 40%, 16 hod. světlo/8 hod. tma, ozáření 100 $\mu$ mol/m<sup>2</sup>/s.

## 4.3 PREDIKCE SEKVENCE – BIOINFORMATICKÁ ANALÝZA

V internetové genové databázi TAIR (The *Arabidopsis* Information Resource (Rhee et al., 2003; Swarbreck et al., 2008) a proteinové databázi UniProt (Jain et al., 2009) jsem našla informace o sekvenci forminu 14. Získaná data o genomové sekvenci, mRNA a ESTs (Expressed Sequence Tags) jsem porovnávala s genomovou sekvencí v programu MACAW v2.0.5 (Multiple Alignment Construction and Analysis Workbench; (Schuler et al., 1991). Sekvenci proteinu jsem pomocí nástroje reverzní translace v programu SMS (Sequence Manipulation Suite, (Stothard, 2000)) převedla na cDNA a porovnávala se sekvencemi DNA v databázi TAIR nástrojem TAIR BLAST 2.2.8.

## 4.4 PRIMERY

Na základě ověřené genomové a cDNA sekvence jsem navrhovala primery pro klonování PTEN domény forminu 14. K navrhování a jejich optimalizaci jsem používala program NetPrimer (PREMIER Biosoft International, Palo Alto CA, USA, <http://www.premierbiosoft.com/>). Do primerů jsem zanesla restriční místa vhodná pro štěpení restričními enzymy a následně vložení do donorového vektoru pENTR<sup>TM</sup>1A (sbírkové označení FD349, Invitrogen<sup>TM</sup>). Objednány byly od firmy Sigma-Aldrich<sup>®</sup>.

V návaznosti na diplomovou práci Mgr. Sylvy Přerostové jsem pracovala s primery pro klonování celého forminu 13 (Přerostová, 2011).

K sekvenování fragmentu vneseného do pENTR<sup>TM</sup>1A jsem používala primery navržené Mgr. Ivanem Kulichem.

Názvy primerů, jejich sekvence, směr, vnášené restriční místo a  $T_m$  jsou uvedeny v **tabulce 1**. V **tabulce 2** jsou shrnuty základní údaje o kombinacích používaných primerů a očekávaných délkách získaných sekvencí.

| název primeru                 | směr    | sekvence                               | vnesené restriční místo | $T_m$ [°C] |
|-------------------------------|---------|--|-------------------------|------------|
| PTEN-FH14<br>KPN_FOR          | forward | 5'-TGTGGTACCTGTCGTCTCAGGTTCTT-3'       | 5'-GGTACC-3'            | 65,4       |
| PTEN-FH14<br>XHO_REV          | reverse | 5'-CGCTCGAGTTCTCAACTTCTCCAAAC-3'       | 5'-CTCGAG-3'            | 67,0       |
| FH14head_Kpn                  | forward | 5'-TTGGTACCCTAACCAAGGTTCTTCCAATG-3'    | 5'-GGTACC-3'            | 67,2       |
| FH14head_Xho                  | reverse | 5'-GGACTCGAGGGAAGATTCAAAGGGTTG-3'      | 5'-CTCGAG-3'            | 70,5       |
| FH13PTEN_TAIR                 | forward | 5'-ACTGGTACCAAATGGCATTGTTTCGCAAATTG-3' | 5'-GGTACC-3'            | 75,5       |
| FH13full_rev                  | reverse | 5'-GTCGGCCGAGGAGCGGTTCTTTCTTTAG-3'     | 5'-CGGCCG-3'            | 76,8       |
| pENTR1a_FOR                   | forward | 5'-CAATGCTTTTTTATAATGCC-3'             | -                       | 51,2       |
| pENTR1a_REV                   | reverse | 5'-GAGATTTTGAGACACGGG-3'               | -                       | 49,9       |
| FH14tail_Sal                  | forward | 5'-CAGTGTCGACAACCCTTTG-3'              | 5'-GTCGAG-3'            | 53,9       |
| FH14tail_ATG                  | forward | 5'-CAGTGTCGACAACCCTATGAATCTTCC-3'      | 5'-GTCGAG-3'            | 66,5       |
| FH14tail_EcoRV<br>(ohne stop) | reverse | 5'-TCGATATCTATGTCTATGGATCTGC-3'        | 5'-GATATC-3'            | 57,7       |
| FH14down_<br>EcoRV            | reverse | 5'-AAGATATCTGCTCTTGTTCCGTATG-3'        | 5'-GATATC-3'            | 59,4       |

**Tab. 1:** Primery používané pro amplifikaci PTEN domény forminu 14 z genomové DNA a cDNA knihovny pACT2. Do nich byla vložena restriční místa KpnI(GGTACC) a XhoI(CTCGAG) vhodná pro vektor pENTR<sup>TM</sup>1A. Primery pro namnožení celého FH13 s restričními místy Kpn(GGTACC) a EagI(CGGCCG). Primery pENTR1a byly používány k sekvenování PTEN domény vložené do pENTR<sup>TM</sup>1A. Primery pro amplifikaci C-konce forminu 14 z cDNA s restričními místy SalI(GTCGAG) a EcoRV(GATATC) jsou uvedeny v poslední sekci primerů. Teploty tání primerů T<sub>m</sub> byly vygenerovány programem NetPrimer.

| primery |                            | délka úseku [bp] |      | doba elongace [min] | typ polymerázy                                    | teplota nasedání primeru [°C] |
|---------|----------------------------|------------------|------|---------------------|---|-------------------------------|
|         |                            | genomová DNA     | cDNA |                     |   |                               |
| forward | PTEN-FH14 KPN_FOR          | 1423             | -    | 1:00                | Phusion <sup>®</sup> High-Fidelity DNA Polymerase | 60                            |
| reverse | PTEN-FH14 XHO_REV          |                  |      |                     |   |                               |
| forward | FH14head_Kpn               | -                | 1503 | 1:45                | Dream Taq <sup>TM</sup> Polymerase                | 59                            |
| reverse | FH14head_Xho               |                  |      |                     |   |                               |
| forward | FH13PTEN_TAIR              | 5758             | -    | 2:40                | Phusion <sup>®</sup> High-Fidelity DNA Polymerase | 69,8                          |
| reverse | FH13full_rev               |                  |      |                     |   |                               |
| forward | FH14tail_Sal               | -                | 2230 | 0                   | Dream Taq <sup>TM</sup> Polymerase                | 0                             |
| reverse | FH14tail_EcoRV (ohne stop) |                  |      |                     |   |                               |
| forward | FH14tail_Sal               | -                | 2331 | 0                   | Dream Taq <sup>TM</sup> Polymerase                | 0                             |
| reverse | FH14down_EcoRV             |                  |      |                     |   |                               |
| forward | FH14tail_ATG               | -                | 2230 | 0                   | Dream Taq <sup>TM</sup> Polymerase                | 0                             |
| reverse | FH14tail_EcoRV (ohne stop) |                  |      |                     |   |                               |

**Tab.2:** Kombinace primerů, které jsem používala. V tabulce jsou uvedeny i templátové DNA, délky amplifikovaných fragmentů spolu s použitým typem polymerázy a některých podmínek pro PCR. Teplota nasedání primeru byla u všech kombinací testována v teplotním gradientu v rozmezí +5°C. Kombinace primerů s uvedenými hodnotami “0”, které byly navrženy pro pomnožení *AtFH14* C-konce, se nepodařilo optimalizovat.

#### 4.5 IZOLACE GENOMOVÉ DNA Z *ARABIDOPSIS THALIANA*

Mladé zelené listy *Arabidopsis thaliana Col-0* jsem homogenizační tyčinkou rozmělnila v 1,5ml eppendorfky a přidala 400 $\mu$ l extrakčního pufru (200mM Tris-HCl pH 7,5, 250mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5% SDS). Po chvíli jsem přidala 300 $\mu$ l chloroformu a 5 minut jsem nechala na vortexu Vortex2 Genie od Scientific Industries. Poté jsem suspenzi zcentrifugovala 3 min. 13000 rpm na centrifuze Eppendorf Microcentrifuge 5415R.

Do nové 1,5ml eppendorfky jsem odebrala 300 $\mu$ l supernatantu, přidala 300 $\mu$ l izopropanolu, promíchala a nechala na ledu srážet 10 min. Suspenzi jsem 5 min. centrifugovala při 13000 rpm. Supernatant jsem slila a peletu s vyizolovanou DNA usazenou na dně eppendorfky jsem 10 min. sušila při RT. Poté jsem ji rozpustila ve 100 $\mu$ l 2mM TRIS (pH 8,8). DNA jsem skladovala v mrazničce.

#### 4.6 POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

PCR reakce za použití DreamTaq<sup>TM</sup> polymerázy obsahovala 15,31 $\mu$ l sterilní destilované vody, 2 $\mu$ l DreamTaq<sup>TM</sup> pufru, 2 $\mu$ l templátové DNA, 0,25 $\mu$ l dNTP (10mM), 0,2 $\mu$ l forward primeru, 0,2 $\mu$ l reverse primeru (1 $\mu$ M), 0,04 $\mu$ l DreamTaq<sup>TM</sup> polymerázy (konc. 5u/ $\mu$ m) od firmy Fermentas. V této reakci byla jako templátová DNA použita knihovna pACT2 ředěná v poměru 1:10. Program PCR reakce byl následující: 94°C 2:00 min., 94°C 0:30 min., 59°C 1:00 min., 72°C 1:45 min., 72°C 10:00 min., krok 2.-4. opakován 30x.

PCR reakce s použitím polymerázy Phusion<sup>®</sup> High-Fidelity od firmy Finnzymes (konc. 2u/ $\mu$ l) pro primery PTEN FH14 obsahovala 12,8 $\mu$ l sterilní destilované vody, 4 $\mu$ l 5x Phusion<sup>®</sup> HF reakčního pufru, 1 $\mu$ l DNA templátu (uvedeno v tab. 2), 1 $\mu$ l premixu primerů (1 $\mu$ M) (připraveno z 10 $\mu$ l forward primeru+10 $\mu$ l reverse primeru+30 $\mu$ l sterilní destilované vody), 0,6 $\mu$ l DMSO, 0,4 $\mu$ l dNTP (10mM), 0,2 $\mu$ l Phusion<sup>®</sup> High-Fidelity polymerázy (konc. 2u/ $\mu$ l). Reakce probíhala za těchto cyklů: 98°C 30s, 98°C 10s, 60°C 30s, 72°C 1 min., 72°C 10 min., s opakováním kroku 2.-4. 30x.

Phusion<sup>®</sup> High-Fidelity (konc. 2u/ $\mu$ l) jsem používala také pro amplifikaci forminu AtFH13 s primery FH13PTEN\_TAIR a FH13full\_rev. Reakce obsahovala 13,3 $\mu$ l sterilní destilované vody, 4 $\mu$ l 5x Phusion<sup>®</sup> HF reakčního pufru, 0,5 $\mu$ l DNA templátu (uvedeno v tab. 2), 1 $\mu$ l premixu primerů (1 $\mu$ M), 0,6 $\mu$ l DMSO, 0,4 $\mu$ l dNTP (10mM), 0,2 $\mu$ l Phusion<sup>®</sup> High-Fidelity polymerázy (konc. 2u/ $\mu$ l). Reakce probíhala za těchto cyklů: 98°C 30s, 98°C 8s, 69,8°C 20s, 72°C 2:40 min., 72°C 10 min., s opakováním kroku 2.-4. 27x. DNA templátem pro obě reakce s touto polymerázou byla genomová DNA získaná dle 4.5.

Reakce byly prováděny v termocykleru TPersonal (Biometra) nebo gradientovém cykleru TGradient (Biometra) v mikrozkušnicích o objemu 200  $\mu$ l.

Produkty PCR reakcí jsem vizualizovala elektroforézou. Elektroforetický gel obsahoval 1% agarózu, 1xTBE (Tris, k. boritá, EDTA), dle celkového množství gelu jsem přidávala fluorescenční barvivo GelRed<sup>TM</sup> (Biotium, 10000x ve sterilní destilované vodě), př. do 30g gelu jsem přidávala 3 $\mu$ l GelRed<sup>TM</sup> (Biotium, 10000x ve sterilní destilované vodě). Elektroforéza probíhala v 1xTBE pufru zpravidla při 90V. Vzorek byl nanášen na gel s 6x Loading Dye (Fermentas) a k určování velikosti vzorku jsem používala velikostní žebříček GeneRuler<sup>TM</sup> DNA Ladder Mix (0,5 $\mu$ g/ $\mu$ l) od Fermentas. Výsledek elektroforézy jsem vyhodnocovala na digitálním zobrazovacím systému G:BOX zn. Syngene pomocí programu GeneSnap (Syngene).

## 4.7 KLONOVÁNÍ

### 4.7.1 NAMNOŽENÍ (REAMPLIFIKACE) PCR PRODUKTU

Vybranými dvojicemi primerů (viz Tab.2) a optimalizováním podmínek pro PCR reakci shrnutých v kapitole 4.6, jsem namnožila části DNA. Ty jsem vizualizovala na elektroforetickém gelu (viz 4.6) Proužek DNA, který velikostně odpovídal hledanému fragmentu, jsem sterilním skalpelem vyřízla, zmrazila a zcentrifugovala 1 min. při 13000 rpm na centrifuze Eppendorf Microcentrifuge 5415R. Ze supernatantu jsem odebrala takové množství DNA, abych mohla namíchat PCR reakce do větších, obvykle 50 $\mu$ l reakcí. Ty jsem poté do termocykleru rozdělila po 25 $\mu$ l kvůli správnému a rychlejšímu prohřívání či chlazení vzorků.

### 4.7.2 RESTRIKCE

Fragment bylo nutné ověřit kontrolní restrikcí. Vhodné restriktázy jsem hledala na základě restrikční mapy v programu SMS (Stothard, 2000). Restrikční reakce obsahovala 16,8 $\mu$ l sterilní destilované vody, 2 $\mu$ l restrikčního pufru, 1 $\mu$ l DNA, 0,2 $\mu$ l restrikčního enzymu (enzym a pufr od firmy Fermentas, viz Výsledky). Reakce probíhala 1 hod. ve 37°C a výsledek byl vyhodnocován na gelu (viz 4.6).

Produkt PCR reakce byl přečištěn pomocí kitu High Pure PCR Cleanup Micro Kit (Roche), používala jsem 400 $\mu$ l Binding Buffer a DNA z kolonky jsem eluovala do 30 $\mu$ l.

Takto přečištěnou DNA (dále inzerť) a vhodný plazmid (dále vektor) jsem štěpila restrikčními enzymy. Restrikční reakce pro fragment DNA obsahovala 58 $\mu$ l



sterilní destilované vody, 30 $\mu$ l DNA, 10 $\mu$ l restričního pufru, 1 $\mu$ l restriktázy A (10u/ $\mu$ l), 1 $\mu$ l restriktázy B (10u/ $\mu$ l) (Fermentas). Vektor byl štěpen v 40 $\mu$ l sterilní destilované vody, 5 $\mu$ l plazmidové DNA, 4 $\mu$ l restričního pufru, 0,5 $\mu$ l restriktázy A (10u/ $\mu$ l), 0,5 $\mu$ l restriktázy B (10u/ $\mu$ l) (Fermentas, použité restriktázy a pufrы v kapitole Výsledky). Obě reakce jsem inkubovala přes noc při 37°C. Následně jsem restriktázy inaktivovala zahřátím na teplotu uvedenou výrobcem restriktáz (Fermentas) po danou dobu v termobločku BioSan CH-100.

#### 4.7.3 LIGACE

Štěpený inzert jsem ze směsi přečišťovala přes High Pure PCR Cleanup Micro Kit (Roche, viz 4.7.2), použila jsem 400 $\mu$ l Binding Buffer a eluovala do 12 $\mu$ l. Poštěpený plazmid jsem rozdělvala od větších částí na elektroforetickém gelu (viz 4.6). Z gelu jsem pod UV lampou sterilním skalpelem vyřízla odpovídající proužek DNA a vyizolovala jsem ji s použitím MinElute Gel Extraction Kit (QUIAGEN). Vzorek jsem eluovala do 10 $\mu$ l. Množství DNA v obou vzorcích bylo ověřeno 1 $\mu$ l na gelu (viz 4.6). Dle toho poté byly optimalizovány poměry inzertu a vektoru v ligační reakci. V případě nižší koncentrace ligovaného inzertu oproti vektoru bylo do reakce dáno 9 $\mu$ l inzertu, 1,5 $\mu$ l vektoru, 0,5 $\mu$ l T4 ligázy, 2 $\mu$ l T4 DNA ligázového pufru a 7 $\mu$ l sterilní destilované vody.

Takto poštěpený a ověřený inzert a vektor jsem ligovala následovně. Směs obsahovala 5,5 $\mu$ l sterilní destilované vody, 2 $\mu$ l T4 DNA ligázového pufru s přidaným ATP (Fermentas), 0,5 $\mu$ l T4 ligázy (Fermentas nebo Takara), 8 $\mu$ l inzertu a 4 $\mu$ l vektoru. Reakci jsem nechala probíhat 1 hod. ve 20°C a pak přes noc ve 14°C. Následující den byla ligace ukončena zahřátím na 65°C po 10 minut na termobloku BioSan CH-100.

V případě zasolení ligační směsi jsem používala metodu odsolovacích jamek (Atrazhev and Elliott, 1996).

#### 4.7.4 ELEKTROPORACE

Do dobře vychlazené elektroporační kyvety jsem vnesla směs kmenu *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  smíchaného s 2 $\mu$ l konstrukt (plazmidu). Kyvetu jsem vložila do elektroporátoru Gene Pulser Xcell Electroporation System (Bio-Rad) a pod napětím 2,5kV +5ms jsem bakterie naporovala. K bakteriím jsem přidala 500 $\mu$ l sterilního MPB (Ames et al., 1999; Postgate, 1963) a nechala třepat 1 hodinu při 37°C na třepače GFL 3032 (GFL, 180 ot./min.). Sterilně ve flow-boxu ALPINA jsem vysela bakterie na Petriho misky s živnou půdou MPA (v 11 média: 23g živného agaru č.1 od firmy Imuna<sup>®</sup> Pharm, a.s., 10g NaCl, doplněno do 1l sterilní destilovanou vodou), obsahujícího antibiotikum, jehož resistenci obsahuje plazmid. Koncentrace používaných antibiotik byly následující: ampicilin 100mg/ml,

gentamycin 25mg/ml, chloramfenikol 34mg/ml, kanamycin 50mg/ml, rifampicin 15mg/ml a spectinomycin 50mg/ml. Kultury byly přes noc pěstovány při 37°C v termostatu Q-CELL a následně uskladněny pro další práci v lednici.

Do elektroporační směsi s *Escherichia coli* BL21 bylo vnášeno 0,2μl expresního konstruktů. Dále jsem postupovala jako v předešlém případě.

Při elektroporaci *Agrobacterium tumefaciens* bylo do směsi přidáváno pouze 0,2μl vnášeného konstruktů. Po elektroporaci byly bakterie s přidáním sterilním MPB (Ames et al., 1999; Postgate, 1963) ponechány 2 hod. při pokojové teplotě na třepačce GFL 3005 (180ot./ min.). Pak jsem je sterilně vysela na Petriho misku s MPA médiem s antibiotiky a ponechala 48 hodin růst při pokojové teplotě. Poté byly uchovány v lednici.

## 4.8 PLAZMIDY

### 4.8.1 KLONOVACÍ VEKTORY

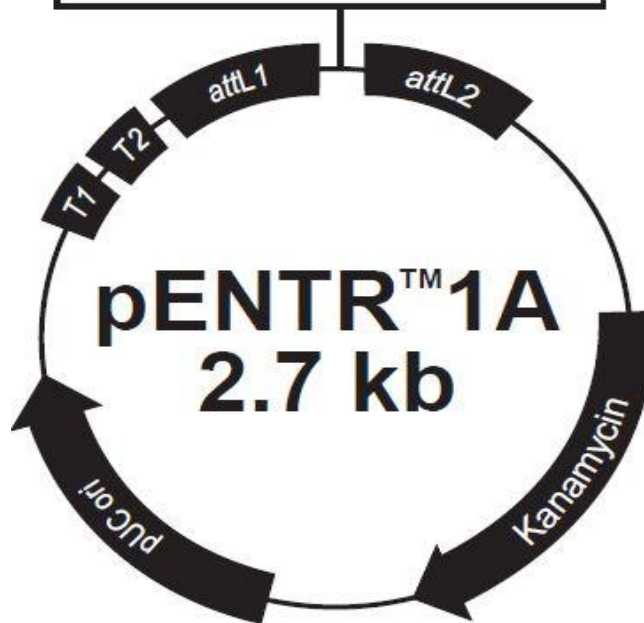
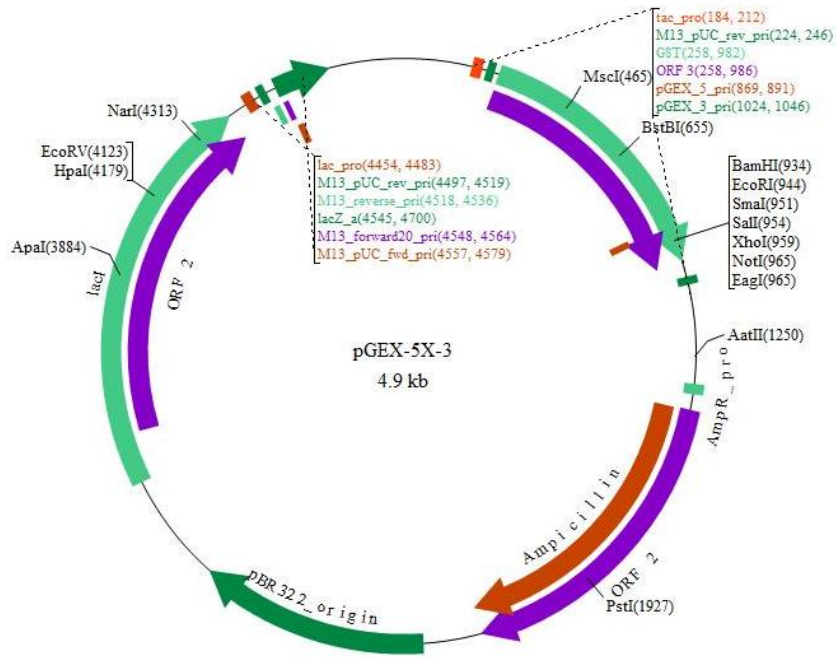
Do navrhovaných primerů byla uměle vnášena restriční místa tak, aby bylo možné přes tato místa daný inzert (zde konkrétně PTEN doménu forminu 14 nebo celý formin 13) vložit do poštěpeného vektoru. V našem případě byl jako vektor vybrán plazmid pENTR<sup>TM</sup>1A (sbírkové označení FD349, Invitrogen<sup>TM</sup>).

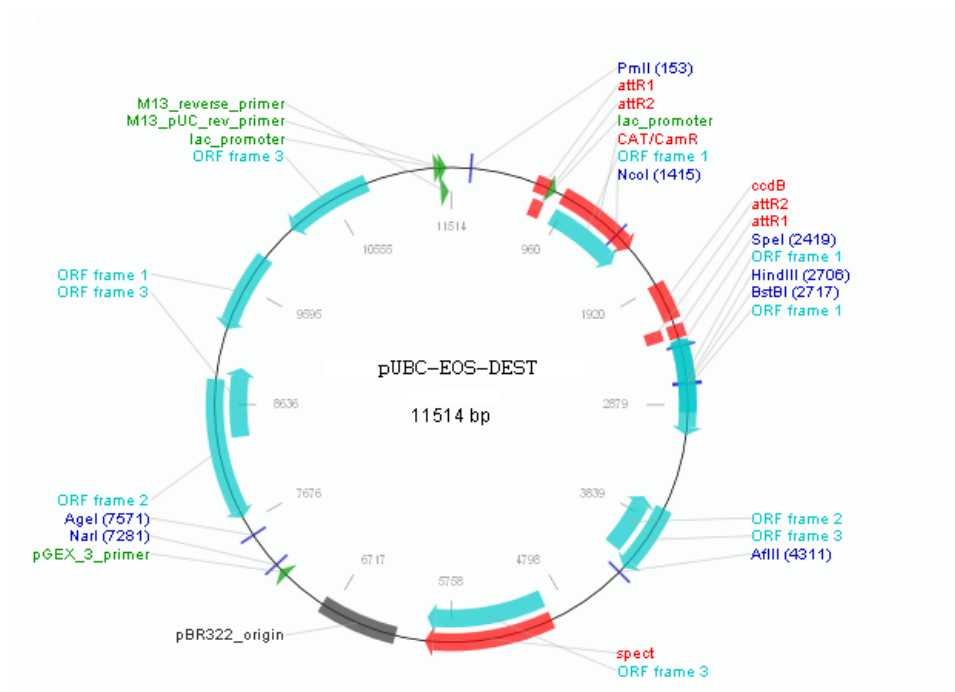
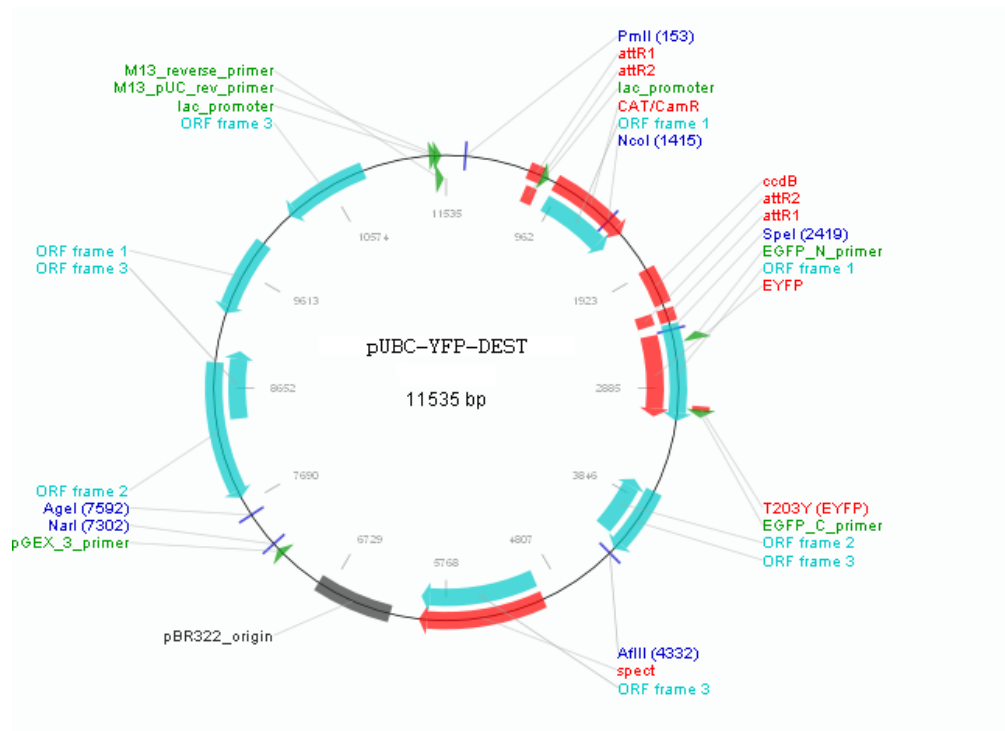
Pro značení klonovaného fragmentu proteinem YFP (Yellow Fluorescent Protein) byl použit pUBC-YFP-DEST (sbírkové označení FD390, Invitrogen<sup>TM</sup>). Pro označení pomocí EOS (Nienhaus et al., 2006) byl použit plazmid pUBC-EOS-DEST (sbírkové označení FD382, Invitrogen<sup>TM</sup>).

V návaznosti na diplomovou práci Mgr. Sylvie Přerostové jsem pracovala také s expresním konstruktem pGEX5x-3 (sbírkové označení FD343, Amersham Biosciences Corp.).

Jako negativní kontrola při tranzientní expresi inzertu značeného YFP byl použit plazmid pro expresi fimbrinu značeného GFP (Green Fluorescent Protein) s konstitutivním promotorem 35S (sbírkové označení FD301) a kanamycinovou rezistencí (celk. c=50mM).

Používané plazmidy, jejich mapy, struktura a rezistence jsou uvedeny na **obr. 4.**





**Obr. 4:** Mapy použitých plazmidů. pGEX-5x-3 plazmid pro exprese proteinů s ampicilinovou rezistencí (celková koncentrace 100mM), pENTR<sup>TM</sup>1a s ccdB klonovací kazetou a kanamycinovou rezistencí (celková koncentrace 50mM), pUBC-YFP-DEST a pUBC-EOS-DEST s rezistencí na spectinomycin (celková koncentrace 50mM).

#### 4.8.2 IZOLACE PLAZMIDOVÉ DNA

Kolonie bakterií s vneseným plazmidem jsem v předvečer ukončení práce přeočkovala do 2ml sterilního MPB (Ames et al., 1999; Postgate, 1963) média s příslušným antibiotikem a přes noc jsem je nechala vyrůst na třepačce GFL 3032 (180 ot./min.) při 37°C. Druhý den jsem narostlé bakterie zcentrifugovala 2 min. při max. otáčkách centrifuze Eppendorf Microcentrifuge 5415R a dále jsem postupovala dle protokolu Engbrecht, Brent et al 2001. Používala jsem GTE roztok s přidanou RNázou A. K dosažení vyšší čistoty DNA jsem před promýváním peletky 70% etanolem zařadila následující mezikrok k odstranění RNA. Peletu s DNA jsem rozpustila v 40 $\mu$ l TE. Přidala jsem 40 $\mu$ l 5M LiCl, promíchala a nechala stát v -20°C 5 min. Suspenzi jsem zcentrifugovala na max. 5 min. a následně k odebranému supernatantu přidala 200 $\mu$ l 95% EtOH, zvortexovala a zcentrifugovala 3 min. na max. Dále jsem postupovala dle původního protokolu.

Správnost izolované DNA jsem ověřovala restrikcí (viz 4.7.2) a vyhodnocovala na gelu (viz 4.6).

#### 4.9 SEKVENOVÁNÍ

Koncentraci DNA sekvenovaného vzorku jsem vyhodnocovala v programu GeneTool (Syngene) na základě porovnání se známou koncentrací velikostního žebříčku GeneRuler<sup>TM</sup> DNA Ladder Mix (0,5 $\mu$ g/ $\mu$ l, Fermentas) nanášeného na gel (viz 4.6).

Sekvenační směs jsem namíchala z 1 $\mu$ l 3,2pmol sekvenačního primeru (**tab. 1**), x $\mu$ l sekvenované DNA v množství 5-10ng/100bp a doplnila sterilní destilovanou vodou do celk. objemu 14 $\mu$ l.

Sekvenování provedla servisní laboratoř Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy, která disponuje dvěma sekvenátory, čtyřkapilárním 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) a šestnáctikapilárním 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Pro sekvenační reakce byl použit kit firmy Applied Biosystems: BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (detaily sekvenování, reakčního cyklu a dalších úprav: <http://web.natur.cuni.cz/~seqlab/>).

Sekvence jsem zkontrolovala a vytvořila kontig vyexportováním sekvencí z BioEdit Sequence Alignment Editor v7.0.9.0 (Hall, 1999) a manuálním zpracováním dat v aplikaci MS Office Word 2007. Získanou kompletní sekvenci jsem porovnávala nástrojem TAIR BLAST2.2.8 se sekvencemi nacházejícími se v TAIR databázi (Rhee et al., 2003). Pro translaci byl použit nástroj Translate v programu SMS (Stothard, 2000).

## 4.10 GATEWAY® KLONOVÁNÍ

K vizualizaci klonovaného proteinu jsem využila translační fúzi s YFP a EOS proteiny. EOS protein patří mezi Photoactivatable fluorescent proteins (PAFPs), u kterých dochází k fotokonverzi a změně emisního spektra (Nienhaus et al., 2006). K získání takového konstruktů jsem využila technologii Gateway® Cloning Technology od Invitrogen™. LR reakce obsahovala 1-7μl donorového vektoru pENTR™1A (sbírkové označení FD349, Invitrogen™) v množství 50-150ng se zaklonovanou zkoumanou DNA, 1μl akceptorového vektoru pUBC-YFP-DEST (sbírkové označení FD390, Invitrogen™) nebo pUBC-EOS-DEST (sbírkové označení FD382) v množství 150ng/μl, do objemu 8μl jsem doplnila TE pufr (pH 8) a 2μl LR Clonase™II (Invitrogen). Směs jsem inkubovala při 25°C na termobloku BioSan CH-100 přes noc., poté jsem přidala 1μl proteinázy K a zahřála na 37°C na termobloku BioSan CH-100 10 min.

Výsledný konstrukt (0,2μl) byl naporován do bakterií *Escherichia coli DH5α* (viz 4.7.4) a vypěstované kolonie na médiu s antibiotikem byly pomnoženy (viz 4.8.2). Správnost izolované DNA jsem ověřovala restrikcí (viz 4.7.2) a vyhodnocovala na gelu (viz 4.6).

## 4.11 TRANSFORMACE ROSTLIN

### 4.11.1 TRANZIENTNÍ TRANSFORMACE *NICOTIANA BENTHAMIANA*

0,2μl konstruktů jsem porací (2,5kV, +-5ms) vnesla do bakterií *Agrobacterium tumefaciens GV3101*. Obdobně jsem naporovala také 0,2μl virového supresoru p19 posttranslačního silencingu (PTGS). Přidala jsem 500μl sterilního MPB média (Ames et al., 1999; Postgate, 1963) a nechala jsem je 1,5 hod. při pokojové teplotě vyrůst na třepačce GFL 3005 (GFL, 180ot./min.). Sterilně ve flow-boxu ALPINA jsem vysela bakterie na Petriho misky s živnou půdou MPA (v 1l média: 23g živného agaru č.1 od firmy Imuna®Pharm, a.s., 10g NaCl, doplněno do 1l sterilní destilovanou vodou) obsahující antibiotika 100mM kanamycin, 10mM gentamycin a 15mM rifampicin. Transformované bakterie jsem kultivovala 2-3 dny v termostatu Q-CELL při 28°C. Dále jsem postupovala dle návodu (Voinnet, Rivas et al. 2003).

Do infiltračního média (50mM MES, pH 5,6, 2mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5% glukóza) jsem přidávala acetosyringon (celková koncentrace 100μM) k aktivaci bakteriální exprese. Výsledná infiltrační směs obsahovala infiltrační médium a bakterie transformované konstruktem a p19. Pro kontrolu jsem infiltrovala také infiltrační směsí s p19 a s transformantními bakteriemi obsahující konstrukt fimbrin-GFP

s konstitutivním promotorem 35S (sbírkové označení FD301) a kanamycinovou rezistencí (celk. c=50mM).

Pomnožené bakterie jsem zcentrifugovala při 2200g v eppendorfci 5 min. na centrifuze Eppendorf Microcentrifuge 5415R. Peletu jsem promyla 1 ml infiltračního pufru stočila, odsála a resuspendovala bakterie v 0,5 ml pufru. Následně jsem změřila optickou denzitu při  $\lambda=600$  na denzitometru Biomate 5 ThermoSpectronic. Z výsledkové hodnoty jsem odvodila koncentraci bakterií a p19 tak, aby výsledná optická denzita v inokulu byla u bakterií s konstruktem 0,03 a p19 0,05.

Inokulum jsem infiltrovala injekční stříkačkou (bez jehly) opřením o spodní stranu listu mladého tabáku. Tabáky byly před samotnou infiltrací dobře zalévané a dobře osvětlené, aby byly průduchy plně otevřeny. Transformaci jsem vyhodnocovala na fluorescenčním mikroskopu (viz 4.12)

#### 4.11.2 STABILNÍ TRANSFORMACE ARABIDOPSIS THALIANA

Stabilní transformaci *Arabidopsis thaliana* jsem provedla dle protokolu Davis, Hall et al. 2009. *Agrobacterium tumefaciens* s vneseným konstruktem (viz 4.11.1) jsem pomnožila do 100ml LB media (Bertani, 1951). Kulturu jsem zcentrifugovala 15 min., 6200rpm, 4°C v centrifuze Universal 32R Hettrich. Supernatant jsem odlila a sediment bakterií jsem rozpustila v 5% sacharóze do objemu potřebného pro ponoření květenství. Přidala jsem Silwett L-77 do konečné koncentrace 0,04%. Do této suspence jsem na 3 min. ponořila květenství rostlin (zbavené šesulí a otevřených květů) *Arabidopsis thaliana* (cca. 6 týdenní). Následně jsem celé rostliny obalila igelitem a na noc uložila do tmy.

Rostliny jsem dopěstovala v kultivační místnosti: konstantně 20°C, vlhkost 40%, 16 hod. světlo/8 hod. tma, ozáření 100 $\mu$ mol/m<sup>2</sup>/s. Sklidila jsem semena generace T1, která jsem dva dny vernalizovala v lednici, poté jsem je vysela nesterilně na vyklávanou směs hlíny, písku a perlitu. Asi týdenní semenáčky jsem seletovala postřikem BASTA (250ng/ml) a postřik opakovala 4x s jednodenním odstupem.

Přeživší rostliny jsem přesadila do rašelinových pelet, dopěstovala v kultivační místnosti a sklídila semena generace T2, která jsem pro ověření stabilní transformace vysévala sterilně pro mikroskopické pozorování (viz 4.2.1, viz 4.12).

## 4.12 FLUORESCENČNÍ A KONFOKÁLNÍ MIKROSKOPIE

Spodní strany listů dva dny tranzientně transformovaných tabáků *Nicotiana benthamiana* a desetidenních semenáčků *Arabidopsis thaliana* T2 generace jsem

pozorovala ve fluorescenčním mikroskopu Nikon Eclipse 90i 60x/1,2 s použitím vodní imerze, kde jsem používala stringentní GFP filtr. Obraz jsem analyzovala v programu NIS-Elements advanced research 3.2 64-bit. Vzorky jsem také pozorovala na konfokálním mikroskopu Leica TCS SP2 (objektiv 60x vodní imerze) s AOBS (Acousto-Optical Beam Splitter) vybaveného 12-ti bitovou monochromatickou CCD kamerou Hamamatsu ORCA C4742-80-12AG. Pro pozorování GFP byla nastavena excitace  $\lambda_{488\text{nm}}$  a emise  $\lambda_{509\text{nm}}$ , pro YFP excitace  $\lambda_{514\text{nm}}$  a emise  $\lambda_{527\text{nm}}$ , pro RFP excitace  $\lambda_{557\text{nm}}$  a emise  $\lambda_{585\text{nm}}$  s mezikrokem řezu 0,7  $\mu\text{m}$ . Obraz byl zpracováván na Leica confocal software a v programu Fiji Is Just ImageJA 1.45b.

## **4.13 EXPRESE A AFINITNÍ PURIFIKACE REKOMBINANTNÍHO PROTEINU V BAKTERIÍCH**

### *4.13.1 EXPRESE PROTEINU*

Bakterie *Escherichia coli* BL21codon(+) jsem napořovala konstrukty pGEX5x-3 (sbírkové označení FD343, Amersham Biosciences Corp.) se zaklonovanou DNA (0,2 $\mu\text{l}$ , viz 4.7.4). Kultury jsem napěstovala dle návodu GST Gene Fusion System (Amersham Biosciences Corp.) pro maloobjemové a velkoobjemové kultivace. Ke kultuře byl pro indukci exprese přidán IPTG (izopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galaktopyranosid) v celkové koncentraci 0,25mM a v případě malého objemu byla kultura kultivována při 37°C 2 hodiny na třepačce GFL3032 (GFL, 180ot./min.), velké objemy jsem kultivovala 5 hodin. Kultury jsem zcentrifugovala na centrifuze Universal 32R Hettrich na max. 30s. nebo na centrifuze Eppendorf Microcentrifuge 5415R a sediment resuspendovala v sonikačním pufru (sterilní PBS+1% Triton X-100). Suspenzi jsem lyzovala na sonikátoru Bandelin Electronic VW2070. Nadále, a při přípravě GST Sepharosy, vzorků pro gelovou elektroforézu, navázání proteinů na GST Sepharosu a uvolnění proteinu, jsem se držela návodu GST Gene Fusion System (Amersham Biosciences Corp.).

### *4.13.2 SDS-PAGE*

Vzorky odebrané z kultur (viz 4.13.1) pro ověření exprese proteinů jsem povařila 5 min. na termobloku BioSan CH-100 s 6x koncentrovaným vzorkovým pufrem s bromfenolovou modří (50mM Tris-Cl, pH6,8, 2% SDS, 10% glycerol, 1% b-merkaptioetanol, 12,5mM EDTA, 0.02% bromfenolová modř).



Gel na proteinovou elektroforézu byl připraven následovně:

- 1) Do skel na proteinovou elektroforézu byl nalit 10% dělicí gel a překryt butanolem:

1,67ml roztoku monomerů (60g akrylamidu, 1,6g bisakrylamidu doplněno do 200ml sterilní destilovanou vodou)  
1,25ml 1,5M Tris, pH 8,8  
2,1ml sterilní destilované vody  
20μl 10% amonumpersulfátu  
5μl TEMED (N,N,N,N-tetramethylethylendiamin, Sigma Aldrich®)

- 2) Po ztuhnutí gelu jsem vypláchla butanol sterilní destilovanou vodou a nalila jsem na dělicí gel zaostřovací gel, do kterého jsem zasunula hřebínek:

0,325ml roztoku monomerů (60g akrylamidu, 1,6g bisakrylamidu doplněno do 200ml sterilní destilovanou vodou)  
0,625ml 0,5M Tris, pH 6,8  
1,525ml sterilní destilované vody  
12,5μl 10% amonumpersulfátu  
2,5μl TEMED (N,N,N,N-tetramethylethylendiamin, Sigma Aldrich®)

- 3) Za 20 min. jsem si sestavila aparaturu na proteinovou elektroforézu, do které jsem upevnila připravený gel. Vaničku a gel jsem naplnila elektroforetickým pufrem (0,025M Tris, 0,192M glycin, 0,1% SDS). Jako velikostní žebříček jsem použila 2μl PageRuler™ (Fermentas) a naněla 15μl vzorku.

- 4) Elektroforéza probíhala za stálého chlazení na 40mA.

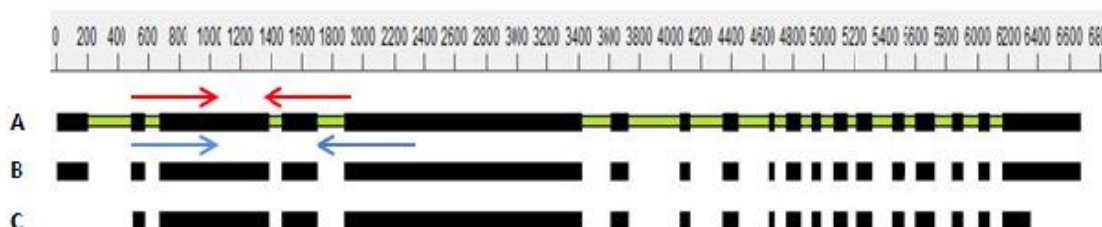
- 5) Po ukončení elektroforézy jsem gel přenesla do barvicího roztoku (0,25% Coomassie brilliant blue R-250, 10% kyselina octová, 45% metanol) a krátce několikrát povařila do obarvení gelu. Obarevný gel jsem poté přenesla do vaničky s vodou a vařila do odbarvení. Na úplné odbarvení jsem použila odbarvovací roztok (30% etanol, 10% kyselina octová), ve kterém jsem gel ponechala přes noc.

## 5. VÝSLEDKY

### 5.1 PTEN DOMÉNA AtFH14 A JEJÍ KLONOVÁNÍ

#### 5.1.1 BIOINFORMATICKÁ ANALÝZA AtFH14

Před započítím samotného klonování bylo nutné nejprve ve veřejných internetových databázích ověřit sekvenci genu. V internetové genomové databázi TAIR (*The Arabidopsis Information Resource* (Rhee et al., 2003; Swarbreck et al., 2008) a proteinové databázi UniProt (Jain et al., 2009) jsem našla informace o sekvenci forminu 14 (AtFH14 TAIR lokus At1g31810.1). Genomová sekvence byla dlouhá 6 653bp (s UTR) a obsahovala 17 intronů, cDNA 4 209bp a CDS 3 693bp. V proteinové databázi UniProt jsem pod označením Q9C6S1 (FH14\_ARATH) našla sekvenci proteinu dlouhou 1230 AA. Získaná data o genomové sekvenci, mRNA a ESTs (Expressed Sequence Tags) z TAIR jsem dále zpracovávala v programu MACAW v2.0.5 a ověřila tak konzistenci sekvence mRNA s genomovou sekvencí (**obr. 5**). Predikovanou sekvenci proteinu jsem pomocí nástroje reverzní translace v internetovém programu SMS převedla na cDNA a porovnávala se sekvencemi v databázi TAIR nástrojem TAIR BLAST 2.2.8. Nebyly nalezeny žádné sekvenční rozdíly mezi jednotlivými databázemi.



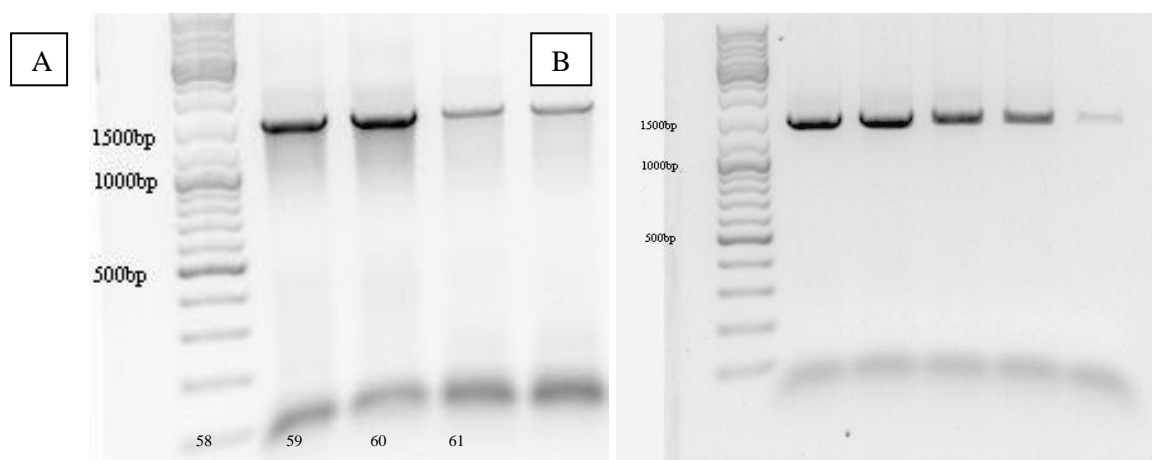
**Obr.5:** Výstup z programu MACAW v2.0.5 (Schuler et al., 1991). Stupnice označuje délku sekvence, černá barva značí kódující sekvenci, zelená označuje introny. Sekvence A je genomovou sekvencí AtFH14, B je mRNA sekvence AtFH14 a C je sekvence CDS AtFH14, která neobsahuje 5' a 3' UTR oblast. PTEN doména zde není vyobrazena, ale nachází se v místech odpovídajícím asi 500bp-1900bp genomové sekvence AtFH14. Červené šipky označují místa nasedání primerů na genomovou sekvenci (délka očekávaného produktu 1503bp) a modré šipky značí nasedání primerů na cDNA (délka očekávaného produktu 1423bp).

Hranice PTEN domény byly odvozeny na základě podobnosti s jinými PTEN doménami dle Grunt 2008 (Grunt et al., 2008). Predikovaná PTEN doména obsahuje tři introny.

### 5.1.2 IZOLACE PTEN DOMÉNY ATFH14

Vzhledem k délce predikované kódující sekvence *AtFH14* a přítomnosti mála použitelných restričních míst vůči klonovatelnému vektoru, bylo navrženo několik sad primerů. Díky nim by bylo možné naklonovat jednotlivé části (domény) *AtFH14* a ve výsledku je zaklonovat tak, aby vznikl celý funkční formin (viz **tabulka 1 a 2**). Sice se podařilo optimalizovat podmínky pro tyto primery na genomové DNA, nikdy se ale nepodařilo namnožit z cDNA (získaná od kolegů z laboratoře) či cDNA knihovny pACT větší množství DNA. Jedinými dobře fungujícími primery byly ty pro namnožení PTEN domény.

Pro pomnožení PTEN domény byly použity primery FH14head\_Kpn a FH14head\_Xho (viz **tabulka 1 a 2**). Forward primer FH14head\_Kpn byl navržen přes ATG start kodon, tedy i do 5'UTR oblasti, kde bylo také uměle vneseno restriční místo KpnI pro vektor s ohledem na čtecí rámec proteinu i akceptorového vektoru. ATG kodon byl v primeru zachován. Reverse primer FH14head\_Xho byl navržen downstream od stop kodonu a bylo do něj zaneseno XhoI restriční místo. Vzhledem k nepřítomnosti stop kodonu byl výsledný konstrukt vhodný pro C-koncové fúze. PTEN jsem namnožila pomocí PCR (viz 4.6, 4.7.2), templátem byla cDNA pACT knihovna ředěná 1:10 (**obr. 6A**).



**Obr. 6:** A: Pomnožení PTEN z cDNA s použitím primerů FH14head\_Kpn a FH14head\_Xho při teplotách annealingu uvedených pod jednotlivými vzorky. Amplifikovaná oblast s PTEN má velikost 1503bp. B: Pomnožená a následně reamplifikovaná PTEN z genomové DNA s použitím primerů PTEN-FH14 KPN\_FOR a FH14 XHO\_REV při teplotě annealingu 59°C. Jednotlivé vzorky jsou 50µl PCR reakce při 59°C rozdělené po 25µl. Amplifikovaná oblast s PTEN má velikost 1423bp. K porovnání velikosti byl použit žebříček GeneRuler™ DNA Ladder Mix (0,5µg/µl) od firmy Fermentas.

Z důvodů, které zmíním dále, jsem byla nucena navrhnout ještě jedny primery pro PTEN doménu. Tentokrát byly situovány na genomovou DNA. Primery PTEN-FH14 Kpn\_for (forward) a PTEN-FH14 Xho\_rev (reverse) (viz

**tabulka 1 a 2)** byly navrženy na okraje predikované PTEN obdobně jako u předešlých primerů. PTEN byla namnožena z genomové DNA (viz 4.6, 4.7.2) (**obr. 6B**).

### 5.1.3 KLONOVÁNÍ PTEN DOMÉNY ATFH14

Fragment pomnožený primery FH14head\_Kpn a FH14head\_Xho byl štěpen restriktázami KpnI (restrikční štěpení v místě GGTAC´C) a XhoI (restrikční štěpení v místě C´TCGAG) (viz **tabulka 1**) v BamHI pufru. Stejnými enzymy byl poštěpen i vektor pENTR<sup>TM</sup>1A (sbírkové označení FD349, Invitrogen<sup>TM</sup>) (viz 4.7.2). Vektor i inzert byly přečištěny, ligovány a porovány do bakterií (viz 4.7.3 a 4.7.4). Vzhledem k nízké koncentraci ligovaného inzertu byla ligační směs upravena (viz 4.7.3). Porované bakterie byly vysety na MPA média s kanamycinem.

Z narostlých kolonií jsem vybrala 20. Ty jsem pomnožila (viz 4.8.2) a ověřila restrikcí pomocí BamHI (G´GATTC) a XhoI (C´TCGAG) v BamHI pufru (viz 4.7.2). Správné velikosti hledaného plazmidu s vnesenou sekvencí odpovídaly 4 vzorky. Ty jsem připravila pro sekvenaci (viz 4.9). Tedy jsem nechávala sekvenovat v servisní laboratoři 8 vzorků, protože jsem sekvenci sekvenovala z obou směrů, čili dvěma sekvenačními primery (**tabulka 1**).

Z dopředného a zpětného sekvenování jsem vytvořila kontig, který jsem porovnávala pomocí funkce TAIR BLAST 2.2.3 se sekvencemi v databázi TAIR. V každé sekvenci jsem objevila jednonukleotidovou záměnu vedoucí k záměnám aminokyselin. Tyto substituce by ale mohly být artefaktem PCR nebo klonování a proto jsem otestovala ještě další plazmidy z nově naporovaných kolonií. Nechala jsem sekvenovat dalších 5. Zde byly mutace ještě více zastoupeny a to nejen záměnami nukleotidů, ale také několika adicemi, které způsobily posun čtecího rámce. Tato sekvence po translaci nedávala od místa posunu smysl. Jedna ze sekvencí obsahovala také rozsáhlou delecí, která by mohla být alternativní sestřihovou variantou proteinu. Translace ale poukázala pouze na fakt, že se jednalo o další nesmyslnou mutaci.

Mutace mohly vzniknout při RT PCR, buď v průběhu reverzní transkripce nebo v důsledku použití polymerázy DreamTaq<sup>TM</sup> od firmy Fermentas, která je optimalizovaná na výkonnost, nikoli na přesnost.

S použitím primerů PTEN-FH14 Kpn\_for a PTEN-FH14 Xho\_rev jsem z genomové DNA namnožila fragment polymerázou Phusion<sup>®</sup> High-Fidelity. Postup přípravy plazmidu s vnesenou sekvencí byl prakticky totožný jako u přípravy konstruktů zmíněného výše v této kapitole. Ligační reakce byla provedena dle původního protokolu (viz 4.7.3).

Bylo sekvenováno 5 vzorků (10 sekvenačních reakcí). Všechny sekvence po zkompletování odpovídaly sekvenčně sekvenci v databázi TAIR.

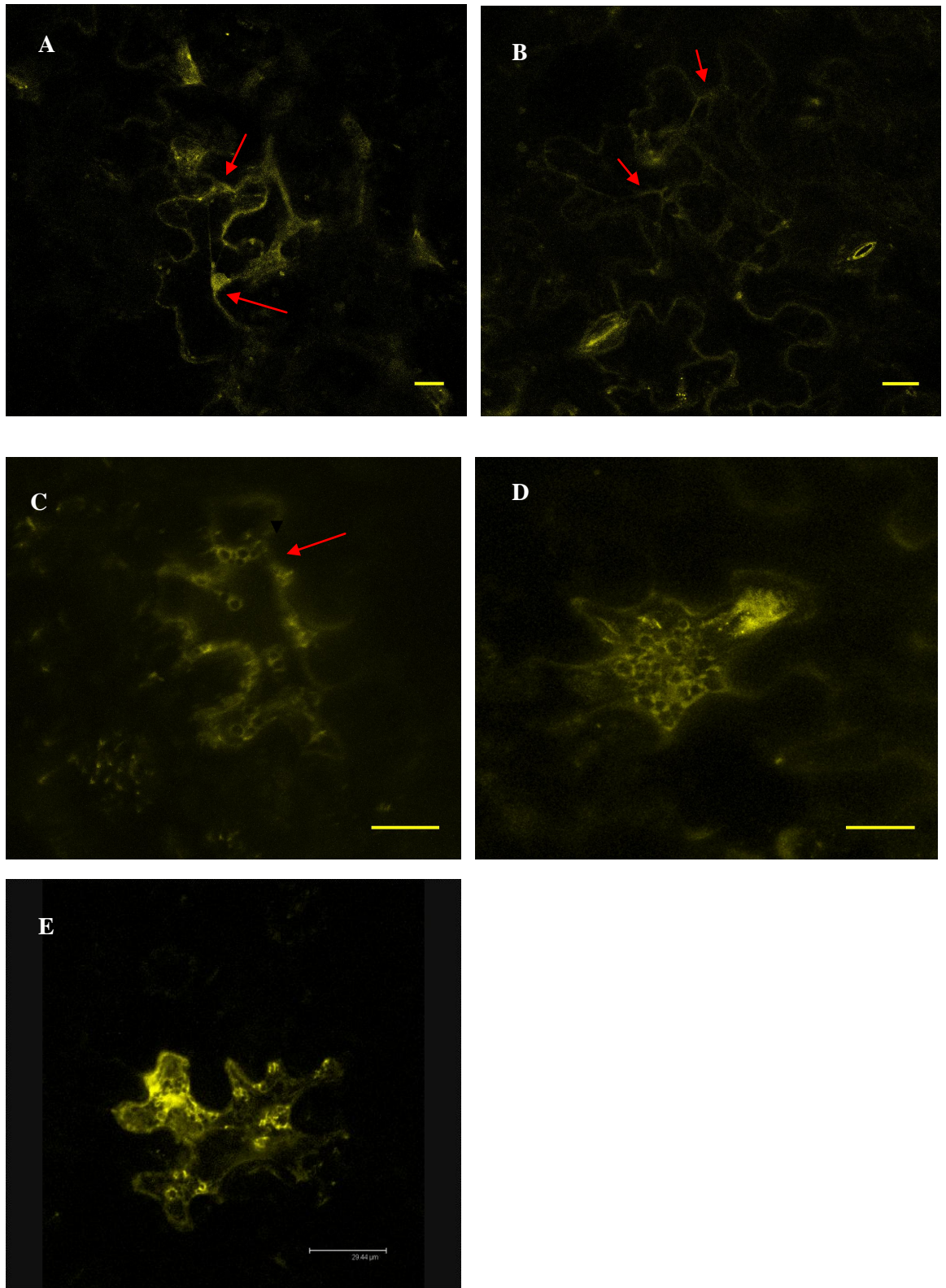
#### 5.1.4 LOKALIZACE PTEN DOMÉNY ATFH14 V LISTECH TABÁKU-TRANZIENTNĚ

Pro pozorování lokalizace PTEN domény v buňkách tabáku *Nicotiana benthamiana* jsem doménu překlonovala z pENTR<sup>TM</sup>1A do vektorů obsahujících YFP a EOS pomocí Gateway<sup>®</sup>LR reakce (viz 4.10). Použila jsem pUBC-YFP-DEST nebo pUBC-EOS-DEST vektory s ubikvitinovým promotorem pro silnou a konstitutivní expresi proteinu, který je narozdíl od 35S promotoru rostlinného původu a je méně náchylný k umlčování. PTEN je značena C-koncovou translační fúzí s YFP či EOS.

Tyto dva konstrukty, dále fimbrin-GFP s konstitutivním promotorem 35S (sbírkové označení FD301) a p19 konstrukty jsem elektroporací vnesla do *Agrobacterium tumefaciens GV3101* (viz 4.11.1). Pomnoženými bakteriemi jsem transformovala rostliny tabáku (viz 4.11.1). Pozorování bylo provedeno na fluorescenčním a konfokálním mikroskopu (viz 4.11.2).

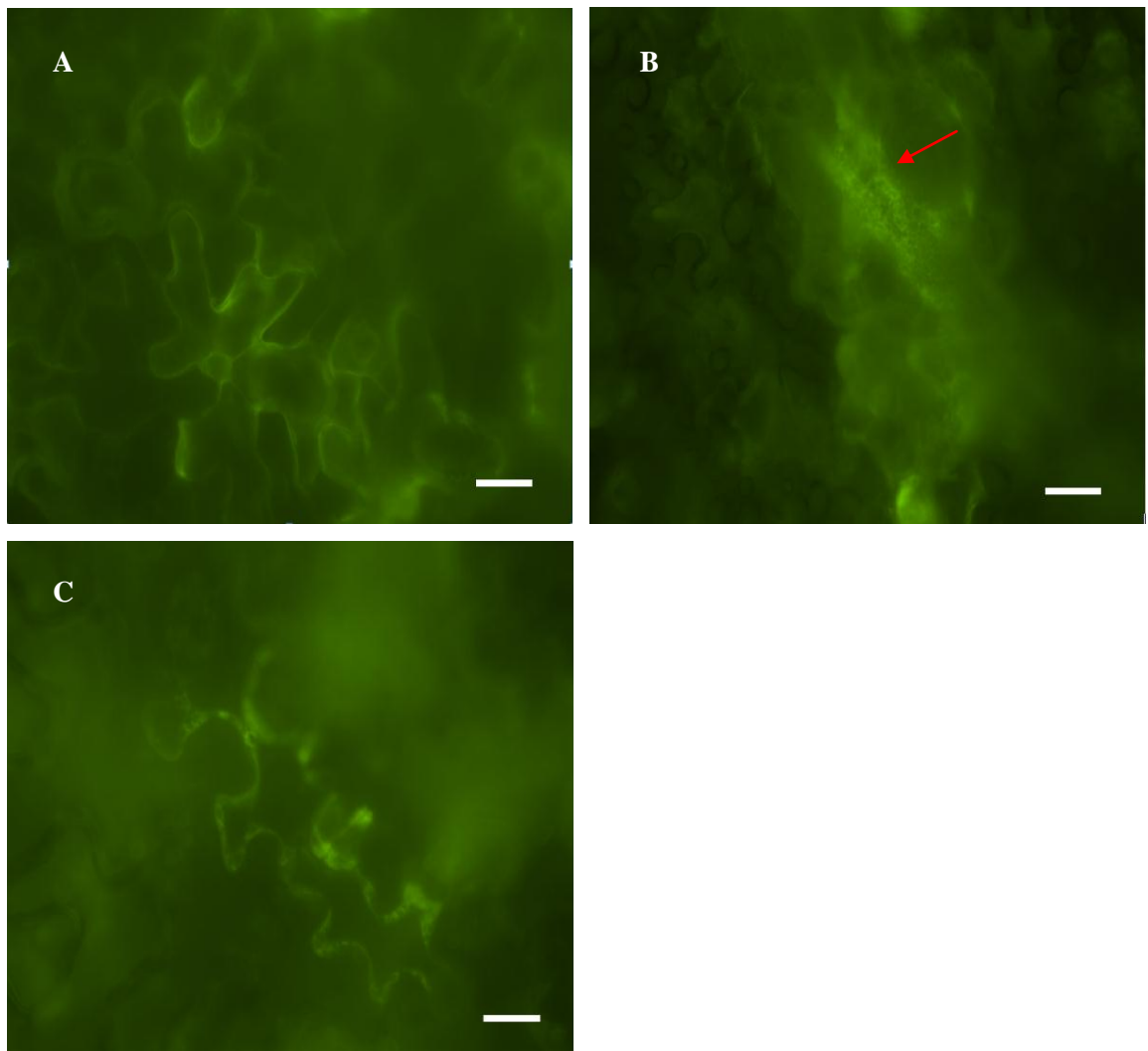
Na **obrázku 7** jsou fotografie pořízené z konfokálního mikroskopu, které zachycují pokožkové buňky listů *Nicotiana benthamiana*. Byly pozorovány buňky transformované pomocí YFP, které bylo fúzované s PTEN doménou AtFH14. Na **obrázku 8** jsou fotografie pořízené z fluorescenčního mikroskopu. Jako kontrola úspěšné transformace byl použit tabák transformovaný konstruktem fimbrin-GFP (obr. 8A).

Značená PTEN doména byla lokalizována v kortikální cytoplazmě a pravděpodobně v cytoplazmatických provazcích, jak je tomu na snímcích 7A a 7B. Byla také pozorována v okolí jádra (obr. 7A, červená šipka). V několika případech byly pozorovány “měchýřkovité” útvary, někdy i v celé buňce, a pravděpodobně odpovídají periférii organel membránového původu, kolem kterých bylo velké množství značeného PTEN (obr. 7C, 7D, 7E, 8B, 8C). Někdy byly tyto útvary nahloucheny v kortikální vrstvě buňky (obr. 8C). Lokalizace PTEN byla u obou pozorování, jak na fluorescenčním tak konfokálním mikroskopu, konzistentní.



**Obr. 7:** Fotografie spodní pokožky tranzientně transformovaných listů *Nicotiana benthamiana*. Fotografie pořízeny na konfokálním mikroskopu. Neoznačené měřítko má velikost 20 $\mu$ m. Šipky označují: A-jádro, cytoplazmatické provazce; B-cytoplazmatické provazce; C, D, E-„měchýřkovité“ struktury.





**Obr. 8:** Fotografie spodní pokožky tranzientně transformovaných listů *Nicotiana benthamiana*. Fotografie pořízeny na fluorescenčním mikroskopu. Na obr. A- kontrolní GFP-fimbrin, ostatní PTEN fúzovaná s YFP. Neoznačené měřítko má velikost 20 $\mu$ m. Šipky označují: B- „měchýřkovité“ struktury pravděpodobně membránového původu.

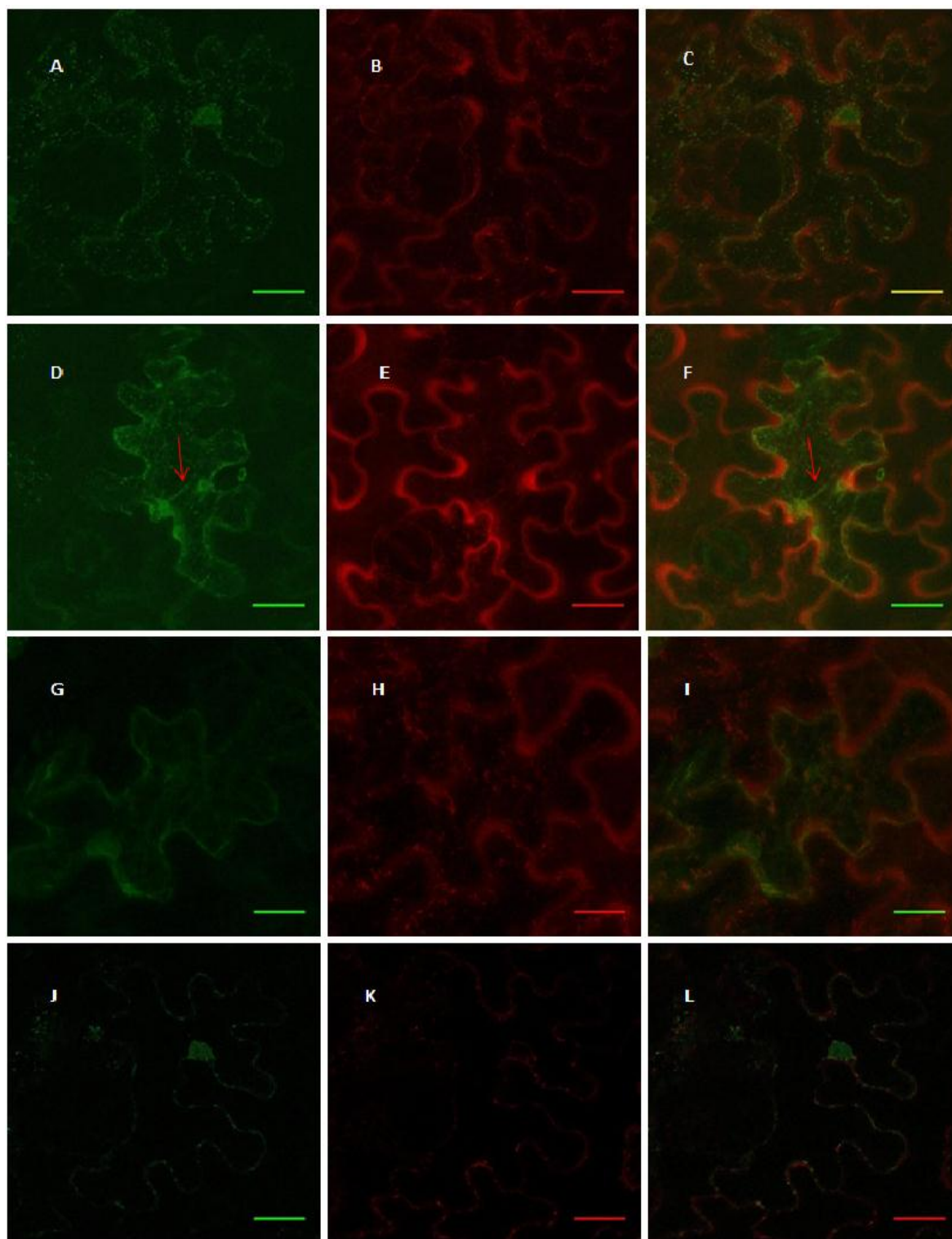
#### 5.1.5 KOLOKALIZACE PTEN DOMÉNY AtFH14 S GOLGIHO APARÁTEM V LISTECH TABÁKU-TRANZIENTNĚ

Pro pozorování kolokalizace PTEN domény AtFH14 s Golgiho aparátem jsem použila metodu tranzientní transformace listů *Nicotiana benthamiana*. Postup byl stejný jako v předešlé kapitole, pouze jsem neinfiltrovala dvěma konstrukty PTEN-YFP/PTEN-EOS a p19, ale také bakteriálním klonem, který obsahoval sialyl transferázu-RFP jako marker Golgiho aparátu. Buňky byly pozorovány na konfokálním mikroskopu ve dvou odlišných kanálech tak, aby bylo možné zároveň pozorovat jak YFP tak RFP. Takto získaná data a fotografie jsem zpracovala v programu Fiji.

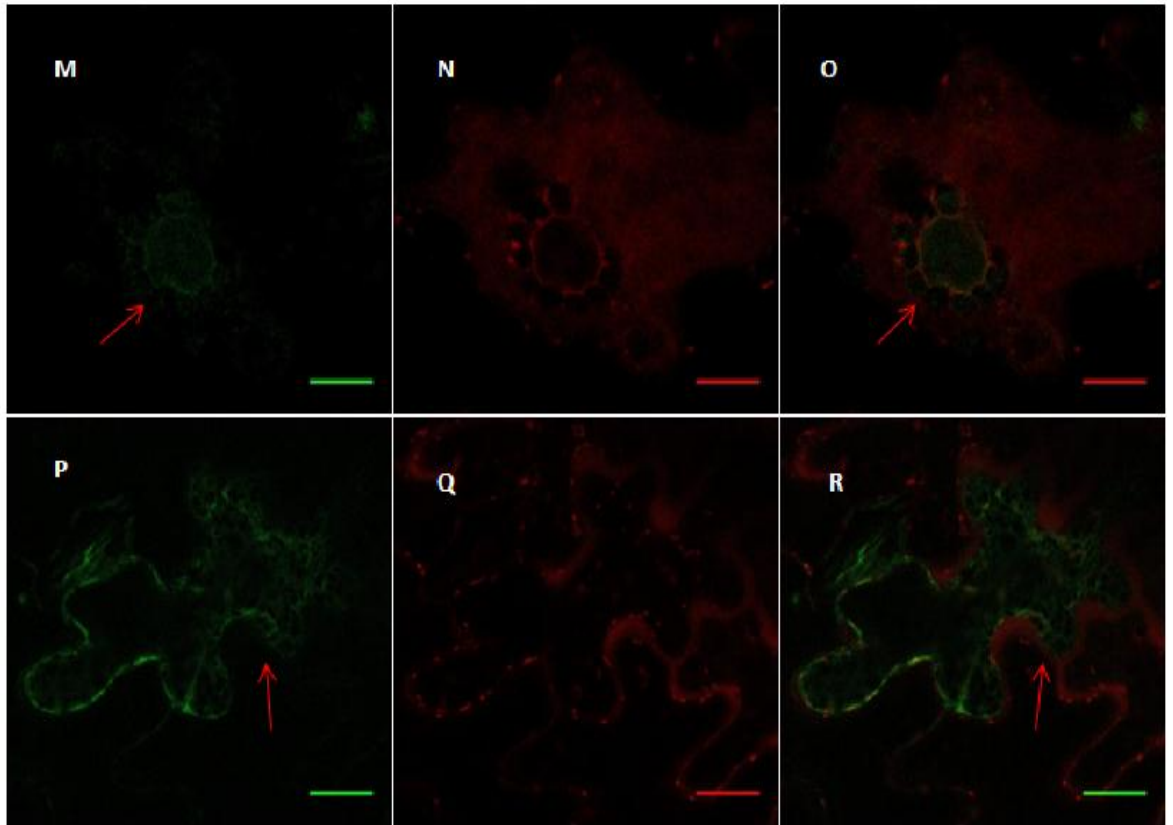
Na **obrázku 9 a 10** je vidět výsledek tohoto pozorování. Na základě propojených dat obou spektrálních kanálů (pravý sloupek) je možné říci, že PTEN doména AtFH14 nekolokalizuje s Golgiho aparátem. Některé kolokalizace pozorovány byly, ale je pravděpodobné, že se jednalo o náhodný jev. Na fotografii 9C jsou vidět shluky (tečky) PTEN-YFP, které byly hojně pozorovány i u stabilně transformovaných *Arabidopsis thaliana* (viz dále). Mohlo by se jednat o vázaný protein na membrány některých organel. Byly také opět pozorovány obdobné jevy, které naznačují, že PTEN-YFP je lokalizován v cytoplazmě, konkrétně na obr. 9F v cytoplazmatických provazcích. Zde kolokalizoval i Golgiho aparát. Fotografie 9I by mohla naznačovat, že by se mohlo jednat také o asociaci nebo spíše zprostředkovanou asociaci s cytoskeletem. Ve všech pozorovaných buňkách PTEN lokalizovala do míst jádra, je možné, že se váže do jaderné membrány nebo do membránových struktur v jeho těsné blízkosti. Na obrázku O a R jsou jasně viditelné membránové útvary rozložené v buňce, ale také v blízkosti jádra. Může se tedy opravdu jednat o organely poblíž jádra, které vážou PTEN.

Vzhledem k tomu, že Golgiho aparát a některé membránové organely jsou velmi pohyblivé, pokusila jsem se zaznamenat jeho pohyb a zároveň pohyb pozorovaných shluků (teček). To lze pomocí fotografií, které jsou pořízeny konfokálním mikroskopem v krátkém časovém intervalu za sebou. Na **obrázku 11** je záznam těchto fotografií, které jsou pořízeny cca. 3 s po sobě. Pohyb Golgiho aparátu je zřetelný. K mému překvapení byl ale i pohyb “teček” velmi dynamický. Po důkladnějším prozkoumání by se mohlo zdát, že některé “tečky” putují za Golgiho aparátem. To by mohlo naznačovat, že by se mohla PTEN vázat například do trans-Golgi, který je asociován pouze s některými Golgiho cisternami. Toto tvrzení by ale potřebovalo důkladnější prozkoumání.

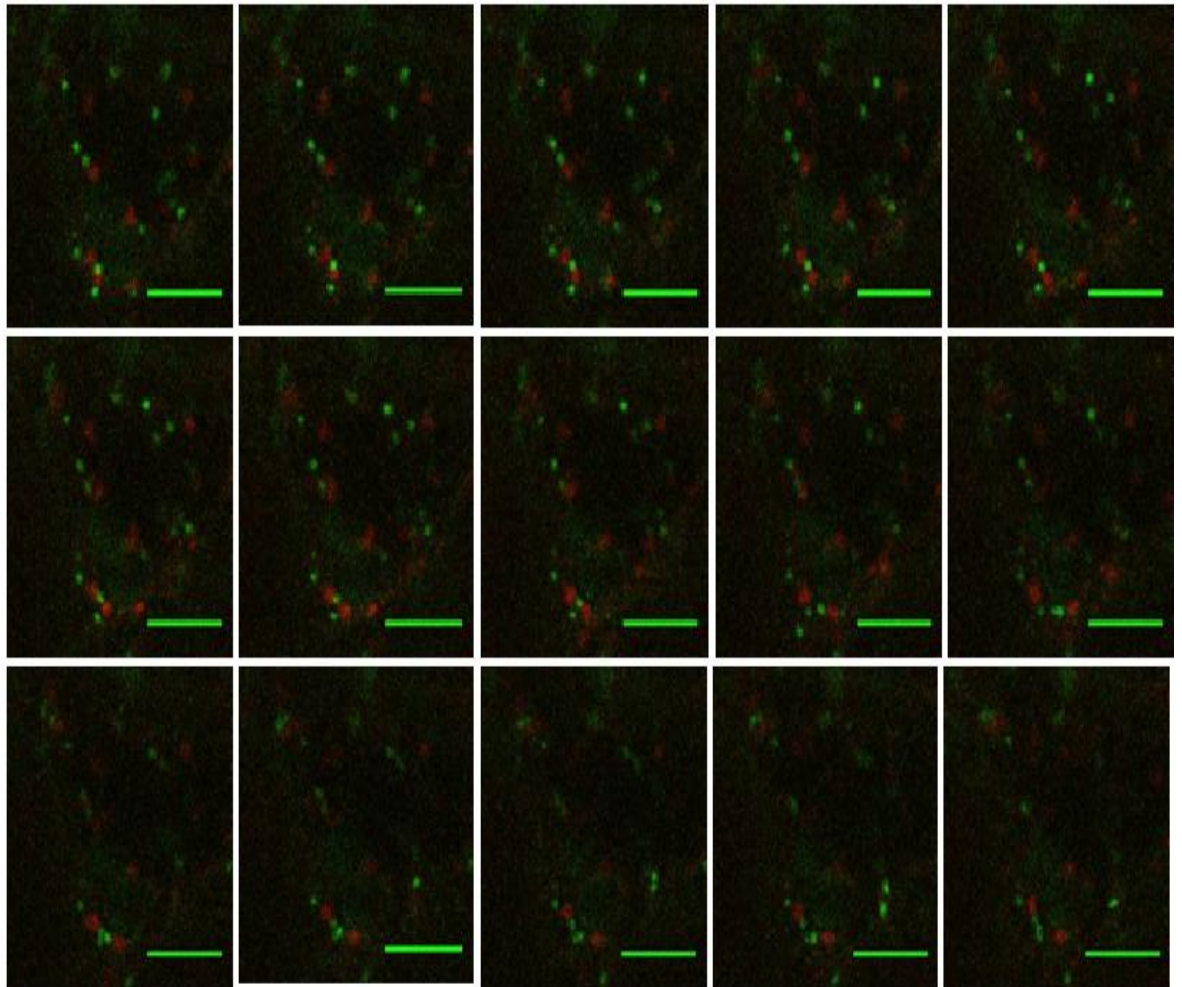




**Obr. 9:** Kolokalizace Golgiho aparátu a PTEN domény AtFH14 v tranzientně transformovaných pokožkových buňkách listů *Nicotiana benthamiana*. Fotografie byly pořízeny na konfokálním mikroskopu. Levý sloupec ukazuje pouze kanál s PTEN-YFP, prostřední sloupec pouze Golgi-RFP a pravý sloupec ukazuje spojení těchto dvou. Měřítka jsou 20 $\mu$ m. A-C: YFP “tečky” rozmístěné v celé buňce, YFP značené jádro. D-F: YFP “tečky”, navíc i přítomnost YFP v kortikální cytoplazmě a cytoplazmatických provazcích (označeno šipkou). G-I: YFP ve formě “vláken” a teček, možná také volně v cytoplasmě. J-L: YFP pouze v kortikální zóně buňky.



**Obr. 10:** Kolokalizace Golgiho aparátu a PTEN domény AtFH14 v tranzientně transformovaných pokožkových buňkách listů *Nicotiana benthamiana*. Fotografie byly pořízeny na konfokálním mikroskopu. Levý sloupec ukazuje pouze kanál s PTEN-YFP, prostřední sloupec pouze Golgi-RFP a pravý sloupec ukazuje spojení těchto dvou. Měřítko jsou 20 $\mu$ m. M-O: Měchýřkovité struktury okolo jádra (označeno šipkou) a jádro s YFP. P-R: Měchýřkovité struktury s YFP v celé buňce (označeno šipkou).

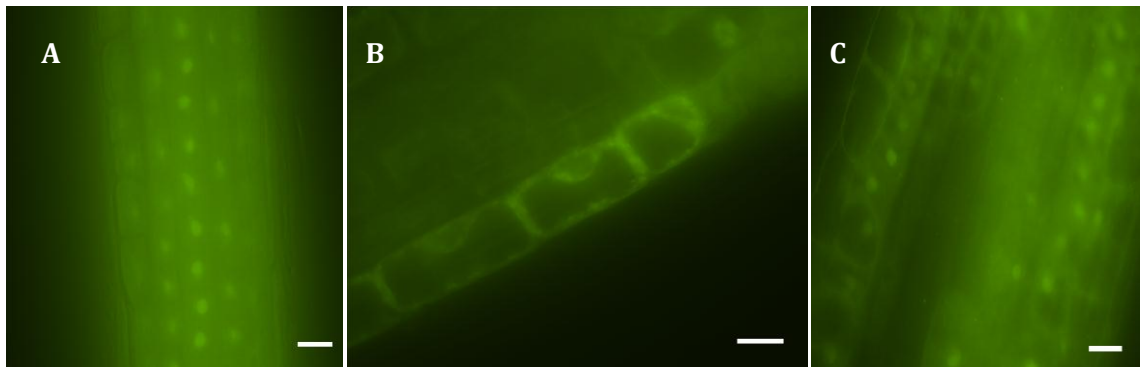


**Obr. 11:** Záznam fotografií tranzientně transformovaných pokožkových buněk listů *Nicotiana benthamiana*. Fotografie byly pořízeny v intervalu 3s na konfokálním mikroskopu. Tak jak jsou obrázky za sebou můžeme pozorovat pohyb PTEN-YFP „teček“ a červeně značeného Golgiho aparátu. Měřítko má velikost 10 $\mu$ m.

#### 5.1.6 LOKALIZACE PTEN DOMÉNY ATFH14 V ARABIDOPSIS THALIANA-STABILNĚ

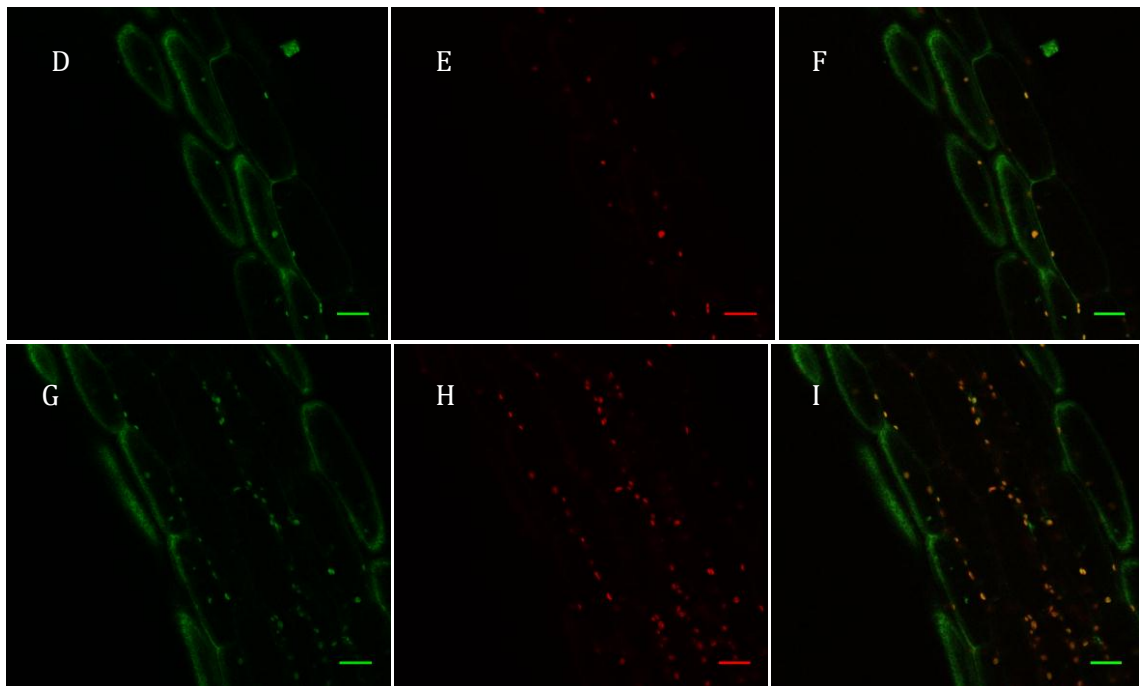
Pro stabilní transformaci *Arabidopsis thaliana* jsem namnožila transformovaná *Agrobacteria* s vektory pUBC-YFP-DEST nebo pUBC-EOS-DEST s vnesenou PTEN doménou. Touto suspenzí jsem transformovala asi 6 týdenní rostliny dle návodu (4.11.2). Následně jsem pozorovala rostliny T2 generace (7-10 denní) na fluorescenčním a konfokálním mikroskopu (viz 4.11.2).

Na **obrázku 12** jsou fotografie kořene stabilně transformované *Arabidopsis thaliana*. Ve fluorescenčním mikroskopu jsem pozorovala YFP značená jádra (12A, 12C) a YFP „tečky“ v kortikální cytoplazmě a okolo jádra (12B) v kořenové špičce a poblíž kořenové špičky.



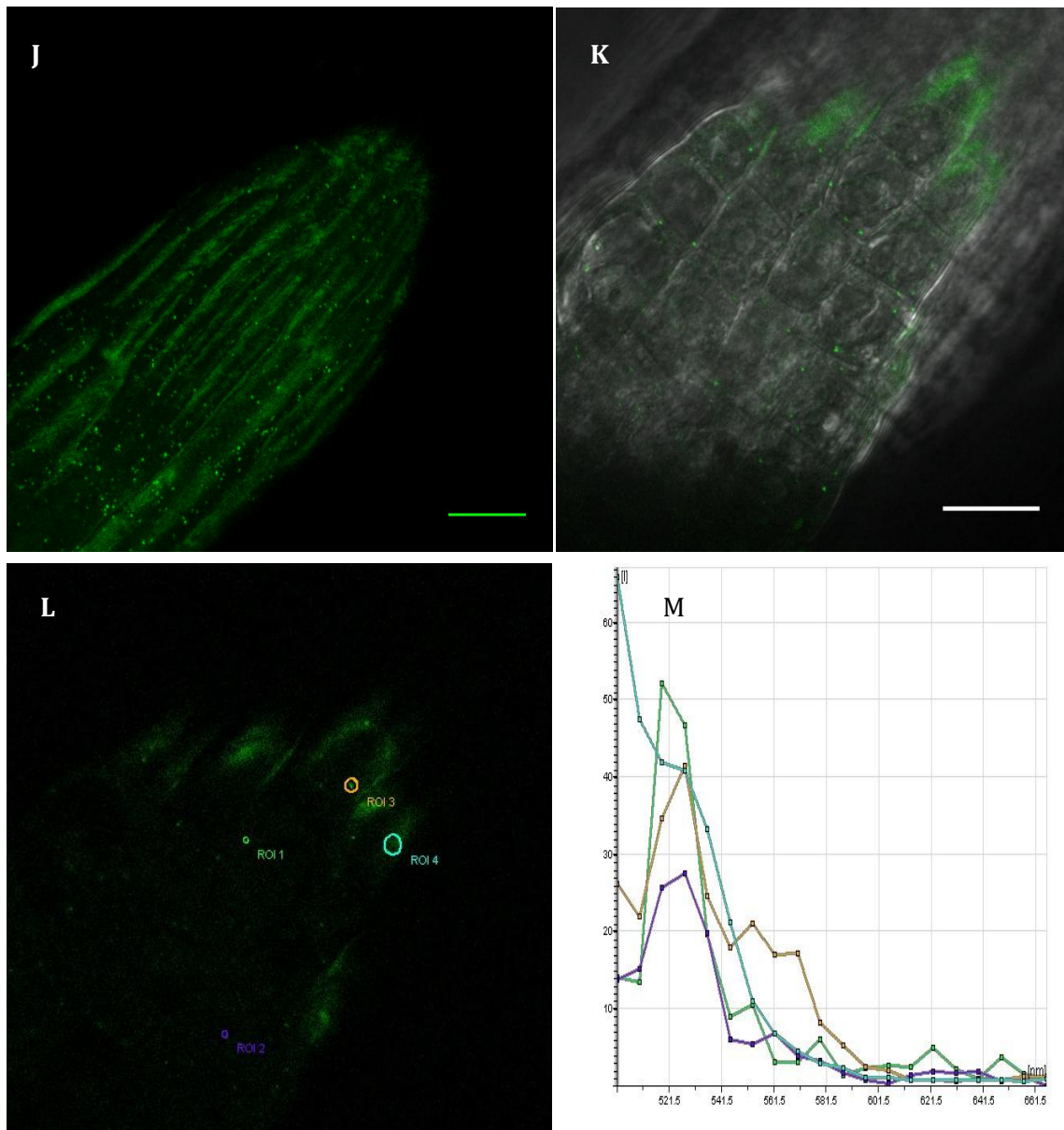
**Obr. 12:** Stabilně transformované rostliny *Arabidopsis thaliana* pozorované ve mikroskopu. Byly pozorovány kořenové buňky a buňky kořenové špičky. Měřítka má 20 $\mu$ m. A: jádra značená YFP, B: YFP tečky nebo YFP v kortikální cytoplazmě a kolem jádra, C: jádra (i dělicí) s YFP.

V konfokálním mikroskopu jsem také pozorovala hlavně kořenové špičky a prodlužovací zónu kořene (**obrázek 13 a 14**). S využitím fotokonverze EOS značené PTEN domény bylo možné pozorovat tečky, které značí PTEN (13D-I) v kořeni. V kořenové špičce byly hojně pozorovány tečky YFP (14J-K), jichž identitu jsem ověřovala pomocí lambda skenu (14L-M). Tečky byly opravdu YFP, tedy značené PTEN proteiny, které možná lokalizují do membránových organel.



**Obr. 13:** Stabilně transformované rostliny *Arabidopsis thaliana* pozorované v konfokálním mikroskopu. Byly pozorovány kořenové buňky. Měřítka má 20 $\mu$ m. D: EOS-PTEN před fotokonverzí, E: EOS-PTEN po fotokonverzi, F: spojení předešlých dvou kanálů, většina teček je protein PTEN-EOS, G: EOS-PTEN před fotokonverzí, H: EOS-PTEN po fotokonverzi, I: spojení předešlých dvou kanálů, žluté tečky odpovídají PTEN-EOS.





**Obr. 14:** Stabilně transformované rostliny *Arabidopsis thaliana* pozorované v konfokálním mikroskopu. Byly pozorovány buňky kořenové špičky. Měřítka má 20 $\mu$ m. J a K: PTEN-YFP tečky v kořenové špičce. U kořenové špičky z obr. J a K byl proveden lambda sken, kterým byla ověřena identita teček jako PTEN-YFP (L-M). Zkoumané tečky byly viditelné pouze ve spektru, které odpovídalo YFP.

## 5.2 ATFH13 A JEHO KLONOVÁNÍ

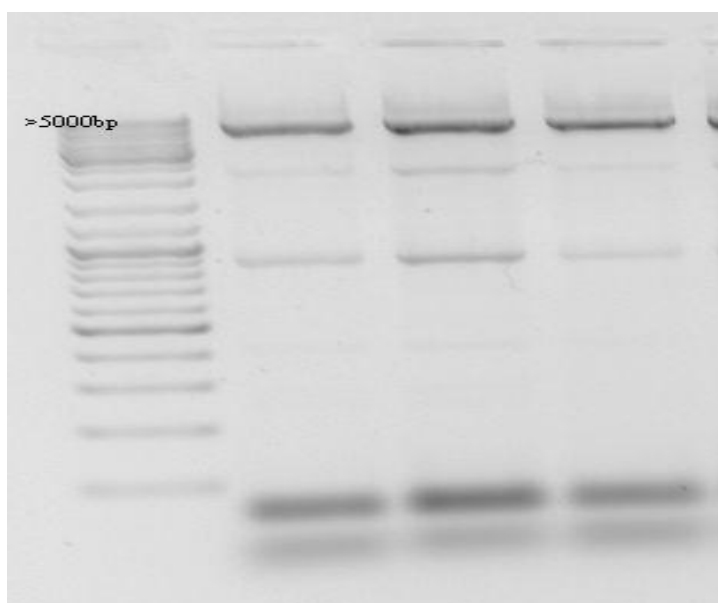
### 5.2.1 BIOINFORMATICKÁ ANALÝZA ATFH13

Formin AtFH13 byl již přede mnou podroben detailní bioinformatické analýze Mgr. Sylvou Přerostovou, která se tímto forminem zabývala blíže ve své diplomové práci (Přerostová, 2011). Stojí za zmínku, že objasnila nesrovnalosti

v sekvencích mezi databázemi TAIR a UniProt. Také se jí podařilo odhalit alternativní sestřih u PTEN domény AtFH13. Vzhledem k tomu, že jsem ve své podstatě pokračovala v tom, co Mgr. Sylva Přerostová započala, odkazuji na její práci a informace v ní obsažené.

### 5.2.2 IZOLACE *ATFH13*

K izolaci celého formínu AtFH13 jsem použila primery FH13PTEN\_TAIR (forward) a FH13full\_rev (reverse) navržené Mgr. Sylvou Přerostovou (viz tabulka 1 a 2). Přestože byly navrhovány na základě cDNA sekvence, ze které se *AtFH13* vyizolovat nepodařilo, shodou okolností se i s ohledem na restriční místa ve vektoru mohly použít na genomovou DNA. V reverzním primeru byl navíc odstraněn stop kodon, takže by pomnožený úsek mohl být použit na C-koncovou fúzi. *AtFH13* byl tedy namnožen z genomové DNA (viz 4.7.1 a 4.6) (**obr. 15**).



**Obr. 15** : Namnožený *AtFH13*. Jako templát byl použit 1 $\mu$ l genomové DNA. Jednotlivé vzorky představují 20 $\mu$ l PCR reakci, všechny se stejnými podmínkami. Predikovaná velikost PCR produktu je 5 765bp. Jako velikostní žebříček byl použit GeneRuler™ DNA Ladder Mix (0,5 $\mu$ g/ $\mu$ l) od Fermentas. Ostatní pomnožené úseky byly odstraněny nanesením celkové PCR reakce na gel a vyříznutím správného proužku z gelu. Nеспецифické nasedání primerů i na jiné části DNA se nepodařilo optimalizacemi odstranit.

### 5.2.3 KLONOVÁNÍ *ATFH13*

Fragment pomnožený primery FH13PTEN\_TAIR (forward) a FH13full\_rev (reverse) navržené Mgr. Sylvou Přerostovou (viz tabulka 1 a 2) byl izolován a přečištěn z gelu pomocí High Pure PCR Cleanup Micro Kit (Roche). Použito bylo

300µl binding buffer a 100µl binding enhancer, eluovala jsem do 15µl. Byl štěpen restriktázami KpnI (restrikční štěpení v místě GGTAC´C) a EagI (restrikční štěpení v místě C´GGCCG) (viz tabulka 1) v BamHI pufru. Stejnými enzymy byl poštěpen i vektor pENTR<sup>TM</sup>1A (viz 4.7.2). Vektor i inzert byly přečištěny, ligovány a porovány do bakterií (viz 4.7.3 a 4.7.4). Vzhledem k menšímu množství ligovaného inzertu byly upraveny poměry složek v ligační reakci (viz 4.7.3). Porované bakterie byly vysety na MPA média s kanamycinem.

Z narostlých kolonií jsem vybrala 24. Ty jsem pomnožila (viz 4.8.2) a ověřila restrikcí pomocí restriktázy BamHI (G´GATTC) v BamHI pufru, pro jistotu navíc restriktázou XhoI (C´TCGAG) v R pufru (viz 4.7.2). Správné velikosti hledaného plazmidu s vnesenou sekvencí odpovídal 1 vzorek. Z důvodů velikosti sekvenované oblasti jsem nechala sekvenovat pro jistotu pouze krajové sekvence (viz 4.9), které až na některé chyby v sekvenování, odpovídaly *AtFH13*. K tomu jsem použila primery:

FH13for1 (TGGCTGATGTCTTATCTGAA),  
FH13for2 (CCCAAGAAAGGGAAACAC),  
FH13for3 (GAGGTATGTACTCATGGAG),  
FH13for10 (TAGAAGGCTCATAGATTGTAG),  
FH13for11 (GCCCTTTTGAACAAGGTATG).

### 5.3 PTEN DOMÉNA *AtFH13*-STABILNÍ TRANSFORMACE

Konstrukty PTEN domény formínu 13 ve vektorech pUBC-YFP-DEST, kde dochází k translační fúzi s YFP, jsem získala z laboratorních sbírek. Dlouhá verze PTEN byla pod označením FD431 a krátká, pravděpodobně alternativní sestřihová varianta PTEN, pod označením FD432. Pro stabilní transformaci *Arabidopsis thaliana* jsem namnožila transformovaná *Agrobacteria* s vektory pUBC-YFP-DEST s vnesenou PTEN doménou. Touto suspenzí jsem transformovala rostliny dle návodu (4.11.2). Následně jsem pozorovala rostliny T2 generace (7-10 denní) na fluorescenčním a konfokálním mikroskopu (viz 4.11.2). Fotografie zde neuvádím, protože bylo provedeno pouze předběžné pozorování na dvou rostlinách (málo klíčících rostlin T2 generace), které se na první pohled nelišily od stabilně transformovaných rostlin PTEN-YFP a PTEN-EOS z *AtFH14*.

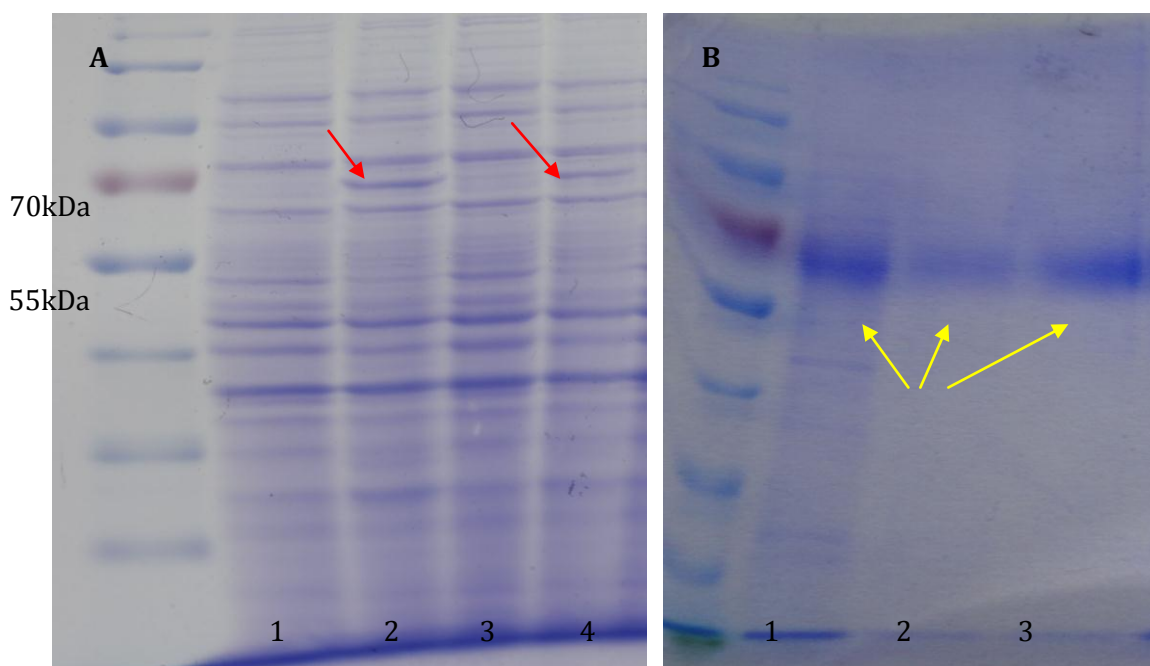
### 5.4 PRODUKCE PROTEINU PTEN (*AtFH13*) V BAKTERIÍCH

Konstrukty PTEN domény sfúzované s GST, připravené S. Přerostovou (Přerostová, 2011), jsem porovala do speciálních expresních kmenů, které neprodukují proteázy, *Escherichia coli* BL21 codon(+). Jednalo se o dva typy konstruktů uloženými pod FD433 a FD434 ve sbírkách. FD434 obsahuje kratší

verzi PTEN z AtFH13 (pravděpodobně alternativní sestřihová varianta) a FD434 obsahuje delší verzi PTEN z AtFH13 (Přerostová, 2011).

U namnožených bakterií jsem indukovala expresi přidáním IPTG (izopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galaktopyranozid, 1M, do celkové koncentrace 0,25mM). Proteiny byly z bakterií izolovány navázáním na GST-sefarózu.

Na základě aminokyselinové sekvence byla pomocí programu SMS (Stothard, 2000) spočítána velikost proteinů. Krátká verze se sefarózou má mít 71,77 kDa a dlouhá verze se sefarózou má mít 69,34 kDa. Samotná sefaróza má 26 kDa. Uvolnění proteinu pufrům se zdařilo pravděpodobně pouze jednou a to ve velmi malém množství, které nestačilo pro další práce. Při opakování postupu izolace proteinu pro velkoobjemové kultury se protein nepodařilo izolovat ani úpravami teploty a délkou času indukce exprese. Navíc i v opakovaných kontrolách samotné indukce exprese docházelo k rozličným výsledkům, které ale mohly být způsobeny poruchou termostatu na třepačce, která byla odstraněna až posléze. Na **obr. 16** je zdokumentováno, že k expresi proteinu opravdu docházelo.



**Obr. 16:** A-Ověření exprese proteinu v kmenu *Escherichia coli* před samotnou izolací proteinovou elektroforézou na polyakrylamidovém gelu. Jako žebříček byl použit PageRuler™ od Fermentas. V sloupku 1 a 3 je vzorek z bakteriálních kolonií FD434 bez indukce exprese. V sloupku 2 a 4 je vzorek odebraný ze stejných kolonií po přidání IPTG. Po indukci můžeme vidět tlustý fragment izolovaného proteinu odpovídající velikosti FD434 69,34kDa (vyznačeno červenou šipkou). Obdobně tomu bylo i u FD433 (zde neukázáno). B-Vyizolovaný protein FD434 odpovídající velikosti (vyznačen žlutou šipkou). B1 je první uvolnění proteinu z GST-sefarozy, B2 a B3 je opakované uvolnění proteinu z GST-sefarozy Další přítomné fragmenty poukazují na to, že se ze vzorku vyizolovaly i jiné proteiny.



## 6. DISKUZE

Tato práce je převážně věnována forminu *Arabidopsis thaliana* AtFH14 z II. třídy rostlinných forminů. Hlavním cílem práce bylo shrnout dosavadní poznatky o tomto forminu a o jeho PTEN doméně a naklonovat cDNA či genomovou DNA kódující tuto doménu pro experimenty, jejichž cílem bude objasnit nebo přiblížit její funkci v rostlinné buňce. Dosud byla pozorována lokalizace samotné domény v listových buňkách *Nicotiana benthamiana*, kolokalizace s jinými buněčnými kompartmenty a lokalizace ve stabilně transformovaných rostlinách *Arabidopsis thaliana*. Souběžně s touto prací jsem pokračovala ve studiu forminu AtFH13, konkrétně jsem pracovala na jeho klonování, tvorbě stabilně transformovaných rostlin s proteinem jeho PTEN domény a izolaci proteinu PTEN domény.

### 6.1 PTEN DOMÉNA ATFH14

Na základě predikcí cDNA forminu AtFH14 z databází TAIR (Swarbreck et al., 2008) a UniProt (Jain et al., 2009), které se shodovaly, jsem navrhla primery jednak pro namnožení jednotlivých domén tohoto genu, ale také vhodně tak, aby bylo možné exprimovat celý formin. Jednalo se o PTEN, FH1 a FH2 domény (Cvrckova et al., 2004a).

Domény FH1 a FH2 se pomocí PCR z cDNA namnožit nepodařilo, přestože při optimalizacích PCR na genomové DNA produkt vznikal. PTEN doména byla namnožena z cDNA knihovny pACT (suspenní kultura *Arabidopsis thaliana*) s použitím Dream Taq<sup>TM</sup> polymerázy (Fermentas), zaklonována do vektoru od firmy Gateway<sup>®</sup> pomocí LR reakce (Invitrogen<sup>TM</sup>). Tento vektor jsem používala k osekvenování a překlonování sekvence do donorového vektoru pro translační fúzi s YFP či EOS.

Osekvenovanou DNA PTEN domény izolovanou z cDNA jsem porovnávala z databází TAIR. Byly zjištěny odlišnosti, které se týkaly záměny nukleotidů. Na základě sekvenování dalších fragmentů z jiných transformovaných bakteriálních kmenů byly zjištěny také posuny čtecího rámce. Vzhledem k tomu, že se jednalo o pomnožení z cDNA, je možné, že chyby vznikly při RT-PCR nebo na základě sekvenčních rozdílů mezi jednotlivými rostlinnými klony v pACT knihovně, tedy již při přípravě knihovny a jejím pomnožování v bakteriích.

Z těchto důvodů jsem navrhla nové klonovací primery, tentokrát pro PCR reakci, kdy byla jako templát použita genomová DNA a pro jistotu jsem použila polymerázu Phusion<sup>®</sup> High-Fidelity, která má nižší chybovost než Dream Taq. PTEN se podařilo namnožit a osekvenovat v pomocném vektoru. Sekvence se v celé délce shodovala se sekvencí z databáze TAIR. Nebyla nalezena alternativní sestřihová varianta jako například u transkriptu *AtFH13* (Přerostová, 2011). Pro

další analýzu funkce proteinu byla zvolena tranzientní a stabilní exprese proteinu v rostlinách (viz následující kapitola).

## 6.2 LOKALIZACE PTEN DOMÉNY ATFH14 V LISTECH NICOTIANA BENTHAMIANA

PTEN jsem z pomocného vektoru překlonovala pomocí LR reakce do destinačního vektoru. Pro N-koncovou doménu jsem zvolila vektory pro C-koncovou YFP a EOS fúzi (shrnuto v Crameri et al., 1996; Mathur et al., 2010; Tsien, 1998; Wiedenmann et al., 2004). Navíc byly tyto vektory vybrány z důvodu přítomnosti ubikvitinového promotoru, který je narozdíl od promotoru 35S (z viru kvěťákové mozaiky) rostlinného původu. Nedochází u něj proto v takové míře k umlčování a jeho exprese je konstitutivní a silná (Christensen and Quail, 1996). Poté jsem takto značeným konstruktem transformovala *Agrobacterium* a jím jsem infiltrovala listy tabáku. K další eliminaci umlčování exprese proteinu byly společně s PTEN infiltrovány také bakterie s vneseným plazmidem exprimujícím virový protein p19, který brání umlčování exprese (Baulcombe and Molnar, 2004; Voinnet et al., 2003). Infiltrace proběhla úspěšně. PTEN doména byla pozorována jak v běžném fluorescenčním, tak na konfokálním mikroskopu, kde se dala ověřit pravost signálu lambda skenem.

PTEN doména byla fluorescenčně pozorována ve spodní pokožce listových buněk v kortikální cytoplazmě a v „měchýřkovitých“ strukturách (8B, C). Tyto „měchýřkovité“ struktury by mohly být organelami membránového původu, na které se PTEN váže. To by podporovalo také předpokládanou schopnost vazby obou PTEN subdomén (fosfatázová a C2) k membránovým fosfolipidům (Cvrckova et al., 2004a; Leslie et al., 2008), již potvrzenou u příbuzného proteinu z mechu (van Gisbergen et al., 2012).

Na konfokálním mikroskopu jsem pozorovala PTEN v kortikální cytoplazmě (7A-E), hojně v místě jádra (7A), ale také uvnitř buňky, pravděpodobně volně v cytoplazmě, v cytoplazmatických provazcích (7A, B) nebo v podobě „teček“. Ty jsem pozorovala již fluorescenčně, ale až po ověření lambda skenem u stabilně transformovaných rostlin na konfokálním mikroskopu se ukázalo, že se jedná o YFP. Některé tečky mohly být způsobeny overexpresí proteinu a následně tvorbou inkluzních tělísek. Většina z nich ale byla v celé buňce, v kortikální cytoplazmě i v cytoplazmatických provazcích, kolem jádra a také v „měchýřkovitých“ strukturách. To by naznačovalo propojení mezi některou endomembránovou organelou, popřípadě by se také mohlo spekulovat o zprostředkovaném spojení s cytoskeletem, který je v buňce v těsné blízkosti všech organel.

### 6.3 LOKALIZACE PTEN DOMÉNY ATFH14 V ARABIDOPSIS THALIANA

Pro pozorování lokalizace PTEN bez omezení na pokožkové buňky a bez možných artefaktů heterologní exprese jsem vytvořila stabilně transformované rostliny *Arabidopsis thaliana*. K tomu jsem použila metodu floral-dip (Clough and Bent, 1998; Davis et al., 2009). Stabilní transformanty jsem pozorovala opět na fluorescenčním a konfokálním mikroskopu.

Ve fluorescenčním mikroskopu při pozorování kořene a kořenové špičky byla jasně PTEN lokalizována do míst jádra (12A, C dělicí jádra), což mohlo být způsobeno degradací fúzního proteinu. Dále jsem protein pozorovala v kortikální cytoplazmě a kolem jádra ve formě již zmiňovaných teček (12B). V konfokálním mikroskopu byly tyto tečky ještě více rozeznatelné v celé kořenové špičce (14 J, K), pro ověření, že jde skutečně o YFP, byl pořízen k těmto tečkám lambda sken (14L). Podobné úkazy byly pozorovány při zkoumání pohybu endozomů v souvislosti s polarizovaným růstem kořenové špičky u rýže a *Arabidopsis*. Fluorescenčně značené endozomy (GFP značka na FYVE doméně, která se váže na membránový fosfatidylinozitol-3-fosfát endozomů (shrnutí v Kutateladze, 2006)) vypadaly v kořenové špičce stabilně transformovaných rostlin jako tečky, které se vyskytovaly hlavně v okolí jádra. V kořenové špičce byl počet teček mnohem větší než v kortikální zóně kořene (Vermeer et al., 2006; Voigt et al., 2005). To by odpovídalo i mému pozorování kořenové zóny, kde se těchto teček vyskytovalo podstatně méně (13F, I).

Na fotografiích kořenové zóny (13F, I) jsou také vidět GFP tečky, které po fotokonverzi EOS proteinu, nekolokalizují s PTEN. V případě, že by se jednalo o plastidy, by se mohlo jednat o kolokalizaci PTEN a plastidů. Vazba plastidů s forminy byla již ukázána na FH5 u rýže. Autoři také podporují teorii, že se PTEN doména váže na vnitrobuněčné membránové kompartmenty (Cvrckova et al., 2004a; Zhang et al., 2011b).

### 6.4 KOLOKALIZACE PTEN DOMÉNY ATFH14 S GOLGIHO APARÁTEM

Pro bližší určení identity teček, které jsem viděla hlavně při pozorování stabilně transformovaných rostlin *Arabidopsis*, konkrétně v kořenové části, jsem použila koinfekci listů tabáku agrobakteriálním klonem, který obsahoval sialyl transferázu-RFP jako marker Golgiho aparátu. Společně s ním, PTEN-YFP a p19 jsem infiltrovala listy tabáku. Následně jsem pozorovala kolokalizace PTEN proteinu a Golgiho aparátu v listových buňkách tabáku.

Infiltrované buňky jsem pozorovala na konfokálním mikroskopu (obr. 9 a 10). Z pozorování lze usoudit, že PTEN s Golgiho aparátem nekolokalizuje. Výjimečně byly kolokalizace nalezeny, ale spíše se jednalo o náhodnou kolokalizaci. V buňkách byly opět pozorovány tečky PTEN a velké nahromadění

proteinu v okolí jádra. Při pozorování infiltrovaných tabáků po delší době infiltrace (5 dní) vznikaly místy shluky YFP, pravděpodobně lokalizované v jádře, které nejspíš byly způsobeny nadměrnou expresí proteinu. Na fotografiích 9F se Golgiho aparát i PTEN nacházejí ve formě teček v jakýchsi provazcích, možná cytoplazmatických. Na druhou stranu na fotografii 9I se zdají být provazce více kompaktní a tvoří síť. Možná by se mohlo jednat o cytoskelet se kterým PTEN asociuje. Toto tvrzení je však velmi diskutabilní a vyžaduje další kolokalizační experimenty. Hodilo by se například použít značený aktin a tubulin, což však z časových důvodů dosud nebylo provedeno. Navzdory pozorováním, kdy tečky byly přítomny uvnitř buněk a na jejich periferii, byla nalezena i buňka, u které se protein vyskytoval společně s Golgiho aparátem pouze v místě kortikální cytoplazmy (9L). Otázkou je, zda se pouze nejednalo o nahromadění proteinu v těchto místech z důvodu, že zbylá část buňky byla zcela vyplněna vakuolou.

U všech předešlých prováděných pozorování jsem viděla “měchýřkovité” struktury. Při kolokalizaci byly ještě o to více zřetelné, protože byly predikované membránové organely “obežnány” navíc Golgiho aparátem. Tyto organely se nacházely v těsné blízkosti jádra (10O). Ani zde se o kolokalizaci s PTEN nejednalo. Na fotografii 10R byly tyto “měchýřky” spatřeny uvnitř celé buňky. Jak jsem již zmínila v předešlé diskuzi, tyto “měchýřky” by mohly představovat některou z membránových organel, například endosom, na které by se PTEN mohla vázat (Voigt et al., 2005). Také by se mohlo jednat o plastidy (Zhang et al., 2011b).

K vyvrácení nebo potvrzení těchto domněnek bude potřeba provést ještě další kolokalizační pozorování s širokou škálou membránových markerů popřípadě také cytoskeletálních markerů.

## 6.5 DYNAMIKA PTEN Z ATFH14

K úplnému vyvrácení, že PTEN neasociuje s Golgiho aparátem, jsme použili sekvenci snímků vyfocených v krátkém časovém intervalu na konfokálním mikroskopu. Golgiho aparát je sám o sobě velmi dynamickou organelou. PTEN se ale také pohybovala a to navíc nečekaně rychle. Po důkladném prozkoumání záznamu jsem usoudila, že PTEN opravdu s Golgiho aparátem neasociuje, ale je nasnadě, zda by nemohl asociovat například s trans Golgiho aparátem. Ten totiž asociuje pouze s některými exempláři Golgiho aparátu (shrnuto v Gu et al., 2001) a tak by pohyb PTEN teček, který kopíroval pohyb Golgiho aparátu, mohl dávat smysl.

Stejně tak by mohlo dávat smysl, že PTEN může třeba jen zprostředkovaně asociovat s cytoskeletem. K tomu by přispívaly poznatky z práce, která se zabývala pohybem Golgiho tělísek v souvislosti s polarizovaným aktinovým růstem. Bylo

ukázáno, že pohyb těchto tělísek se mění v závislosti na větvení či růstu aktinu (Voigt et al., 2005). Podobné tendence byly pozorovány i zde u PTEN.

I toto potvrzuje, že pozorování kolokalizací PTEN s cytoskeletálními markery, je možná vhodnou metodou k charakterizaci PTEN. Dále by se daly využít také cytoskeletální drogy nebo také inhibitory sekreční dráhy, které by mohly pomoci objasnit fungování forminů také ve vývoji rostlin. V neposlední řadě by bylo potřeba objasnit vazbu PTEN do membrán vhodnou metodou (viz dále).

#### 6.6 LOKALIZACE PTEN DOMÉNY ATFH13 V ARABIDOPSIS THALIANA

K dalšímu porovnávání lokalizace a funkce PTEN domén, jsem vytvořila stabilně transformované *Arabidopsis thaliana* s proteinem PTEN-YFP a PTEN-EOS. Vzhledem k tomu, že semena T2 generace pomalu klíčila (možná byla sklizena ještě před úplným dozráním), pozorovala jsem zatím pouze 2 rostliny s těmito konstrukty (konkrétně se jednalo o FD431-dlouhá verze domény). PTEN doména byla lokalizována prakticky ve stejných místech jako PTEN doména AtFH14. Toto pozorování není nijak překvapující a dalo se očekávat, že domény budou mít stejné funkce.

#### 6.7 ATFH13

*AtFH13* nebyl nikdy úspěšně klonován v celé dvě délce. S použitím Phusion<sup>®</sup> High-Fidelity polymerázy se mi ho podařilo na základě poznatků od S. Přerostové (Přerostová, 2011) úspěšně pomnožit a zaklonovat do pomocného vektoru. Ověřila jsem 2x sekvenci restrikcí štěpením a následně sekvenací. Izolovaný formin by posléze bylo vhodné překlonsat do vektorů pro fúzi s markery (př. YFP, RFP, GFP), které by bylo možné pozorovat v rostlinné buňce. Vzhledem k tomu, že o *AtFH13* neexistují žádné vědecké práce, bylo by v další řadě vhodné provést kolokalizační analýzu s cytoskeletálními markery či s markery membránových organel.

#### 6.8 IZOLACE PROTEINU PTEN ATFH13

Již bylo několikrát zmíněno, že se u domény PTEN rostlinných forminů II očekává schopnost vazby na membrány, popř. membránové fosfolipidy (Cvrckova et al., 2004a), a u mechu již tato vazba byla prokázána (van Gisbergen et al., 2012). Tyto interakce by bylo možné pozorovat mikroskopicky při kolokalizačních pokusech *in vivo*, kdy jsou pozorovány dva a více fluorescenčně značených objektů. V tomto případě by se jednalo o markery plazmatické membrány a membrán buněčných organel.

Další možnou metodou by byla Large Unilamellar Vesicle (LUV) Binding Assay (Berendes et al., 1993). Protein musí být nejprve izolován. Dosavadní pokusy

o izolaci proteinu PTEN byly zatím neúspěšné, i když v pilotním experimentu exprese v bakteriích byla.

## 7. SOUHRN

Tato diplomová práce byla věnována forminu AtFH14 a také částečně forminu AtFH13. Oba tyto forminy spadají do II třídy forminů u *Arabidopsis thaliana*. Cíle vytyčené v úvodu byly splněny kromě izolace proteinu PTEN z AtFH13 z bakterií pro metodu Large Unilamellar Vesicle (LUV) Binding Assay (Berendes et al., 1993). Ta měla přispět k osvětlení vazby PTEN domény na membránové protein.

V práci byly shrnuty dosavadní poznatky o forminech, detailněji byly zmíněny rostlinné forminy a PTEN doména některých rostlinných forminů, která byla v popředí zájmu i této práce. Funkce forminů je již poměrně prozkoumána, ale funkce PTEN domény není zatím plně objasněna.

PTEN doména AtFH14 byla úspěšně namnožena, zaklonována do vektoru a osekvenována. Sekvence se shodovala s predikovanou sekvencí v databázi TAIR i UniProt (Jain et al., 2009, Swarbreck et al., 2008). Tato doména byla značena fluorescenčními proteiny YFP a EOS a lokalizována uvnitř buněk pomocí metody transientní exprese v listových buňkách tabáku. Byla pozorována v cytoplazmě, ale hlavně ohraničovala “měchýřkovité” struktury. Je tedy možné, že se jednalo o vazbu PTEN na membrány buněčných organel. Po koinfekci buněk tabáku bakteriemi se značenou PTEN a značeným Golgiho aparátem můžeme téměř vyloučit kolokalizaci Golgiho aparátu s PTEN a tedy i domněnku, že by “měchýřkovité” struktury mohly být identifikovány jako Golgiho aparát. Mohlo by se tedy jednat například o endozomy nebo plastid. K tomuto účelu by bylo vhodné provést další kolokalizační analýzy a to nejlépe u stabilně transformovaných a křížených *Arabidopsis thaliana*.

Za tímto účelem byly vytvořeny stabilně transformované rostliny *Arabidopsis thaliana* s fluorescenčně značenou PTEN z AtFH14. U těch byla opět pozorována lokalizace PTEN domény. Nacházela se hlavně v kortikální cytoplazmě, také místy v cytoplazmatických provazcích, v okolí jádra a čteně byly pozorovány “měchýřkovité” struktury a to v celé buňce nebo v těsné blízkosti jádra. Některá pozorování také mohou naznačovat asociaci s cytoskeletálními proteiny.

K porovnání lokalizace PTEN z AtFH14 a PTEN z AtFH13 jsem vytvořila také stabilně transformované rostliny se dvěma sestřihovými variantami PTEN z AtFH13. Rozdíly v lokalizaci nebyly pozorovány.

Jak jsem již zmínila, k ověření vazby na membránové fosfolipidy by bylo vhodné izolovat protein z bakterií a využít metodu Large Unilamellar Vesicle (LUV) Binding Assay (Berendes et al., 1993). Izolace proteinu PTEN z AtFH13 se ale nezdařila.

Formin AtFH13 nebyl ještě nikdy izolován a nikdy nebyla ověřena jeho sekvence. V této práci se ho podařilo namnožit, zaklonovat do pomocného vektoru a osekvenovat. Vzhledem k nedostatku času pro důkladné ověření celé sekvence není možné říci, zda i zde bude docházet k alternativnímu sestřihu.

Tato práce přinesla první výsledky o PTEN doméně AtFH14. Navíc vznikly cenné transformované rostliny, které exprimují fluorescenčně značené proteiny PTEN z AtFH14 i AtFH13. Ty budou v navazující práci kříženy s dalšími rostlinami a umožní tak pozorovat lokalizaci na různých buněčných organelách nebo také na cytoskeletu, či chování PTEN při polarizovaném růstu a cytokinezi. Tyto hybridní rostliny také umožní sledovat vliv různých látek na buňky. Připadají v úvahu například cytoskeletální drogy.

Zaklonování celého *AtFH13* a označení fluorescenčním proteinem by také mohlo vnést světlo do objasňování funkce forminů s PTEN doménami. Bylo by vhodné pro srovnání vytvořit fluorescenčně značený AtFH14 a porovnat jeho umístění v buňce zároveň s fluorescenčně značenou PTEN. Obdobně bude moci být provedena analýza pro AtFH13.

Tato diplomová práce bude nyní sloužit jako základ pro hlubší výzkum těchto dvou forminů v rámci připravované disertace a snad se i díky těmto výsledkům podaří v brzké době objasnit funkci PTEN domény u *Arabidopsis thaliana*.



## 8. SEZNAM LITERATURY

- Alberts, A.S. (2001) Identification of a carboxyl-terminal diaphanous-related formin homology protein autoregulatory domain. *J Biol Chem*, **276**(4), 2824-2830.
- Ames, J.M., Wynne, A., Hofmann, A., Plos, S., Gibson, G.R. (1999) The effect of a model melanoidin mixture on faecal bacterial populations in vitro. In *Br J Nutr*, England: pp 489-495.
- Asubel, M., Frederick, Brent, R., Kingston, E., Robert, Moore, D., David, Seidman, J., G., Smith, J., A., Struhl, K. (1992) Short protocols in molecular biology (second edition). In *A compendium of methods from current protocols in molecular biology*.
- Atrazhev, A.M. and Elliott, J.F. (1996) Simplified desalting of ligation reactions immediately prior to electroporation into *E. coli*. *Biotechniques*, **21**(6), 1024.
- Banno, H. and Chua, N.H. (2000) Characterization of the arabidopsis formin-like protein AFH1 and its interacting protein. *Plant Cell Physiol*, **41**(5), 617-626.
- Bartolini, F. and Gundersen, G.G. (2010) Formins and microtubules. *Biochim Biophys Acta*, **1803**(2), 164-173.
- Baulcombe, D.C. and Molnar, A. (2004) Crystal structure of p19--a universal suppressor of RNA silencing. In *Trends Biochem Sci*, England: pp 279-281.
- Berendes, R., Burger, A., Voges, D., Demange, P., Huber, R. (1993) Calcium influx through annexin V ion channels into large unilamellar vesicles measured with fura-2. In *FEBS Lett*, Netherlands: pp 131-134.
- Bertani, G. (1951) Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **62**(3), 293-300.
- Blanchoin, L. and Staiger, C.J. (2010) Plant formins: diverse isoforms and unique molecular mechanism. *Biochim Biophys Acta*, **1803**(2), 201-206.
- Castrillon, D.H. and Wasserman, S.A. (1994) Diaphanous is required for cytokinesis in *Drosophila* and shares domains of similarity with the products of the limb deformity gene. *Development*, **120**(12), 3367-3377.
- Chan, D.C., Bedford, M.T., Leder, P. (1996) Formin binding proteins bear WWP/WW domains that bind proline-rich peptides and functionally resemble SH3 domains. *EMBO J*, **15**(5), 1045-1054.
- Cheung, A.Y., Niroomand, S., Zou, Y., Wu, H.M. (2010) A transmembrane formin nucleates subapical actin assembly and controls tip-focused growth in pollen tubes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**(37), 16390-16395.
- Cheung, A.Y. and Wu, H.M. (2004) Overexpression of an Arabidopsis formin stimulates supernumerary actin cable formation from pollen tube cell membrane. *Plant Cell*, **16**(1), 257-269.
- Christensen, A.H. and Quail, P.H. (1996) Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic Res*, **5**(3), 213-218.
- Clough, S.J. and Bent, A.F. (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, **16**(6), 735-743.
- Cramer, A., Whitehorn, E.A., Tate, E., Stemmer, W.P. (1996) Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nat Biotechnol*, **14**(3), 315-319.
- Cvrckova, F. (2000) Are plant formins integral membrane proteins? *Genome Biol*, **1**(1), RESEARCH001.
- Cvrckova, F., Novotny, M., Pickova, D., Zarsky, V. (2004a) Formin homology 2 domains occur in multiple contexts in angiosperms. *BMC Genomics*, **5**(1), 44.
- Cvrckova, F., Rivero, F., Bavlanka, B. (2004b) Evolutionarily conserved modules in actin nucleation: lessons from *Dictyostelium discoideum* and plants. Review article. *Protoplasma*, **224**(1-2), 15-31.

- Cvrčková, F., Grunt, M., Žárský, V. (2012) Expression of GFP-mTalin reveals an actin-related role for the <i>Arabidopsis</i> Class II formin AtFH12. (3), 431-440.
- Davis, A.M., Hall, A., Millar, A.J., Darrah, C., Davis, S.J. (2009) Protocol: Streamlined sub-protocols for floral-dip transformation and selection of transformants in *Arabidopsis thaliana*. In *Plant Methods*, England: pp 3.
- Deeks, M.J., Cvrckova, F., Machesky, L.M., Mikitova, V., Ketelaar, T., Zarsky, V., Davies, B., Hussey, P.J. (2005) *Arabidopsis* group Ie formins localize to specific cell membrane domains, interact with actin-binding proteins and cause defects in cell expansion upon aberrant expression. *New Phytol*, **168**(3), 529-540.
- Deeks, M.J., Fendrych, M., Smertenko, A., Bell, K.S., Oparka, K., Cvrckova, F., Zarsky, V., Hussey, P.J. (2010) The plant formin AtFH4 interacts with both actin and microtubules, and contains a newly identified microtubule-binding domain. In *J Cell Sci*, England: pp 1209-1215.
- Deeks, M.J., Hussey, P.J., Davies, B. (2002) Formins: intermediates in signal-transduction cascades that affect cytoskeletal reorganization. In *Trends Plant Sci*, England: pp 492-498.
- Evangelista, M., Blundell, K., Longtine, M.S., Chow, C.J., Adames, N., Pringle, J.R., Peter, M., Boone, C. (1997) Bni1p, a yeast formin linking cdc42p and the actin cytoskeleton during polarized morphogenesis. *Science*, **276**(5309), 118-122.
- Favery, B., Chelysheva, L.A., Lebris, M., Jammes, F., Marmagne, A., De Almeida-Engler, J., Lecomte, P., Vaury, C., Arkowitz, R.A., Abad, P. (2004) *Arabidopsis* formin AtFH6 is a plasma membrane-associated protein upregulated in giant cells induced by parasitic nematodes. *Plant Cell*, **16**(9), 2529-2540.
- Goode, B.L. and Eck, M.J. (2007) Mechanism and function of formins in the control of actin assembly. *Annu Rev Biochem*, **76**, 593-627.
- Grunt, M., Zarsky, V., Cvrckova, F. (2008) Roots of angiosperm formins: the evolutionary history of plant FH2 domain-containing proteins. *BMC Evol Biol*, **8**, 115.
- Gu, F., Crump, C.M., Thomas, G. (2001) Trans-Golgi network sorting. *Cell Mol Life Sci*, **58**(8), 1067-1084.
- Gupta, R., Huang, Y., Kieber, J., Luan, S. (1998) Identification of a dual-specificity protein phosphatase that inactivates a MAP kinase from *Arabidopsis*. *Plant J*, **16**(5), 581-589.
- Gupta, R., Ting, J.T., Sokolov, L.N., Johnson, S.A., Luan, S. (2002) A tumor suppressor homolog, AtPTEN1, is essential for pollen development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **14**(10), 2495-2507.
- Gutsche-Perelroizen, I., Lepault, J., Ott, A., Carlier, M.F. (1999) Filament assembly from profilin-actin. *J Biol Chem*, **274**(10), 6234-6243.
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, *Nucleic Acids Symposium Series*: pp 95-98.
- Higgs, H.N. (2005) Formin proteins: a domain-based approach. In *Trends Biochem Sci*, England: pp 342-353.
- Higgs, H.N. and Peterson, K.J. (2005) Phylogenetic analysis of the formin homology 2 domain. In *Mol Biol Cell*, United States: pp 1-13.
- Hruz, T., Laule, O., Szabo, G., Wessendorp, F., Bleuler, S., Oertle, L., Widmayer, P., Gruissem, W., Zimmermann, P. (2008) Genevestigator v3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Adv Bioinformatics*, **2008**, 420747.
- Huang, S., Gao, L., Blanchoin, L., Staiger, C.J. (2006) Heterodimeric capping protein from *Arabidopsis* is regulated by phosphatidic acid. In *Mol Biol Cell*, United States: pp 1946-1958.
- Ingouff, M., Fitz Gerald, J.N., Guerin, C., Robert, H., Sorensen, M.B., Van Damme, D., Geelen, D., Blanchoin, L., Berger, F. (2005) Plant formin AtFH5 is an evolutionarily conserved actin nucleator involved in cytokinesis. *Nat Cell Biol*, **7**(4), 374-380.

- Jain, E., Bairoch, A., Duvaud, S., Phan, I., Redaschi, N., Suzek, B.E., Martin, M.J., McGarvey, P., Gasteiger, E. (2009) Infrastructure for the life sciences: design and implementation of the UniProt website. In *BMC Bioinformatics*, England: pp 136.
- Kamei, T., Tanaka, K., Hihara, T., Umikawa, M., Imamura, H., Kikyo, M., Ozaki, K., Takai, Y. (1998) Interaction of Bnr1p with a novel Src homology 3 domain-containing Hof1p. Implication in cytokinesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **273**(43), 28341-28345.
- Kang, F., Purich, D.L., Southwick, F.S. (1999) Profilin promotes barbed-end actin filament assembly without lowering the critical concentration. *J Biol Chem*, **274**(52), 36963-36972.
- Kleinebrecht, J., Selow, J., Winkler, W. (1982) The mouse mutant limb-deformity (ld). *Anat Anz*, **152**(4), 313-324.
- Kohno, H., Tanaka, K., Mino, A., Umikawa, M., Imamura, H., Fujiwara, T., Fujita, Y., Hotta, K., Qadota, H., Watanabe, T., Ohya, Y., Takai, Y. (1996) Bni1p implicated in cytoskeletal control is a putative target of Rho1p small GTP binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*, **15**(22), 6060-6068.
- Kovar, D.R., Kuhn, J.R., Tichy, A.L., Pollard, T.D. (2003) The fission yeast cytokinesis formin Cdc12p is a barbed end actin filament capping protein gated by profilin. In *J Cell Biol*, United States: pp 875-887.
- Kutateladze, T.G. (2006) Phosphatidylinositol 3-phosphate recognition and membrane docking by the FYVE domain. In *Biochim Biophys Acta*, Netherlands: pp 868-877.
- Lee, J.O., Yang, H., Georgescu, M.M., Di Cristofano, A., Maehama, T., Shi, Y., Dixon, J.E., Pandolfi, P., Pavletich, N.P. (1999) Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. In *Cell*, United States: pp 323-334.
- Leslie, N.R., Batty, I.H., Maccario, H., Davidson, L., Downes, C.P. (2008) Understanding PTEN regulation: PIP2, polarity and protein stability. In *Oncogene*, England: pp 5464-5476.
- Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S.I., Puc, J., Miliareis, C., Rodgers, L., McCombie, R., Bigner, S.H., Giovanella, B.C., Ittmann, M., Tycko, B., Hibshoosh, H., Wigler, M.H., Parsons, R. (1997) PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*, **275**(5308), 1943-1947.
- Li, Y., Shen, Y., Cai, C., Zhong, C., Zhu, L., Yuan, M., Ren, H. (2010) The type II Arabidopsis formin14 interacts with microtubules and microfilaments to regulate cell division. *Plant Cell*, **22**(8), 2710-2726.
- Lo, S.H. (2004) Tensin. In *Int J Biochem Cell Biol*, England: pp 31-34.
- Lo, S.H., Janmey, P.A., Hartwig, J.H., Chen, L.B. (1994) Interactions of tensin with actin and identification of its three distinct actin-binding domains. *J Cell Biol*, **125**(5), 1067-1075.
- Macias, M.J., Wiesner, S., Sudol, M. (2002) WW and SH3 domains, two different scaffolds to recognize proline-rich ligands. In *FEBS Lett*, Netherlands: pp 30-37.
- Maehama, T. and Dixon, J.E. (1998) The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem*, **273**(22), 13375-13378.
- Martiniere, A., Gayral, P., Hawes, C., Runions, J. (2011) Building bridges: formin1 of Arabidopsis forms a connection between the cell wall and the actin cytoskeleton. *Plant J*, **66**(2), 354-365.
- Mathur, J., Radhamony, R., Sinclair, A.M., Donoso, A., Dunn, N., Roach, E., Radford, D., Mohaghegh, P.S., Logan, D.C., Kokolic, K., Mathur, N. (2010) mEosFP-based green-to-red photoconvertible subcellular probes for plants. In *Plant Physiol*, United States: pp 1573-1587.
- Michelot, A., Guerin, C., Huang, S., Ingouff, M., Richard, S., Rodiuc, N., Staiger, C.J., Blanchoin, L. (2005) The formin homology 1 domain modulates the actin nucleation and bundling activity of Arabidopsis FORMIN1. *Plant Cell*, **17**(8), 2296-2313.

- Miyagi, Y., Yamashita, T., Fukaya, M., Sonoda, T., Okuno, T., Yamada, K., Watanabe, M., Nagashima, Y., Aoki, I., Okuda, K., Mishina, M., Kawamoto, S. (2002) Delphilin: a novel PDZ and formin homology domain-containing protein that synaptically colocalizes and interacts with glutamate receptor delta 2 subunit. In *J Neurosci*, United States: pp 803-814.
- Moseley, J.B. and Goode, B.L. (2005) Differential activities and regulation of *Saccharomyces cerevisiae* formin proteins Bni1 and Bnr1 by Bud6. In *J Biol Chem*, United States: pp 28023-28033.
- Moseley, J.B., Sagot, I., Manning, A.L., Xu, Y., Eck, M.J., Pellman, D., Goode, B.L. (2004) A conserved mechanism for Bni1- and mDia1-induced actin assembly and dual regulation of Bni1 by Bud6 and profilin. In *Mol Biol Cell*, United States: pp 896-907.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, **15**(3), 473-497.
- Murray, D. and Honig, B. (2002) Electrostatic control of the membrane targeting of C2 domains. In *Mol Cell*, United States: pp 145-154.
- Nienhaus, G.U., Nienhaus, K., Holzle, A., Ivanchenko, S., Renzi, F., Oswald, F., Wolff, M., Schmitt, F., Rocker, C., Vallone, B., Weidemann, W., Heilker, R., Nar, H., Wiedenmann, J. (2006) Photoconvertible fluorescent protein EosFP: biophysical properties and cell biology applications. In *Photochem Photobiol*, United States: pp 351-358.
- Paul, A.S. and Pollard, T.D. (2009a) Energetic requirements for processive elongation of actin filaments by FH1FH2-formins. In *J Biol Chem*, United States: pp 12533-12540.
- Paul, A.S. and Pollard, T.D. (2009b) Review of the mechanism of processive actin filament elongation by formins. *Cell Motil Cytoskeleton*, **66**(8), 606-617.
- Petersen, J., Nielsen, O., Egel, R., Hagan, I.M. (1998) FH3, a domain found in formins, targets the fission yeast formin Fus1 to the projection tip during conjugation. *J Cell Biol*, **141**(5), 1217-1228.
- Petrasek, J. and Schwarzerova, K. (2009) Actin and microtubule cytoskeleton interactions. *Curr Opin Plant Biol*, **12**(6), 728-734.
- Pollard, T.D. (2007) Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **36**, 451-477.
- Pollard, T.D. and Cooper, J.A. (1984) Quantitative analysis of the effect of *Acanthamoeba* profilin on actin filament nucleation and elongation. *Biochemistry*, **23**(26), 6631-6641.
- Postgate, J.R. (1963) Versatile medium for the enumeration of sulfate-reducing bacteria. *Appl Microbiol*, **11**, 265-267.
- Pribat, A., Sormani, R., Rousseau-Gueutin, M., Julkowska, M.M., Testerink, C., Joubes, J., Castroviejo, M., Laguerre, M., Meyer, C., Germain, V., Rothan, C. (2012) A novel class of PTEN protein in *Arabidopsis* displays unusual phosphoinositide phosphatase activity and efficiently binds phosphatidic acid. *Biochem J*, **441**(1), 161-171.
- Pruyne, D., Evangelista, M., Yang, C., Bi, E., Zigmond, S., Bretscher, A., Boone, C. (2002) Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association. In *Science*, United States: pp 612-615.
- Přerostová, S. (2011) Charakterizace PTEN domény vybraných forminů II. třídy *Arabidopsis*.
- Raftopoulou, M., Etienne-Manneville, S., Self, A., Nicholls, S., Hall, A. (2004) Regulation of cell migration by the C2 domain of the tumor suppressor PTEN. In *Science*, United States: pp 1179-1181.
- Renault, L., Bugyi, B., Carlier, M.F. (2008) Spire and Cordon-bleu: multifunctional regulators of actin dynamics. *Trends Cell Biol*, **18**(10), 494-504.
- Rhee, S.Y., Beavis, W., Berardini, T.Z., Chen, G., Dixon, D., Doyle, A., Garcia-Hernandez, M., Huala, E., Lander, G., Montoya, M., Miller, N., Mueller, L.A., Mundodi, S., Reiser, L., Tacklind, J., Weems, D.C., Wu, Y., Xu, I., Yoo, D., Yoon, J., Zhang, P. (2003) The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR): a model organism database providing a

- centralized, curated gateway to Arabidopsis biology, research materials and community. *Nucleic Acids Res*, **31**(1), 224-228.
- Rivero, F., Muramoto, T., Meyer, A.K., Urushihara, H., Uyeda, T.Q., Kitayama, C. (2005) A comparative sequence analysis reveals a common GBD/FH3-FH1-FH2-DAD architecture in formins from Dictyostelium, fungi and metazoa. In *BMC Genomics*, England: pp 28.
- Sagot, I., Rodal, A.A., Moseley, J., Goode, B.L., Pellman, D. (2002) An actin nucleation mechanism mediated by Bni1 and profilin. In *Nat Cell Biol*, England: pp 626-631.
- Schuler, G.D., Altschul, S.F., Lipman, D.J. (1991) A workbench for multiple alignment construction and analysis. *Proteins*, **9**(3), 180-190.
- Shemesh, T., Otomo, T., Rosen, M.K., Bershadsky, A.D., Kozlov, M.M. (2005) A novel mechanism of actin filament processive capping by formin: solution of the rotation paradox. In *J Cell Biol*, United States: pp 889-893.
- Stothard, P. (2000) The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques*, **28**(6), 1102, 1104.
- Swarbreck, D., Wilks, C., Lamesch, P., Berardini, T.Z., Garcia-Hernandez, M., Foerster, H., Li, D., Meyer, T., Muller, R., Ploetz, L., Radenbaugh, A., Singh, S., Swing, V., Tissier, C., Zhang, P., Huala, E. (2008) The Arabidopsis Information Resource (TAIR): gene structure and function annotation. In *Nucleic Acids Res*, England: pp D1009-1014.
- Tian, D., Litvak, V., Toledo-Rodriguez, M., Carmon, S., Lev, S. (2002) Nir2, a novel regulator of cell morphogenesis. *Mol Cell Biol*, **22**(8), 2650-2662.
- Tominaga, T., Sahai, E., Chardin, P., McCormick, F., Courtneidge, S.A., Alberts, A.S. (2000) Diaphanous-related formins bridge Rho GTPase and Src tyrosine kinase signaling. In *Mol Cell*, United States: pp 13-25.
- Tsien, R.Y. (1998) The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem*, **67**, 509-544.
- van Gisbergen, P.A., Li, M., Wu, S.Z., Bezanilla, M. (2012) Class II formin targeting to the cell cortex by binding PI(3,5)P2 is essential for polarized growth. In *J Cell Biol*, United States: pp 235-250.
- Vavylonis, D., Kovar, D.R., O'Shaughnessy, B., Pollard, T.D. (2006) Model of formin-associated actin filament elongation. In *Mol Cell*, United States: pp 455-466.
- Vermeer, J.E., van Leeuwen, W., Tobena-Santamaria, R., Laxalt, A.M., Jones, D.R., Divecha, N., Gadella, T.W., Jr., Munnik, T. (2006) Visualization of PtdIns3P dynamics in living plant cells. In *Plant J*, England: pp 687-700.
- Vidali, L., van Gisbergen, P.A., Guerin, C., Franco, P., Li, M., Burkart, G.M., Augustine, R.C., Blanchoin, L., Bezanilla, M. (2009) Rapid formin-mediated actin-filament elongation is essential for polarized plant cell growth. In *Proc Natl Acad Sci U S A*, United States: pp 13341-13346.
- Voigt, B., Timmers, A.C., Samaj, J., Hlavacka, A., Ueda, T., Preuss, M., Nielsen, E., Mathur, J., Emans, N., Stenmark, H., Nakano, A., Baluska, F., Menzel, D. (2005) Actin-based motility of endosomes is linked to the polar tip growth of root hairs. *Eur J Cell Biol*, **84**(6), 609-621.
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., Baulcombe, D. (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. In *Plant J*, England: pp 949-956.
- Wallar, B.J. and Alberts, A.S. (2003) The formins: active scaffolds that remodel the cytoskeleton. In *Trends Cell Biol*, England: pp 435-446.
- Wasserman, S. (1998) FH proteins as cytoskeletal organizers. In *Trends Cell Biol*, England: pp 111-115.
- Watanabe, N., Kato, T., Fujita, A., Ishizaki, T., Narumiya, S. (1999) Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization. *Nat Cell Biol*, **1**(3), 136-143.
- Wiedenmann, J., Ivanchenko, S., Oswald, F., Schmitt, F., Rocker, C., Salih, A., Spindler, K.D., Nienhaus, G.U. (2004) EosFP, a fluorescent marker protein with UV-inducible green-

- to-red fluorescence conversion. In Proc Natl Acad Sci U S A, United States: pp 15905-15910.
- Woychik, R.P., Stewart, T.A., Davis, L.G., D'Eustachio, P., Leder, P. (1985) An inherited limb deformity created by insertional mutagenesis in a transgenic mouse. *Nature*, **318**(6041), 36-40.
- Xu, Y., Moseley, J.B., Sagot, I., Poy, F., Pellman, D., Goode, B.L., Eck, M.J. (2004) Crystal structures of a Formin Homology-2 domain reveal a tethered dimer architecture. In *Cell*, United States: pp 711-723.
- Xue, X.H., Guo, C.Q., Du, F., Lu, Q.L., Zhang, C.M., Ren, H.Y. (2011) AtFH8 is involved in root development under effect of low-dose latrunculin B in dividing cells. *Mol Plant*, **4**(2), 264-278.
- Yang, W., Ren, S., Zhang, X., Gao, M., Ye, S., Qi, Y., Zheng, Y., Wang, J., Zeng, L., Li, Q., Huang, S., He, Z. (2011) BENT UPPERMOST INTERNODE1 encodes the class II formin FH5 crucial for actin organization and rice development. In *Plant Cell*, United States: pp 661-680.
- Ye, J., Zheng, Y., Yan, A., Chen, N., Wang, Z., Huang, S., Yang, Z. (2009) Arabidopsis formin3 directs the formation of actin cables and polarized growth in pollen tubes. *Plant Cell*, **21**(12), 3868-3884.
- Yi, K., Guo, C., Chen, D., Zhao, B., Yang, B., Ren, H. (2005) Cloning and functional characterization of a formin-like protein (AtFH8) from Arabidopsis. *Plant Physiol*, **138**(2), 1071-1082.
- Young, K.G. and Copeland, J.W. (2010) Formins in cell signaling. In *Biochim Biophys Acta*, Netherlands: pp 183-190.
- Zarsky, V., Cvrckova, F., Potocky, M., Hala, M. (2009) Exocytosis and cell polarity in plants - exocyst and recycling domains. *New Phytol*, **183**(2), 255-272.
- Zhang, Y., Li, S., Zhou, L.Z., Fox, E., Pao, J., Sun, W., Zhou, C., McCormick, S. (2011a) Overexpression of Arabidopsis thaliana PTEN caused accumulation of autophagic bodies in pollen tubes by disrupting phosphatidylinositol 3-phosphate dynamics. *Plant J*, **68**(6), 1081-1092.
- Zhang, Z., Zhang, Y., Tan, H., Wang, Y., Li, G., Liang, W., Yuan, Z., Hu, J., Ren, H., Zhang, D. (2011b) RICE MORPHOLOGY DETERMINANT encodes the type II formin FH5 and regulates rice morphogenesis. *Plant Cell*, **23**(2), 681-700.
- Zhou, F., Leder, P., Zuniga, A., Dettenhofer, M. (2009) Formin1 disruption confers oligodactylism and alters Bmp signaling. In *Hum Mol Genet*, England: pp 2472-2482.
- Zigmond, S.H. (2004) Formin-induced nucleation of actin filaments. In *Curr Opin Cell Biol*, United States: pp 99-105.
- Zigmond, S.H., Evangelista, M., Boone, C., Yang, C., Dar, A.C., Sicheri, F., Forkey, J., Pring, M. (2003) Formin leaky cap allows elongation in the presence of tight capping proteins. In *Curr Biol*, England: pp 1820-1823.
- Zuniga, A., Michos, O., Spitz, F., Haramis, A.P., Panman, L., Galli, A., Vintersten, K., Klasen, C., Mansfield, W., Kuc, S., Duboule, D., Dono, R., Zeller, R. (2004) Mouse limb deformity mutations disrupt a global control region within the large regulatory landscape required for Gremlin expression. In *Genes Dev*, United States: pp 1553-1564.