

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**



Studijní program: Biologie

Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie

Bc. Jakub Kukla

**Funkční analýza rostlinného ARP2/3 komplexu**

**Diplomová práce**

školitel: RNDr. Kateřina Schwarzerová, Ph.D.

Praha, 2011

## Poděkování

Rád bych poděkoval všem lidem, kteří mi umožnili vypracovat tuto diplomovou práci. Především školitelce RNDr. Kateřině Schwarzerové, Ph.D. za její trpělivost a ochotu pomoci, když bylo třeba. Dále oceňuji praktické zkušenosti a rady od RNDr. Lenky Havelkové, Ph.D. , které byly uplatňovány při mé experimentální činnosti. Také chci poděkovat kolegům Mgr. Stanislavu Vosolsobě, RNDr. Janě Krtkové a RNDr. Janu Petráškovi, Ph.D. za nesčetné diskuze týkající se mého tématu diplomové práce. Veliké díky patří i rodičům a mé milované ženě za psychickou i finanční podporu, které se mi od nich vždy dostávalo.

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou prací vypracoval samostatně na základě vypsání literatury a pod vedením uvedeného školitele.

V Praze dne 28.8. 2011

podpis .....

## **Seznam zkratk**

ADF - actin depolymerizing factor

SDS - sodium dodecylsulphate

ATP - adenosin triphosphate

ARP - actin related protein

GFP - green fluorescent protein

SCAR/WAVE - suppressor of cAMP receptor / WASP family Verprolin homologous

WASP-Wiskott - Aldrich Syndrome Protein

N-WASP - neuronal Wiskott–Aldrich Syndrome protein

SDS-PAGE - sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

NPF - nucleation promoting factor

BY-2 - Bright Yellow 2

# Obsah

1. Abstrakt .....	1
1. Abstract .....	2
2. Úvod .....	3
2.1 Aktinový cytoskelet.....	4
2.1.1 Aktin.....	4
2.1.2 Struktura aktinu.....	5
2.1.3 Stavba a vznik mikrofilament .....	6
2.1.4 Dynamika aktinu .....	7
2.1.5 Aktin vazebné proteiny.....	10
3. ARP2/3 komplex.....	12
3.1 Struktura ARP2/3 komplexu.....	12
3.2 Funkce ARP2/3 komplexu v živočišných a kvasinkových buňkách.....	14
3.4. Funkce ARP2/3 komplexu v rostlinách.....	19
3.5. Aktivace ARP2/3 komplexu .....	22
4. Materiál.....	24
4.1. Bakterie E.coli DH5- alfa .....	24
4.2. Bakterie E.coli Rosetta- 2.....	24
4.3. Bakterie E.coli BI- 21 .....	24
4.4. Rostlinné buňky Nicotiana tabacum BY- 2 .....	24
5. Metody.....	25
5.1 Práce s DNA .....	25
5.1.1. Příprava rekombinantních proteinů .....	25
5.1.2. pET28b vektor.....	25
5.1.3. Příprava podjednotek ARP 2/3 komplexu ve fúzi s GFP nebo mCherry .....	25
5.1.4 Vektor pGreen s GFP nebo mCherry .....	26
5.1.5 Izolace plasmidové DNA.....	26
5.1.6. Agarosová elektroforéza DNA .....	26
5.1.7. Vizualizace výsledku elektroforézy DNA.....	27
5.1.8. Test přítomnosti rekombinantní DNA ve vzorku pomocí PCR .....	27
5.1.9. Biolistika, přechodná exprese metodou „Gene-gun“ .....	30
5.1.10 Příprava expresních konstruktů ARPC1, ARPC2 s mCherry .....	33

5.2. Práce s proteiny .....	36
5.2.1. Příprava vzorku pro denaturující polyakrylamidovou elektroforézu .....	36
5.2.2. SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) ....	36
5.2.3. Vizualizace proteinů rozdělených na SDS-PAGE .....	38
5.2.4. Izolace a purifikace His-tag rekombinantních proteinů z bakterií .....	38
5.3. Práce s bakteriemi .....	41
5.3.1. Transformace bakterií rekombinantní DNA podjednotek ARP2/3 komplexu ...	41
5.3.2. Exprese His-tag rekombinantních proteinů v bakteriích <i>E.coli</i> Rosetta 2 a <i>E.coli</i> BL-21 .....	41
5.3.3. Možení bakterií za účelem maximální produkce rekombinantní DNA .....	42
5.3.4. Tvorba konzerv z bakterií .....	42
5.4. Práce s buňkami <i>Nicotiana tabacum</i> BY-2 .....	43
5.4.1. Udržování kultury <i>N. tabacum</i> BY-2 .....	43
5.4.2. Imunofluorescence .....	44
6. Výsledky .....	46
6.1. Exprese His-tag rekombinantních podjednotek ARPC1 a ARPC3 v <i>E.coli</i> .....	46
6.2. Stérická studie .....	50
6.3. In vivo lokalizace nadprodukovaných podjednotek ARP2/3 komplexu .....	53
6.4. Imunolokalizace .....	56
7. Shrnutí výsledků .....	66
8. Diskuze .....	68
9. Reference .....	72
10. Příloha .....	80

# 1. Abstrakt

ARP2/3 komplex je velmi dobře prostudovaný v případě živočichů, hraje klíčové úlohy v motilitě buněk a nitrobuněčných organel. Jeho defekty jsou spojeny s těžkými růstovými poruchami a letalitou u postižených buněk. Naproti tomu u rostlin nebyl zjištěn tak dramatický fenotyp mutací v ARP2/3 komplexu jako u živočichů. Je možné, že právě rozdílný způsob života rostlin a živočichů, přispívá k odlišným strategiím využití buněčného cytoskeletu, jehož je ARP2/3 komplex součástí. Tento vysoce konzervovaný komplex 7 proteinů je od kvasinek až po člověka využíván především k tvorbě aktinových vláken *de novo*, jeho pomocí vznikají složité aktinové sítě a někteří parazité jsou schopny jeho nukleační schopnosti, spojené s aktinem, zneužívat k aktivnímu pohybu uvnitř hostitelské buňky. Jelikož rostliny obklopuje buněčná stěna, bránící tak jejich aktivnímu pohybu, zároveň poskytující buňkám oporu a udělující tvar, bylo by nasnadě přemýšlet o tom, zda by ARP2/3 komplex v rostlinách mohl zastupovat i jiné funkce, které u živočichů neznáme. Pokud uvažujeme o odlišné životní strategii rostlin a živočichů, nemůžeme přehlédnout i to co obě říše spojuje. Tedy potřeba udržování integrity vezikulárního transportu a endomembránových procesů. Bez aktinové a tubulinové sítě by tyto procesy nemohly probíhat. Ovšem vzhledem k evoluční separaci rostlin a živočichů, mohou být některé proteiny, tedy i ARP2/3 komplex, být částečně funkčně zastoupeny jinými proteiny, případně jejich funkce plně převezmou. Kromě ARP2/3 komplexu existují i další proteiny s vlastností tvorby aktinových vláken „*de novo*“, patří mezi ně například forminy. U rostlin je známo, že disponují mnohem větším množstvím forminů, než živočichové a to by mohlo být dalším vodítkem, proč se mutanty ARP2/3 komplexu projevují jen ve zcela omezené míře, která neohrožuje rostlinu na životě. Mezi tyto mírné fenotypické znaky patří porušení morfologie laločnatých pokožkových buněk, zkroucení a zkrácení trichomů, nesouvislé vrstvy hypokotylových buněk a zkrácení a zvlnění kořenových vlásků. Předmětem této práce je analyzovat vybrané podjednotky ARP2/3 komplexu z hlediska jejich lokalizace a možných vazebných partnerů.

**Klíčová slova:** aktin, cytoskelet, ARP2/3 komplex, *Nicotiana tabacum*, BY-2

# 1. Abstract

ARP2/3 complex is well studied in case of animals, it plays key roles in motility of cells and intracellular organelles. Its malfunctions result in severe growth disorders and even lethality of affected cells. On the contrary, plant cells do not exhibit such dramatic phenotype of ARP2/3 complex mutations like it is by animals. It is possible that just the different life strategies of plants and animals contribute to differences in a way how animal and plant cells use their cytoskeleton, where ARP2/3 complex is its part as well. It is highly conserved 7 protein complex from yeast to human. Its main functions are creation of new “*de novo*” actin filaments, actin branched filaments network. Some of the parasite organisms are capable of misusing its nucleator activity to actively move inside of host cell. Because of the plant cells are surrounded by the cell wall, which give them support in creating various shapes and also hinders active movement of the whole cell body, it is likely that ARP 2/3 complex could be possibly involved in novel plant specific functions as well. If we think about the different life strategy of plants and animals we can not ignore all the things these two kingdoms have in common regarding to cytoskeleton processes. That is the need both for vesicular transport and endomembrane processes integrity maintenance. These processes could not exist without actin and tubulin filamentous network. Though because of the evolutionary separation of plants from animals, there can be some of the proteins (including those in ARP2/3 complex) partially or fully functionally substituted by other proteins. Besides of the ARP2/3 complex there are several other proteins with ability to nucleate actin filaments “*de novo*”, for example formins. It is known the plants have much more formins in their disposal than the animals have. That could be another clue why mutants in plant ARP2/3 complex do show only mild phenotype. These mild phenotype features include aberrant morphology of puzzle-like epidermal cells, twisting and shortening of trichomes, discontinuous hypocotyl cell layers and shortening or twisting of root hairs. Subject of this diploma thesis is to analyze selected ARP2/3 complex subunits in a matter of its localization and possible binding partners.

**Key words: actin, cytoskeleton, ARP2/3 complex, *Nicotiana tabacum*, BY-2**

## 2. Úvod

Rostlinný cytoskelet je stejně tak jako živočišný, velmi dynamickým systémem, který buňky využívají při různých procesech, majících za cíl udržet integritu buňky. Ta značně závisí na organizované dopravě buněčného materiálu do míst potřeby a od toho souvisejícího ovlivnění syntézy buněčné stěny. Buněčná morfologie u rostlin a další procesy jako vnitrobuněčná doprava váčků a endocytóza silně závisí na spolupráci složitých cytoskeletálních struktur. Také poloha organel, jako jsou mitochondrie nebo chloroplasty, je do velké míry určována jejich interakcí s cytoskeletem.

Protože se tato práce zabývá výzkumem na rostlinném materiálu, u kterého je existence intermediálních filamentů při nejmenším diskutabilní, rozumím tu pod pojmem cytoskelet pouze aktinovou a mikrotubulární složku.

Má práce se týkala především aktinového cytoskeletu a zaměřil jsem se v ní na analýzu tabákového ARP2/3 komplexu, který nebyl u dosud biochemicky charakterizován. Protože jsou k dispozici jen útržkovité informace o lokalizaci a možné funkci jednotlivých podjednotek ARP2/3 komplexu i komplexu jako celku, zvolil jsem si jako dva hlavní cíle této práce následující:

- 1. Lokalizace vybraných podjednotek ARP2/3 komplexu *in vivo***
- 2. Funkční analýza vybraných podjednotek ARP2/3 komplexu *in vitro***

Diplomová práce navazuje na již probíhající výzkum rostlinného ARP2/3 komplexu na katedře Experimentální biologie rostlin v laboratoři Buněčné biologie a biotechnologie rostlin pod vedením RNDr. Kateřiny Schwarzerové, PhD. Byl jsem součástí týmu věnujícího se ARP2/3 komplexu. Pro mé experimenty byly vybrány podjednotky ARPC1, ARPC2 a ARPC3, jako modelový organismus buňky *Nicotiana tabacum* linie BY-2, které byly chovány v suspenzní kultuře. Pro účely pozorování nadprodukovaných jednotlivých podjednotek ARP2/3 komplexu „*in vivo*“ jsem použil již



existující expresní vektory, které obsahovaly jednotlivé podjednotky ve fúzi s GFP a také jsem jich využil k přípravě vlastních expresních vektorů nesoucích ARPC1 a ARPC2 podjednotky ve fúzi s mCherry. Dále bylo třeba vytvořit expresní vektory, v kterých by byly rekombinantní podjednotky ARP2/3 komplexu označeny polyhistidinovou značkou. Poté by bylo možné jednotlivé podjednotky separovat díky afinitě histidinu k nikelnatým iontům imobilizovaným na koloně a následně s nimi provádět biochemická pozorování. Mezi zamýšlenými pozorováními byla například kosedimentace purifikovaných podjednotek s cytoskeletálními proteiny.

## **2.1 Aktinový cytoskelet**

### **2.1.1 Aktin**

Aktin je molekulou v první řadě známou díky své úloze při svalové kontrakci, kde je spolu s myosinem základní složkou kontraktálního aparátu. Další jeho funkce v buňce vyplývají ze skutečnosti, že je součástí cytoskeletu. Aktinová mikrofilamenta hrají roli při transportu membránových váčků skrz buňku, ukotvování organel, pohybu buněk, buněčném dělení, zpevnování buněčných struktur, podílejí se spolu s mikrotubuly na správné tvorbě buněčné stěny u rostlin a také jsou důležitá v ustanovení polarity buněk ve smyslu polarizované sekrece. Jeho známé funkce byly až do nedávna omezeny pouze na cytoplasmický prostor, avšak nedávné studie ukazují na jeho přítomnost v buněčném jádře a jako na možného vazebného partnera v komplexech remodelujících chromatin (Chen, Shen, 2007) a v komplexech tvořených RNA polymerasami (Hu et. al, 2004; Kukalev et. al, 2005). Ovšem jeho funkce v buněčném jádře ještě nebyla dostatečně prozkoumána.

## 2.1.2 Struktura aktinu

Je to globulární protein o velikosti téměř 42 kDa. Patří mezi vysoce konzervované proteiny lišící se od sebe jen nepatrně, pokud sledujeme jeho zástupce od řas až k člověku. U vyšších eukaryot bylo zjištěno několik až desítky genů pro aktin. U *H. sapiens* byly identifikovány 3 základní isoformy aktinu zapisované jako  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$ .  $\alpha$ -aktin se vyskytuje výhradně ve svalových buňkách, zatímco  $\beta$ -aktin a  $\gamma$ -aktin i v buňkách nesvalových (Herman, 1993). Hmotnostní spektrometrií (Jonsson et. al., 2001) z jaderné frakce bylo určeno, že aktin v jádře je isoforma  $\beta$ . U rostliny *A. thaliana* bylo nalezeno 8 isoform aktinu (McKinney et al., 2002). Aktin se vyskytuje ve dvou formách zvaných G a F-aktin, mezi nimiž může přecházet.

Jeho nepolymerizovaná forma jsou globulární bílkoviny aktinu (G-aktin) zatímco polymerní forma je tvořena mnoha propojenými aktinovými molekulami a vytváří tak filamentum. Takto poskládané aktinové molekuly nazýváme filamentární formou aktinu, tedy F-aktinem. Na vláknech rozlišujeme tzv. plus a minus konec. Plus konec je ta část vlákna, kde probíhá přidávání nových aktinových podjednotek a tedy i růst filamenta. Mínus koncem se rozumí opačný konec aktinového vlákna, kde probíhá zpravidla vypadávání aktinových podjednotek a zkracování aktinového filamenta.

Aktinová doména je konformací umožňující správnou ATPasovou funkci vytvořením ATP-vazebné kapsy uprostřed molekuly. Mezi jeho důležité vlastnosti patří vazba a hydrolýza ATP a s tím související tvorba a rozpad aktinových vláken. Pro jeho řádnou funkci jsou též zapotřebí  $Mg^{2+}$  ionty. Každá molekula G-aktinu má jedno vazebné místo pro ATP, které je situováno uprostřed molekuly a směřováno k minus konci pokud je inkorporován do aktinového filamenta.

Konformace monomerního aktinu ("actin fold") je dobře známa. Právě aktinová doména je strukturou spojující aktin a aktinu podobné proteiny ("actin related proteins") do jedné velké nadrodiny aktinu. Bylo identifikováno 11 podrodin aktinu podobných proteinů (ARPs), do nichž byly ARPs zařazeny podle sekvenční podobnosti s aktinem (Muller et. al., 2005).

Podíl aktinu na celkovém množství proteinů v buňce je až 5 %, ve svalových buňkách může jeho zastoupení dosáhnout hodnoty až 10% z celkového množství proteinů v buňce. Koncentrace aktinu v nesvalových buňkách se pohybuje od 0.1 do 0.5 mM. Ve specializovaných strukturách jako jsou mikroklky to může být až 5 mM. V rostlinných buňkách je koncentrace aktinu 0,1-1mM (Buchanan et al., 2000).

### 2.1.3 Stavba a vznik mikrofilament

Mikrofilamenta vznikají díky velkému množství nekovalentních interakcí, kdy dochází k přikládání aktinových monomerů k sobě za vzniku F-aktinu, tedy jeho polymerní formy. Mikrofilamenta jsou tvořena dvěma vlákny F-aktinu, které jsou okolo sebe obtočené. Tloušťka mikrofilamenta tvořeného dvojicí okolo sebe ovinutých aktinových vláken je přibližně 7 nm. Jejich délka je proměnlivá v závislosti na fyziologickém stavu buňky a mohou dosahovat délky až v řádech mikrometrů. Mikrofilamenta jsou polárními strukturami, kde je možné rozlišit tzv. plus a minus konec. Plus koncem nazýváme tu část filamenta, kde přidávání dalších aktinových monomerů probíhá rychleji než na druhém, minus konci. Aktinová mikrofilamenta vyžadují při svém vzniku a dalšímu větvení přítomnost ARPs ("actin related proteins"). Například ARP2/3 komplex poskytuje počátek z kterého probíhá napojování dalších, už aktinových, podjednotek mikrofilamenta (Mullins et.al, 1998). V případě větvených mikrofilament je v určitých oblastech inkorporován komplex ARP2/3, který umožňuje, svým podélným přiložením k filamentu a následnou adicí dalších aktinových podjednotek k sobě, tvorbu větvení aktinového vlákna, kdy bočné vlákno se od "mateřského" odchyluje o 70° (Pollard, Borisy, 2003). Takovým způsobem pak mohou vznikat různě složité sítě, k jejichž dokonalosti a zpevnění pak přispívají aktin vázající proteiny jako například filamin,  $\alpha$ -actinin nebo fimbrin.

Mezi další důležité proteiny podporující polymeraci aktinu a vznik mikrofilament patří forminy, které se při vzniku a organizaci mikrofilament v rostlinách uplatňují v mnohem větší míře než u živočichů. Forminy jsou v rostlinné říši velice slibnou rodinou cytoskeletálních proteinů, vyskytujících se v genomu například u *Arabidopsis thaliana* v

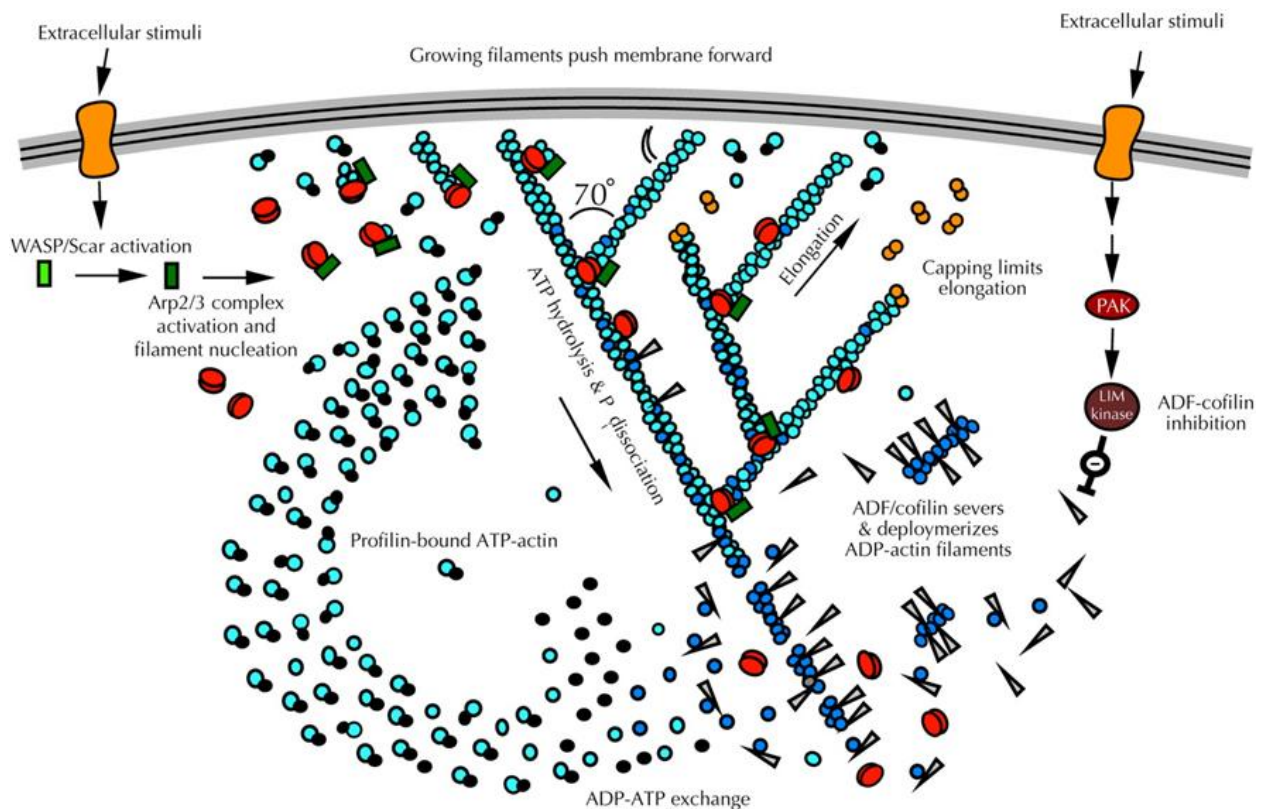
počtu až 20 genů, jejichž funkční produkty nebyly plně charakterizovány. Kromě nukleační aktivity mají i funkci organizace aktinových vláken do “kabelů” jejich příčným propojováním mezi sebou do paralelních svazků (Ingouff *et al.*, 2005). Nedávné studie ukazují na existenci několika dalších proteinů účastnících se nukleace aktinu jako jsou Cordon bleu (Cobl), Leiomodin (Lmod), Spire, APC a JMY (Chesarone a Goode 2009, Firat-Karalar a Welch 2011). Jejich funkce zatím nejsou plně objasněny, ale jejich společným znakem je přítomnost WH2 domény, která jim uděluje afinitu k aktinu. U rostlin nebyly tyto proteiny dosud zjištěny.

#### **2.1.4 Dynamika aktinu**

V cytoplazmě eukaryotických buněk je vždy určité procentu aktinu v G-formě a F-formě. Například v buňkách kukuřice je pouze 10% aktinu ve formě F-aktinu a u buněk tabáku je to ještě méně, předpokládá se cca 1-2% ve formě F-aktinu (Steiger, Blanchoin, 2006). Přidávání aktinových podjednotek do mikrofilamenta je buňkou řízeno dle potřeby pomocí aktin vázajících proteinů, které svojí přítomností zvyšují či snižují kritickou koncentraci aktinu, což je právě taková koncentrace aktinu, která je nutná pro jeho polymeraci a tvorbu mikrofilament. Filament treadmilling je proces popisující dynamiku aktinového vlákna, kdy nedochází k změně celkové délky, ale k rovnovážnému stavu, kde se počet monomerů přidaných k plus konci vyrovná počtu monomerů aktinu opuštějících minus konec.

Mezi proteiny vázající aktin uplatňující se v regulaci dynamiky aktinu u živočichů patří profilin a thymosin. Thymosin vyvazuje aktinové monomery, tím znemožňuje polymeraci do F-aktinu a zároveň brání hydrolýze či výměně vázaného nukleotidu. Naopak profilin kompetuje s thymosinem o aktinové monomery a pokud monomery naváže, blokuje místo kterým by se normálně mohly vázat k minus konci a tím způsobuje adici aktinových monomerů přednostně k plus konci, tedy podporuje růst F-aktinu. Po navázání aktin-profilinového komplexu k F-aktinu dojde k vlivem změny konformace k oslabení vazby mezi profilinem a aktinem a následnému uvolnění profilinu. Po přidání aktinových podjednotek do filamenta dochází po určité době

k hydrolyze vázaného ATP a vzniku ADP-F-aktinu, jehož přítomnost činí danou oblast méně stabilní a je příčinou postupného rozpadu mikrofilamenta. U rostoucího mikrofilamenta můžeme tedy najít na rostoucím, plus-konci, ATP-F-aktin neboť nově navázané aktinové podjednotky ještě nestihly hydrolyzovat ATP zatímco co zbytek "starého" filamenta je tvořen již ADP-aktinem. Mikrofilamenta in vivo procházejí velmi rychlými změnami v růstu. Jednu chvíli rostou rychle, jindy se zastaví a nebo dojde k jejich rapidnímu odbourání. Tyto děje jsou buňkou velice dobře regulovány pomocí aktin vázajících proteinů. Mezi další aktin vazebné proteiny ,ovlivňující aktinovou dynamiku, patří takové, které se váží podél filamenta (tropomyosin, cofilin) nebo se připojují ke koncům filamenta. Jako příklad lze uvést proteiny CapZ a tropomodulin, kde CapZ se váže k plus konci a tropomodulin k minus konci F-aktinu. Vliv těchto aktin vázajících proteinů je buď stabilizační (tropomyosin) nebo urychlují rozpad aktinového vlákna (cofilin). Aktin vázající proteiny (Dos Remedios, 2003) lze rozdělit do několika skupin, podle toho jakým způsobem se váží k aktinu. Jednou skupinou jsou proteiny přikládající se podélně k aktinovému filamentu (gelsolin, ARP2/3 komplex), další skupinou jsou tzv. čapkové proteiny (z angl. "capping proteins"), neboli proteiny připojující se ke koncům filament (capZ, tropomodulin) a poslední skupinou jsou takové, které váží monomery aktinu a regulují tak jejich dostupnost pro polymeraci do filament (thymosin, profilin).



Obr.1 Převzato z (Miller , 2002)

Dendritický model vzniku aktinových vláken a rozvětvených aktinových sítí. Pomocí proteinů WASP/Scar je aktivován ARP2/3 komplex, který spolu s aktinem vytváří ternární komplex. Tento ternární komplex je pak počátkem růstu nového filamenta. V případě přiložení takto aktivovaného ARP2/3 komplexu k boku již existujícího filamenta dojde k tvorbě větvení, které se od mateřského vlákna odchyluje o 70 stupňů. Na obrázku je dále vyznačena závislost mezi přítomností ATP v aktinu a stabilitou vlákna. Také jsou zde uvedeny důležité proteiny pro dynamiku mikrofilament, profilin a ADF/cofilin, které povzbuzují prodlužování aktinových vláken (profilin) , nebo naopak způsobují stěpení vláken na menší fragmenty (ADF/cofilin), které mohou být buňkou využity k tvorbě nových aktinových vláken rychleji, než kdyby buňky vyráběla vlákno od základu nové. Znázorněny jsou též čapkové proteiny („capping proteins“), které mohou svou přítomností vlákno stabilizovat a zabránit jeho dalšímu prodlužování. ARP2/3 komplex je znázorněn červenou barvou, ATP-aktin světle modrou, ADP-aktin tmavě modrou, profilin černou, ADF/cofilin pomocí černého trojúhelníku a aktivátory ARP2/3 komplexu WASP/Scar zeleným obdélníkem.

## 2.1.5 Aktin vazebné proteiny

Rozepíšu se tu krátce a obecně o celé množině aktin vazajících proteinů. Polymerace a depolymerace aktinu v buňce je řízena velkým množstvím aktin vazajících proteinů, které mohou dynamiku aktinu ovlivňovat různými způsoby. Mohou přispívat ke vzniku aktinových filament sestavením nukleačního centra (ARP2/3 komplex), dále jsou schopny štěpit filamentum na menší (gelsolin, cofilin), čímž urychlují přestavení aktinového skeletu, uplatňují se při vzniku složitějších mikrofilamentálních uspořádání jako jsou aktinové sítě (ARP2/3 komplex) či stresová vlákna a také disponují tzv. sequestrační aktivitou (thymosin, profilin), nebo-li schopností vázat monomerní aktin takovým způsobem, který buďto brání polymeraci omezením dostupnosti G-aktinu (thymosin), nebo podporuje přidávání G-aktinu k plus koncům filament, čímž polymeraci napomáhá (profilin). Většina z nich vytváří pouze binární komplex spolu s aktinem, ale některé i ternární.

Aktin vazající proteiny o vazbu s aktinem většinou kompetují (u živočichů: profilin, thymosin). Profilin byl u rostlin prokázán, kdežto thymosin nikoliv. Protože mezi ně patří obrovský počet proteinů, které jsou mnohdy co do struktury zcela odlišné, není rozdělení aktin vazebných proteinů do hierarchicky odlišených skupin jednoduchou záležitostí. Spíše by to vzhledem k velkému počtu členů, nebylo praktické. Nabízí se možnost rozčlenit je podle toho, zda se váží k monomernímu či polymernímu aktinu a podle toho jaký mají efekt na dynamiku aktinu.

Dos Remedios s kolegy ve svém review (Dos Remedios et. al., 2003) takto rozdělili aktin vazebné proteiny do 7 skupin:

1. Monomer-vazající proteiny, které brání polymeraci aktinu  
(např. thymosin  $\beta$ 4, DNase I)
2. Filamentum-depolymerizující proteiny (např. CapZ, cofilin)
3. Tzv. čapkující proteiny, které se váží na plus a mínus konce filament  
(např. CapZ, tropomodulin)

4. Proteiny vážící se ke stranám filamenta, čímž způsobují jeho rozdělení na kratší filamenta (např. gelsolin)
5. Proteiny, které obsahují alespoň dvě vazebná místa pro aktin a vytváří tak aktinové sítě (např. ARP2/3, fimbrin)
6. Stabilizační proteiny, které se váží ze strany k filamentu a brání jeho rozpadu. (např. tropomyosin)
7. Motorové proteiny, které využívají F-aktin jako dráhu po které se pohybují. (myosiny)

Z předcházejícího výčtu příkladů je nutno říci, že rostliny nedisponují některými z uvedených proteinů a to: thymosin, CapZ, tropomodulin.



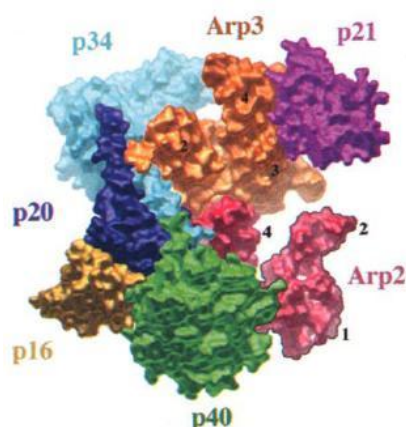
## 3. ARP2/3 komplex

### 3.1 Struktura ARP2/3 komplexu

ARP2/3 komplex se skládá z 7 podjednotek a je vysoce konzervovanou strukturou od kvasinek až po člověka. Mezi podjednotky patří 2 proteiny z rodiny Actin related proteins ARP2 a ARP3 a dalších 5 mezi sebou nepříbuzných proteinů ARPC1-ARPC5. Vysokou konzervovanost komplexu dokresluje i to, že mezi různými organismy má vždy 7 podjednotek, které se dají mezidruhově kombinovat a vždy je výsledkem funkční ARP2/3 komplex. Takovéto pokusy byly provedeny například mezi kvasinkovými-rostlinnými podjednotkami a rostlinnými-živočišnými podjednotkami (Hussey et al.,2006).

Poprvé byl izolován z organismu *Acanthamoeba castellanii* díky své vysoké afinitě pro aktin vázající protein profilin (Machesky et al.,1994). Následně byl izolován i z dalších organismů včetně člověka a kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (Welch et al.,1997a, Ma et al. 1998, Rohatgi et al.,1999, Winter et al., 1997). Na obr. 2 je uvedena krystalová struktura hovězího ARP2/3 komplexu.

Jelikož bylo názvosloví podjednotek zpočátku zavádějící, díky různé molekulové hmotnosti podjednotek u různých druhů organismů, bylo ustoupeno od pojmenovávání podle molekulové hmotnosti a zavedl se termín ARPC=ARP2/3 complex component. Tedy například místo p40 používáme nyní výraz ARPC1 a pro nejmenší podjednotku místo p16 je užíváno ARPC5 (Pollard et al., 2000).



Obr.2 Model krystalové struktury hovězího ARP2/3 komplexu. Převzato z (Robinson et al., 2001). Na modelu lze vidět barevně odlišené podjednotky ARPC1 (p40), ARPC2 (p34), ARPC3 (p21), ARPC4 (p20), ARPC5 (p16) a ARP3 s ARP2.

**Table 1.** Comparison of amino-acid similarity of *Arabidopsis* ARP2/3 complex subunits with their counterparts from other organisms

Subunit	AtDB Acc. No	% amino-acid identity					
		Ce	Dd	Dm	Hu	Sc	Sp
ARP2	At3g27000	60	63	61	62	57	53
ARP3	At1g13180	56	59	57	59	53	55
*ARPC1a	At2g30910	39	43	37	41	34	34
*ARPC1b	At2g31300	38	43	24	42	34	34
**ARPC2	At1g30825	—	33	26	26	28	26
ARPC3	At1g60430	41	41	40	47	39	43
ARPC4	At4g14140	48	68	61	57	—	49
ARPC5	At4g01710	32	31	35	32	43	25

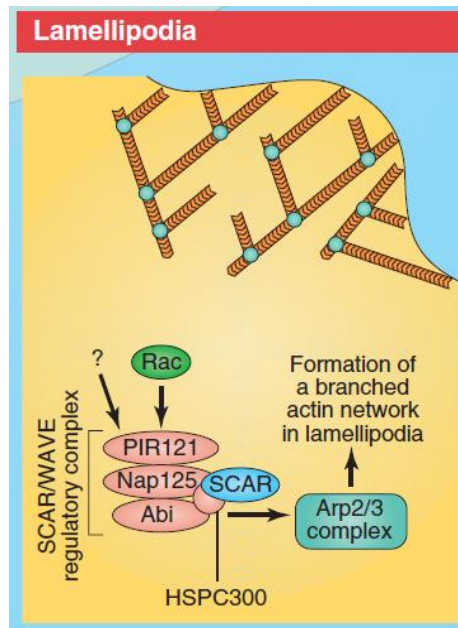
Ce, *Caenorhabditis elegans*; Dd, *Dictyostelium discoideum*; Dm, *Drosophila melanogaster*; Hu, Humans; Sc, *Saccharomyces cerevisiae*; Sp, *Schizosaccharomyces pombe*.  
 \*The ARPC1/p41 homolog is encoded by 2 genes (designated a and b) arranged in reverse orientation and in close proximity.<sup>(6,7)</sup>  
 \*\*Two genes are also reported for the ARPC2 Subunit in *Arabidopsis* (ATARPC2B) and rice (OSARPC2B).<sup>(9)</sup>

Převzato z (Mathur, 2005).

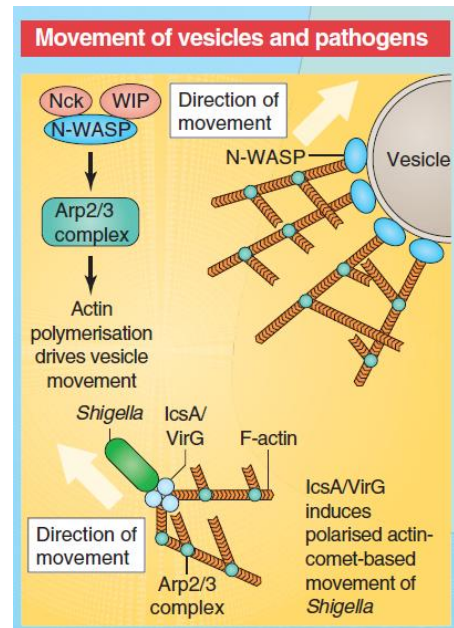
Tab. 1 Ukazuje srovnání podobnosti aminokyselinové sekvence podjednotek ARP2/3 komplexu z *A. thaliana* vůči jejich protějškům v jiných organismech. Potvrzuje vysokou konzervovanost podjednotek ARP2/3 komplexu napříč druhovým spektrem organismů. U jednotlivých podjednotek jsou uvedeny hodnoty v % podle toho, do jaké míry je jejich sekvence příbuzná ostatním organismům, uvedeným v tabulce.

### 3.2 Funkce ARP2/3 komplexu v živočišných a kvasinkových buňkách

U živočichů byla zdokumentována řada procesů, v kterých hraje ARP2/3 komplex zásadní roli a jeho nedostatek znamená pro buňky smrt, nebo vážné růstové poruchy. Mezi již známé funkce patří „*de novo*“ vznik aktinových filament a tvorba aktinových větvení. Právě této vlastnosti využívají buňky k tvorbě tzv. „patches“, což jsou velmi jemné sítě aktinových vláken, umístěných v blízkosti plazmatické membrány buněk. Jsou důležité pro endocytické pochody, buněčné pohyby (tvorba lamelipodií, podosomů, invadopodií), případně pro migraci celých buněk při imunitních reakcích či obnově tkání. Také je důležitý pro pohyb váčků skrz buňku a jest využíván některými patogeny. Byl nalezen nitrobuněčný parazit *Listeria monocytogenes*, disponující proteinem ActA, který zneužívá možnosti ARP2/3 závislé polymerace aktinu k aktivnímu pohybu uvnitř hostitelské buňky polymerací aktinu na jednom z pólů buňky (Welch et al., 1997b). Dalším takovým parazitem využívajícím ARP2/3 polymeraci aktinu je *Shigella* (Egile et al., 1999) nebo enteropatogenní *E. coli*, která svými proteiny aktivuje v hostitelské buňce ARP2/3 závislou polymeraci aktinu, která vede k tvorbě podstavce, kterým se *E.coli* nechá částečně obrůst a zvýší tak svou adhezi ke tkáni (Caron et al., 2006).

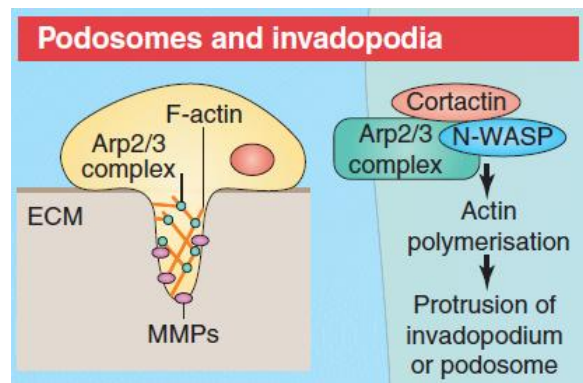
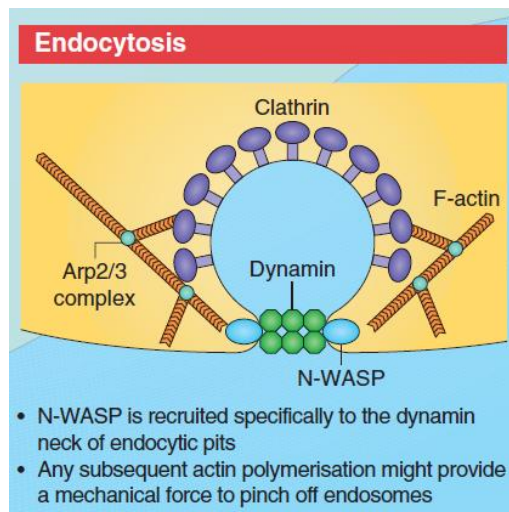


Obr.3



Obr.4

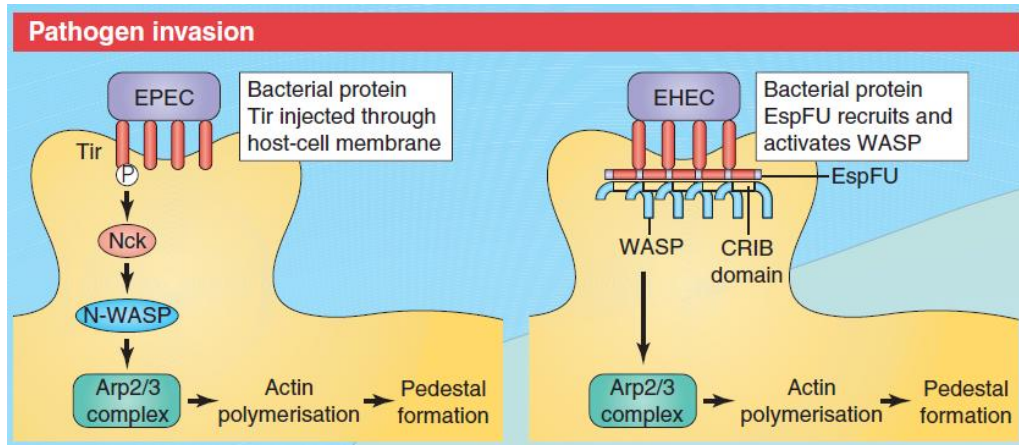
Převzato z (Pollit et al., 2009) Obrázek č. 3 ukazuje hlavní cestu aktivace ARP2/3 komplexu prostřednictvím aktivátotového komplexu SCAR/WAVE, který za pomoci klíčových proteinů HSPC300 a SCAR aktivuje ARP2/3 komplex a činí ho tak vysoce afinní pro aktin, na tomto obrázku se toho využívá k tvorbě aktinových větvení v lamelipodiích, pomocí kterých dochází k migraci buněk. Obrázek č. 4 popisuje v horní části aktivaci ARP2/3 komplexu, který způsobí lokální polymeraci aktinu, čehož je využito k pohonu váčků, jejichž povrch osídlil aktivační komplex proteinů N-WASP. Ve spodní části je pak popsáno využívání ARP2/3 závislé polymeraci aktinu k aktivnímu pohybu parazita *Shigella* uvnitř hostitelské buňky. Jako aktivátor ARP2/3 komplexu využívá *Shigella* své vlastní proteiny IcsA/VirG.



Obr. 6

Obr.5

Převzato z (Pollit et al., 2009) Obrázek č. 5 ukazuje využití polymerace aktinu, která poskytuje dodatečnou mechanickou sílu k odtržení clathrinového váčku při endocytických pochodech. Aktivátor ARP2/3 komplexu N-WASP je soustředěn ve vznikajícím zaškrvení plazmatické membrány do stejného místa, kde se vyskytuje dynamin. Následně dochází k polymeraci aktinu na směrem od ARP2/3 komplexu. Obrázek č. 6 vysvětluje použití ARP2/3 závislé polymerace aktinu při tvorbě podosomů a invadopodií, které jsou vytvářeny při pohybu buněk tkáněmi či vnikání rakovinných buněk do tkání. Využito je opět aktivátoru N-WASP.



Obr. 7

Převzato z (Pollit et al., 2009) Obrázek č. 7 popisuje v levé i pravé části úlohu ARP2/3 závislé polymerace aktinu při formování podstavce, kterým se enteropatogenní bakterie obalují při své adhezi na povrch střevních epitelů. Bakterie produkují proteiny Tir a EspFU, které aktivují nepřímo (levá část obrázku) nebo přímo (pravá část) a váží k sobě aktivátor N-WASP, díky kterému může proběhnout ARP2/3 závislá polymerace aktinu.

V kvasinkách byla doložena přítomnost ARP2/3 komplexu v membránových procesech buňky jako je tvorba vesikulu v trans-Golgi (Carreno et al., 2004), regulace transportu váčků mezi ER a Golgi (Luna et al., 2002; Matas et al., 2004), fúzi vakuol (Eitzen et al., 2002) a endocytóza (Merrifield, 2004; Ayscough, 2005). Také pohyb mitochondrií a jejich morfologie, nesou značné difference, při mutovaných ARP2 a ARPC1 genech, oproti nenarušené funkci těchto genů (Boldogh et al., 2001).

V dalších modelových organismech jakými jsou *C. elegans* a *D. melanogaster* byla důležitost ARP2/3 komplexu potvrzena poukazujíc na vážné vady v embryonálním vývoji mající za důsledek smrt embrya (Hudson a Cooley, 2002). V případě *C. elegans* bylo podáváním RNAi proti jednotlivým podjednotkám ARP2/3 komplexu dosaženo inhibice migrace hypodermálních buněk (Sawa et al., 2003). Dále mutanti v genech pro ARPC1 a Scar způsobily u *D. melanogaster* poruchy v rozmístování interfázového jádra, jaderné morfologie a narušení normálního rozmístění AF během oogeneze (Zallen et al., 2002). Vyřazení genů pro Scar/WAVE má za následek inhibici tvorby lamelopodií a filopodií u buněčných kultur *D. melanogaster*. Také bylo ukázáno, že v takovýchto buňkách klesl podíl F-aktinu (Biyasheva et al., 2004). Pokles v populaci F-aktinu byl také zjištěn v případě *D. discoideum* s porušeným genem pro Scar. Kromě poklesu F-aktinu byla zaznamenána redukce procesů jako makropinocytóza, fagocytóza a tvorba endosómů (Seastone et al., 2001).

Jelikož jakékoliv zásahy do ARP2/3 komplexu mají za následek deregulaci F-aktinu a na něm závislých membránových procesů, setkáváme se u živočišných a kvasinkových buněk se silnou fenotypovou odezvou, která se projeví buďto zastavením růstu, nebo smrtí organismu.

### 3.4. Funkce ARP 2/3 komplexu v rostlinách

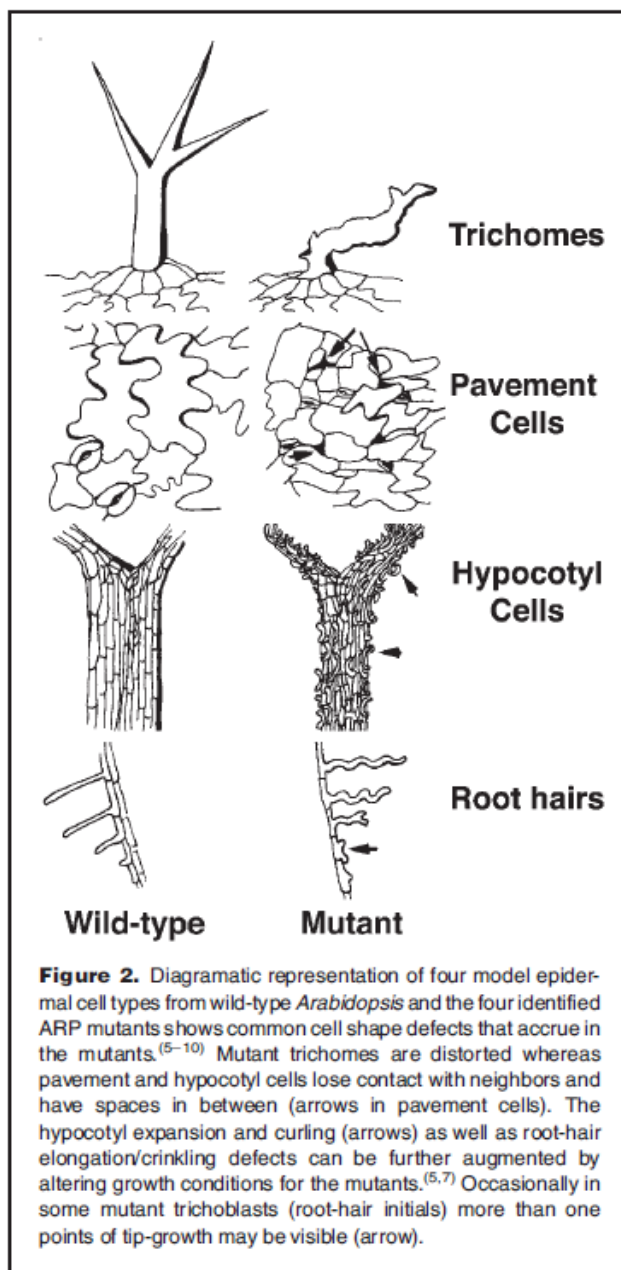
Rostlinné buňky však, na rozdíl od živočišných či kvasinkových, nevykazují silný fenotyp v případě narušení genů pro ARP2/3 komplex, nebo jeho aktivační dráhy Scar/WAVE. Jelikož nebyl rostlinný ARP2/3 komplex dosud izolován a biochemicky charakterizován, nezbývá než usuzovat na jeho funkce z analýzy mutantů, kteří vykazují podobný fenotyp. Tyto mutanty řadíme do tzv. skupiny „DISTORTED“. Jedná se o mutanty *A. thaliana*, u kterých byla společným znakem deformace trichomů, defekty v morfologii pokožkových buněk a odlupování hypokotylových epidermálních buněk. Některé z těchto efektů poruchy ARP2/3 komplexu mohou vyvolat i aktin depolymerující drogy (Mathur et al., 1999, Saedler et al., 2004). Kromě výše popsanych změn, pozorovali někteří vědci i narušení morfologie a růstu kořenových vlásků (Mathur et al., 2003). Mutantní formy pro geny kódující ARPC1 a ARPC3 podjednotky se zatím nepodařilo zjistit. Spekuluje se o tom, že by tyto mutace mohli být pro embryo letální stejně tak jako pro živočichy (Deeks a Hussey, 2005).

Podjednotka	Mutace	Publikováno v
ARP2	wurm	Le et al., 2003, Li et al., 2003, Mathur et al., 2003
ARP3	distorted1	Le et al., 2003, Li et al., 2003, Mathur et al., 2003
ARPC1	není známa	.....
ARPC2	distorted2	Saedler et al., 2004, El Assal et al., 2004
ARPC3	není známa	.....
ARPC4	.....	Li et al., 2004
ARPC5	crooked	Li et al., 2003, Mathur et al., 2003
SCAR2	distorted3, itb1	Basu et al., 2005, Zhang et al., 2005
NAP1	gnarled	Brembu et al., 2004, El Assal et al., 2004, Deeks et al., 2004
PIR121	pirogi	Basu et al., 2004, Brembu et al., 2004
HSP300	brick1	Brembu et al., 2004, Djakovic et al., 2006, Le et al., 2003

Tab.2



Tabulka č.2 podává přehled popsanych mutantů v ARP2/3 komplexu a Scar/WAVE komplexu (převzato z Fišerová, Ph.D. thesis, Charles University in Prague, 2006).



Obr. 8

Převzato z (Mathur, 2005)

Obrázek č.8 ukazuje společně znaky mutantů ze skupiny DISTORTED. Jedná se především 1. o tvorbu kratších, zdeformovaných trichomů, 2. porušení morfologie

pokožkových buněk, 3. tvorba nesouvislé vrstvy hypokotylových buněk, 4. kratší a zvlněné kořenové vlásky.

Jelikož rostlinná embrya nevykazují zásadní vývojové defekty v případě mutovaných podjednotek ARP2/3 komplexu, ani se tato skutečnost nijak výrazněji neprojevuje na dospělé rostlině, můžeme z toho vyvodit teoreticky 2 závěry.

Buďto je funkce ARP2/3 komplexu ve zbytku rostlinného organismu plně nahrazená jinými proteiny (například forminy), nebo se účastní jiných dosud nepopsaných procesů, které mohou interferovat s normálním vývojem pozorovaných mutantních fenotypů. Rostliny nejsou narozdíl od živočichů závislé na funkcích ARP2/3 komplexu spojených s motilitou a tudíž by v průběhu evoluce mohlo dojít i k získání nových funkcí, které by byly pro rostlinou buňku „užitečnější“. Může se jednat o funkci komplexu jako celku, nebo by mohly některé jeho podjednotky fungovat samostatně, případně v komplexu s jinými proteiny.

Ovšem pozorovaný fenotyp deklaruje důležitost ARP2/3 komplexu minimálně ve vztahu morfologie trichomů, pokožkových buněk, hypokotylových buněk a kořenových vlásků. Jelikož je morfologie rostlinné buňky určena výhradně způsobem syntézy a ukládání buněčné stěny, vysvětluje se pozorovaný fenotyp narušením polarizované sekrece (Yuan Qina, Zhenbiao Yang, 2011). A i když není narušena biosyntéza buněčné stěny, je její růst nerovnoměrný a membránový transport vedoucí k povrchu buňky do jisté míry disregulovaný. Skutečně byla zjištěna změněná distribuce F-aktinu v buňkách trichomů a taktéž pokles tzv. „actin patches“, které jsou pro membránovou dopravu důležité (Hepler et al., 2001; Qualmann et al., 2000)

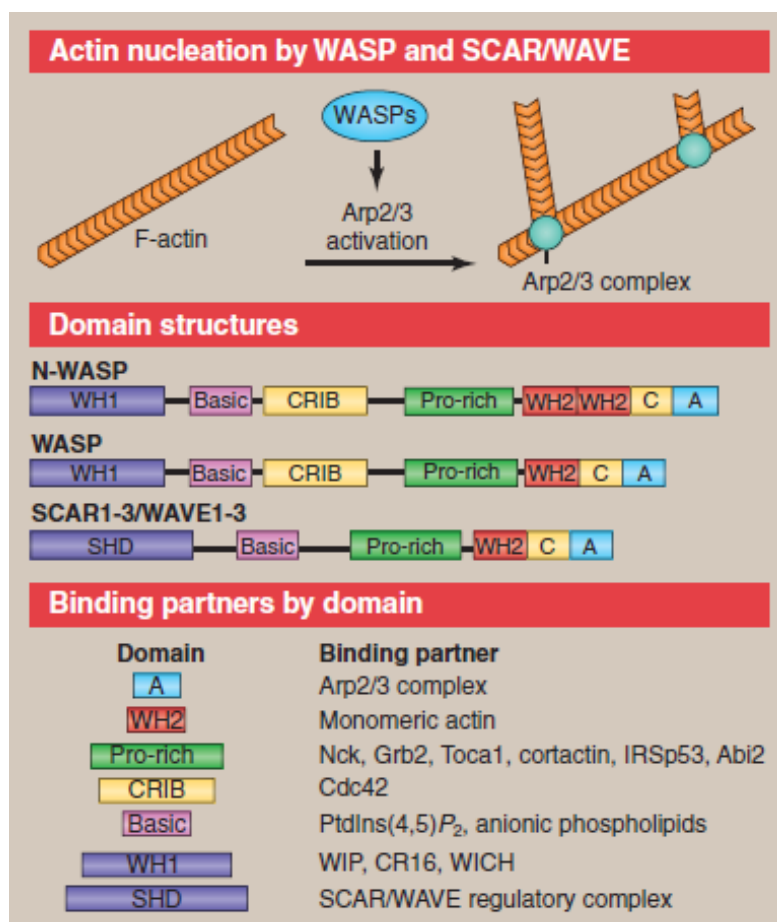
Dynamická síť aktinových „patches“ je přítomna jak ve vrcholově rostoucích kořenových vláscích, pylových láčkách, trichomech, tak v difúzně rostoucích buňkách jako jsou pokožkové nebo hypokotylové buňky (Fu et al., 2001, 2002; Jones et al., 2002). K regulaci těchto aktinových struktur přispívá skupina Rho GTPasám podobných proteinů, které jsou specifické pro rostliny a označují se souhrnným názvem jako ROP GTPasy z angl. „Rho related GTPases of plants“ (Fu et al., 2001; Gu et al., 2003; Lee et al., 2008)

### 3.5. Aktivace ARP2/3 komplexu

ARP2/3 komplex sám o sobě postrádá plnou aktin nukleující aktivitu, hlavně díky tomu, že ARP2 a ARP3, které jsou v neaktivním komplexu příliš daleko od sebe nemohou simulovat aktinový dimer, ke kterému by mohlo pokračovat další přidávání monomerního buněčného aktinu. Tedy aby začalo vznikat aktinové filamentum, je zapotřebí nejen přítomnosti ARP2/3 komplexu, ale i dalších proteinů, které způsobí svou vazbou konformační změny v rámci ARP2/3 komplexu, které ho uvedou z inaktivní do aktivní formy. Takovéto proteiny obecně nazýváme nukleační faktory (z angl. nucleating promoting factors), řadí se mezi ně proteiny a proteinové komplexy jako WASP, N-WASP, Scar/WAVE, Abp1p, Pan1p.

V případě živočichů je ARP2/3 komplex aktivován především pomocí WASP, N-WASP (Yarar et al., 1999; Rohatgi et al., 1999) a Scar/WAVE (Ibarra et al., 2005). U kvasinek byla aktivace podporována činností Abp1p, Pan1p (Duncan et al., 2001).

U rostlin je znám pouze jeden aktivátor ARP2/3 komplexu a tím je Scar/WAVE (Machesky and Gould, 1999). Scar/WAVE funguje jako komplex sestávající se z dalších 4 proteinů, HSP300, Nap1, Abi1, Pir121 (Brembu et al., 2004; Eden et al., 2002; Gautreau et al., 2004; Innocenti, 2004). V současnosti převládá pozitivní model regulace, kdy funkce NPF (WASP, N-WASP, Scar/WAVE) je stimulována vazbou malých proteinů patřících do skupiny GTPas (Steffen et al., 2004; Innocenti et al., 2004).



Obr.9

Převzato z (Pollit et al., 2009) Obrázek 9 popisuje strukturu NPFs („nucleation promoting factors“) s důrazem na důležité vazebné domény pro potřebné pro aktivaci ARP2/3 komplexu. Zcela zásadní jsou domény WH2, které váží aktin, dále domény A vážící ARP2/3 komplex a domény CRIB, jejichž vazebným partnerem je protein Cdc42 ze skupiny malých GTPas, které hrají klíčovou roli v regulačních pochodech. U rostlin známe pouze SCAR/WAVE závislou aktivaci ARP2/3 komplexu.

## **4. Materiál**

### **4.1. Bakterie *E.coli* DH5- alfa**

K množení DNA za účelem její extrakce byly užívány bakterie *E.coli* linie DH5 alfa pěstované v médiu LB (1% pepton-soja, 0.5% kvasniční extrakt, 1%NaCl, pH=7.5) při 37°C.

### **4.2. Bakterie *E.coli* Rosetta- 2**

Za účelem exprese rekombinantních proteinů byla použita kultura *E.coli* linie Rosetta 2, která byla pěstována v tekutém LB médiu při 37°C.

### **4.3. Bakterie *E.coli* BI- 21**

Linie BI-21 *E. coli* byla taktéž použita pro produkci rekombinantních proteinů. Bakterie byly pěstovány na tekutém LB médiu při 37°C.

### **4.4. Rostlinné buňky *Nicotiana tabacum* BY- 2**

Rostlinné buňky tabáku linie Bright yellow (BY-2) byly vybrány pro pokusy týkající se imunolokalizací, přechodných expresí rekombinantních proteinů pomocí biolistiky. Suspenze buněk *Nicotiana tabacum* BY- 2 byla pěstována v Erlenmayerových baňkách v 30 ml tekutého media MS (složení v tabulce č.3) při 25°C v temné komoře za současného třepání (Nagata et. al, 1992). Buňky byly pasážovány 1x týdně. 1ml týden staré suspenze bylo dáno do 30 ml čerstvého média v nové Erlenmayerově baňce.

## 5. Metody

### 5.1 Práce s DNA

#### 5.1.1. Příprava rekombinantních proteinů

Pro rekombinantní podjednotky ARP2/3 komplexu obsahující poly-histidinovou značku byl použit vektor pET28b, který byl modifikován restričním štěpením a následnou ligací inzertu způsobem zajišťujícím vznik rekombinantního proteinu s His-tag na N-konci. Takto byly připraveny podjednotky ARPC1, ARPC2 a ARPC3. Tyto konstrukty již byly k dispozici, zhotoveny mými předchůdci.

#### 5.1.2. pET28b vektor

Plastid od firmy NOVAGEN (katalogové č. 69865-3), byl použit pro expresi podjednotek ARP2/3 komplexu v bakteriích (podrobná mapa viz. příloha). Vektor obsahuje lac operator, sloužící k inaktivaci exprese vloženého genu v nepřítomnosti IPTG. V přítomnosti IPTG dochází k jeho vazbě na represor lac operonu a uvolní DNA pro RNA polymerasu, která začne s transkribcí vloženého genu. Dále obsahuje 2 sekvence kódující 6 za sebou se opakujících histidinů, které jsou umístěny na opačných koncích polyklonovacího místa (z anglického multi cloning site). Dále obsahuje plastid T7 promotor a terminátor, jejichž sekvence jsem využil pro kontrolní sekvenci konstruktů. Kódována je též rezistence k antibiotiku kanamycin.

#### 5.1.3. Příprava podjednotek ARP2/3 komplexu ve fúzi s GFP nebo mCherry

Pro pokusy s imunolokalizací a přechodnou expresí byly zhotoveny konstrukty ARPC1, ARPC2, ARPC3 ve fúzi s GFP (Green fluorescent protein) a mCherry, které byly klonovány do expresního vektoru pGreen. Používány byly výhradně N-terminální fúze proteinů s GFP a mCherry, a to ze sterických důvodů. ARPC1-GFP, ARPC2-GFP,

ARPC3-GFP byly zhotoveny mými předchůdci, kdežto ARPC1-mCherry, ARPC2-mCherry a ARPC3-mCherry jsem připravil samostatně.

#### **5.1.4 Vektor pGreen s GFP nebo mCherry**

Vektor pGreen 0029 (podrobná mapa v příloze) je binární vektor nesoucí kanamycinovou rezistenci, gen lacZ pro modrobílou selekci a polyklonovací místo. Vektor upravený v naší laboratoři (L. Fischer, nepublikováno) nese dále sekvenci pro GFP nebo mCherry, tak aby po vložení insertu byly tyto fluorescenční proteiny na N-konci vznikajícího fúzního proteinu.

#### **5.1.5 Izolace plasmidové DNA**

Izolace plasmidové DNA se prováděla 2 způsoby. Pokud bylo potřeba získat DNA v malém množství při maximální čistotě pro potřeby sekvenování a dalších molekulárně biologických manipulacích, byla DNA z bakteriální suspenze získána kitem MINIPREP od firmy FERMENTAS. Pokud bylo potřeba DNA větší množství a nezáleželo tolik na její čistotě, například v případě přípravy biolistických náplní, byla DNA z bakterií získána kitem MIDIPREP (JETSTAR 2.0, 210250) od firmy GENOMED.

Princip izolace v obou případech vychází ze skutečnosti, že DNA v alkalickém prostředí denaturuje a při neutralizaci a následné renaturaci DNA, zrenaturuje pouze malá plasmidová kruhová DNA, kdežto chromosomální dlouhá DNA zůstává v denaturované podobě a lze ji ze vzorku odstředit a odstranit. Získaná plasmidová DNA je pak k dispozici v poměrně čisté podobě a lze ji dále zakoncentrovat pomocí sražení v isopropylalkoholu a následném sušení a rozpuštění v malém množství vody.

#### **5.1.6. Agarosová elektroforéza DNA**

Za účelem izolace a ověření přítomnosti fragmentu DNA po kontrolních PCR („polymerase chain reaction“) či restričních štěpeních byla prováděná elektroforéza v agarosovém gelu o koncentraci 1.2% v 0,5x koncentrovaném TAE pufru. Elektroforéza probíhala horizontálně 40 min při napětí 100V. DNA byla vizualizována fluorescenčním

barvivem GelRed o koncentraci 10  $\mu\text{l}/100\text{ ml}$  roztoku gelu. Barvivo bylo přidáno do agarózového gelu ještě před ztuhnutím.

### **5.1.7. Vizualizace výsledku elektroforézy DNA**

Fluorescenční barvivo gel-red v agarosovém gelu umožňuje vizualizaci DNA rozdělené v gelu. Svou interkalací do DNA a následnému vystavení takového vzorku excitačnímu UV-záření způsobí měřitelnou emisi, kterou lze vyfotit digitálním fotoaparátem.

### **5.1.8. Test přítomnosti rekombinatní DNA ve vzorku pomocí PCR**

Pro účel ověření přítomnosti rekombinatní DNA podjednotek ARP2/3 komplexu byla použita metoda PCR („polymerase chain reaction“), která dovoluje na základě specifických primerů pro jednotlivé podjednotky a jejich amplifikace, určit přítomnost ve vzorku.

PCR program:

Program použit na přístroji TC-200 značky MJ research.

1. 94°C 3:00 denaturace vzorku (kvůli uvolnění DNA z bakteriálních buněk)
2. 94°C 0:30 denaturace DNA
3. 55°C 0:45 nasednutí primerů ke komplementárním sekvencím ve vzorku DNA
4. 72°C 1:30 syntéza DNA, elongace
5. go to 2. 30x počet opakování cyklu
6. 72°C 10:00 dosyntetizování DNA
7. 4°C for ever, uchování DNA



použité primery:

357E2 NARPC11F

5-AGG ATC CAA TGG CAG CAA STT CAG TAC A-3

357E3 NARPC11R

5-TAA GCT TTC ATA RAT AGT CYA ATA AAT CTT CTT-3

357E6 NARPC2F

5-AGG ATC CAA TGA TAT TAC TGC AAT CTC CCT-3

357E7 NARPC2R1

5-TAA GCT TCT ACT TCC AAC TTC GCG AAC-3

Vyrobeny ve společnosti GENERI BIOTECH.

složení směsi chemikálií pro PCR:

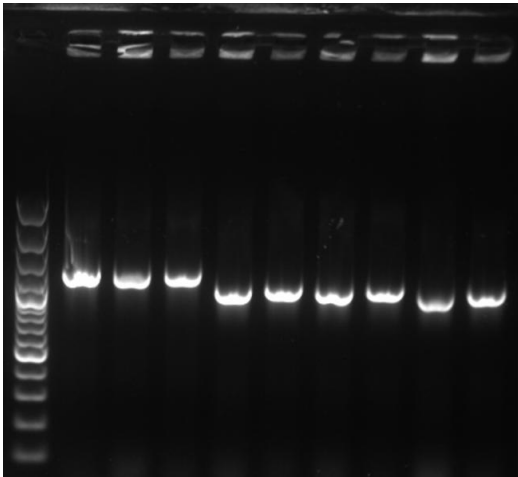
Složení jedné PCR reakce o objemu 40 $\mu$ l		
Taq pol pufr s (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10x	4 $\mu$ l
deoxyribonukleotidy	10mM	0,8 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	25mM	2,66 $\mu$ l
Taq pol	1,25U	0,33 $\mu$ l
primery	10 $\mu$ M	2x 1,33 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O		26,66 $\mu$ l
trocha bakterií z kolonie		

40µl PCR směsi/vzorek bakteriální kultury

20 µl PCR směsi/vzorek izolované DNA

Pufr pro Taq pol s  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ : 10x PCR pufr obsahoval 750 mM Tris-HCl (pH8,8), 200 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,1% Tween20

Obr.10



Obrázek 10 ukazuje pozitivní výsledek ověření přítomnosti inzertu ARPC1 a ARPC2 v testovaných koloniích, kterého bylo dosaženo pomocí PCR. Na gelu je vidět celkem 9 pruhů, z nichž první tři odpovídají rozdělené DNA o velikosti 1100-1200 bp a dalších 6 pruhů odpovídá rozdělené DNA o velikosti 900-1000 bp, tyto hodnoty jsou odpovídající podjednotkám ARPC1 a ARPC2. Byl použit 100 bp marker jehož 2 nejjasnější pruhy v gelu odpovídají velikostem 500 bp a 1000 bp (SM0322 od firmy Fermentas).

### 5.1.9. Biolistika, přechodná exprese metodou „Gene-gun“

Pro přechodnou expresi a vizualizaci vybraných podjednotek ARP2/3 komplexu „*in vivo*“ jsem použil metodu „Gene-gun“, založenou na možnosti vstřelit rekombinatní DNA, která je navázaná na částicích zlata pomocí plynové pistole (Helios gene gun, od BIORAD, katalogové číslo 165-2431) do jader zkoumaných BY-2 buněk. Po určité době (záleží i na délce insertu) dojde k expresi a nadprodukci daného rekombinatního proteinu v transformovaných buňkách.

Příprava náplní do plynové pistole je shrnuta v následujících bodech:

1. Zvážení zlatých částic (1 $\mu$ m částice od BIORAD) v množství 15 mg/délku plastové tuby, která po rozstříhání vyprodukuje cca 50 náplní.
2. Resuspendování zlata v 70% ethanolu, ponechání po dobu 15 minut.
3. Centrifugace při 1000g 15 sekund.
4. Promytí vodou 3x, po každém promytí centrifugace 1000g 15 sekund.
5. Resuspendování v 500  $\mu$ l 50% glycerolu. V této fázi smí být zlato ponecháno libovolnou dobu v lednici.
6. Promytí vodou 2x, centrifugace po každém promytí 1000g 15 sekund.
7. Zamíchání zlata do 100  $\mu$ l 0.05 M spermidinu (0.05 M spermidin byl připraven smícháním 10  $\mu$ l spermidinu z -70C s 1264 ml vody).
8. Vortexování 2 sekundy, sonikování ve vaničce s vodou 2x 30 sekund.
9. Přidání plasmidové DNA do roztoku v množství 50  $\mu$ g na jedno potažení tuby.
10. Vortexování suspenze po dobu 5 sekund.
11. Po kapkách přidávání 100  $\mu$ l 1 M CaCl<sub>2</sub>, vortexování po každé kapce. Ponechání po dobu 10 minut kvůli precipitaci.
12. Promytí peletu 3x v 100% ethanolu., centrifugace 1000g, 5 sekund.

13. Resuspendování v 0.05 mg/ml PVP v 100% EtOH a přenesení do 10 ml plastické trubičky. Na 1 mg zlata připadá 0,12 ml PVP.

14. Vystřížení žiletkou dostatečně dlouhého kusu plastické trubičky a nasazení do držáku. Předsušení platové trubičky 15 minut dusíkem při rychlosti 0.35 l/min.

15. Vyjmutí předsušené plastové trubičky a připevnění injekční stříkačky s jemnou hadičkou na konci.

16. Vertikální otočení trubičky s připojenou stříkačkou a nasátí dobře resuspendovaného, případně sonikovaného roztoku zlata s navázanou DNA. Nutné okamžité umístění tuby do horizontální polohy a nasazení do držáku.

17. Ponechání 30 minut v klidu za počátečního několikanásobného pootočení trubičkou o 180 stupňů, kvůli lepší distribuce zlatých partikulí po stěně tuby. Stříkačka musí zůstat nasazená. Důležité je aby byl roztok uvnitř bez bublin.

18. Po uplynutí 30 minut, opatrné odsátí roztoku a napojení tuby na hadici s dusíkem. Profukování dusíkem po dobu 5 minut.

Vyrábění náplní (nábojů) do plynové pistole pomocí řezače s žiletkou usekávajíc z plastové trubičky stejně dlouhé části s rovnými zakončeními, které se dále dávají do zásobníku biolistické pistole. Skladování náplní v plastových 15ml zkumavkách s dnem obsahujícím hydroskopickou látku a s víčkem uzavřeným parafilmem proti vzniku vlhkosti, která snižuje úspěšnost střelby.

Příprava buněk pro transformaci biolistickou metodou

Tři dny rostlé buňky BY-2 (cca 3 ml) byly pipetou po kapkách naneseny, za současného odsávání olejovou pumpou na kolečko z vystříženého filtračního papíru, které bylo pevně vsazené do filtračního zařízení. Po utvoření souvislé vrstvy buněk, bylo kolečko pinzetou přeneseno do Petriho misky obsahující agarové MS médium. Poté byly buňky ponechány několik hodin 5-16 pro docílení plné exprese rekombinantního proteinu.

Střílení náplní s rekombinantní DNA do buněk:

1. Naplnění zásobníku od pistole náplněmi obsahující rekombinantní DNA.
2. Připojení pistole k heliové bombě a nastavení tlaku na 150 psi.
3. První výstřel naprázdno kvůli ustálení tlaku v pistoly.
4. Další výstřely 2x ze stejné náplně. Vždy do středu petriho misky obsahující buňky na filtračním papíru umístěném na pevném MS médiu obsahujícím agar.
5. Zaparafilmování petriho misek a ponechání pro potřebou dobu exprese. V mém případě obvykle 6-7h nebo přes noc (16h).

### 5.1.10 Příprava expresních konstruktů ARPC1, ARPC2 s mCherry

Pomocí webového rozhraní (<http://www.fermentas.com/en/tools/doubledigest>) jsem si našel vhodné podmínky štěpení pro směs restričních enzymů BamHI a KpnI („double digest“), které jsem použil pro naštěpení ARPC1GFP konstruktů a ARPC2GFP konstruktů ve vektoru pGreen0029. Stejnou směs enzymů jsem použil pro naštěpení vektoru pGreen0029 obsahujícím mCherry. Takto vzniklé otevřené vektory a jejich fragmenty jsem dále separoval elektroforeticky v 1.2% agarosovém gelu obsahujícím barvivo GelRed.

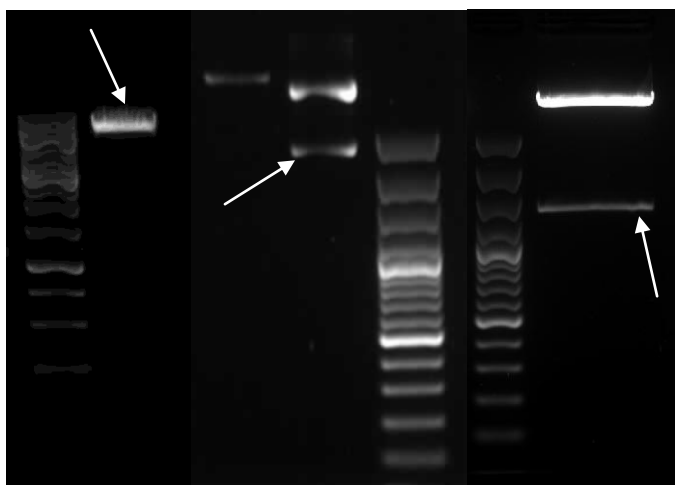
Složení směsi použité pro restriční štěpení:

10x konc. BamHI pufr	5 $\mu$ l
10U/ul BamHI enzym	1,5 $\mu$ l
10U/ulKpnI enzym	3 $\mu$ l
DNA	20 $\mu$ l
voda	20,5 $\mu$ l

při 37°C 2 hodiny

Po cca 40 minutách při napětí 100V, se mi fragmenty na gelu rozdělily a výsledné pruhy byly pod UV-lampou vyříznuty a DNA z nich vyizolována pomocí „QUAIGEN gel extraction kit“. Postupoval jsem přesně podle protokolu obsaženém v kitu. Takto vyizolované fragmenty (s kohezními konci BamHI a KpnI) ARPC1, ARPC2 a pGreen0029mCherry jsem použil v ligační reakci pro tvorbu mCherry fúzních proteinů podjednotek ARPC1 a ARPC2.

Obr.11



M 1 2 3 M M 4

Obrázek č. 11 ukazuje 3 různé gely, na kterých došlo k separaci fragmentů DNA, které vznikly restričním štěpením vektorů nesoucích ARPC1 a ARPC2 podjednotky ve fúzi s GFP. Mezi separovanými fragmenty byly otevřené vektory pGreen0029 mCherry (číslo 1), pGreen0029 GFP (číslo 4) a podjednotky ARPC1 (číslo 3) , ARPC2 (číslo 4). M značí 100kbp DNA marker (SM0322 od firmy Fermentas). Fragmenty, které byly dále vyříznuty z gelu a použity pro ligaci jsou označeny bílými šipkami.

Ligační reakce probíhala přes noc v inkubátoru při 37°C. Ligační reakce byla provedena tak aby poměr DNA vektoru a insertu byl 7:1 a konečný objem reakční směsi 10 µl. Vektor bylo nutno zředit vodou na menší koncentraci.

T4 ligasa pufr	1µl	T4 ligasa pufr	1µl
T4 ligasa	0,2µl	T4 ligasa	0,2µl
ARPC1 DNA 20 ng/µl	7,4µl	ARPC2 DNA 25 ng/µl	5,1µl
mCherry DNA 100 ng/µl	1µl	mCherry DNA 100 ng/µl	1µl
voda	1,3µl	voda	3,6µl

Poměrná množství DNA insertu a vektoru jsem spočítal ze známého vztahu:

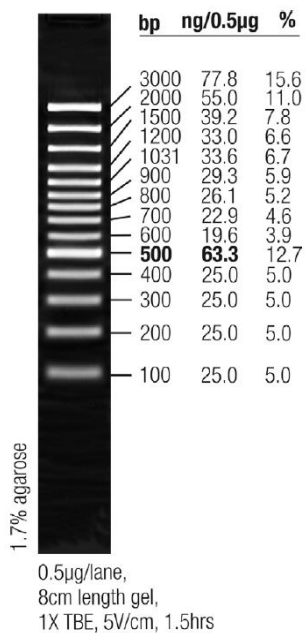
$$\frac{(c[\text{ng}/\mu\text{l}] / \text{délka} [\text{bp}] ) \text{ fragmentu}}{(c[\text{ng}/\mu\text{l}] / \text{délka} [\text{bp}] ) \text{ vektoru}} = X$$

Parametr X určuje poměr množství molekul fragmentu oproti molekulám DNA vektoru ve směsi pro ligaci. Jestliže jsem použil poměr vektor:fragment 1:7, zjistím kolik mám dát DNA fragmentu tak, že číslo 7 vydělím výsledkem rovnice X. Tedy objem fragmentu, který připadá na jednotku objemu vektoru, aby byl molární poměr 7:1 zachován.

Po ligaci byla vzniklá DNA vnesena do bakterií *E.coli* DH5 alfa metodou „heat shock“. Bakterie, které následující den vyrostly, byly rozčárkovány na LB médiu, následně namnoženy a DNA vyizolována metodou MINIPREP. S DNA z MINIPREPU se pak pracovalo při výrobě nábojů pro biolistickou metodu transientní exprese.

Expresní vektory obsahující nyní ARPC1 nebo ARPC2 ve fúzi s mCherry, byly nastříleny biolistickou metodou do 3 denních buněk *N. tabacum*. Byla pozorována in vivo lokalizace mCherry konstruktů, která se ovšem ve všech případech zdála být zcela nespecifickou, difúzní (Viz. tabulka č.2)

GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus



Vlevo je obrázek markeru, který byl použit na gelech pro separaci DNA. Jedná se o 100 kbp žebřík o katalogovém čísle SM0322 od firmy Fermentas.



## **5.2. Práce s proteiny**

### **5.2.1. Příprava vzorku pro denaturující polyakrylamidovou elektroforézu**

Vzorek bylo před elektroforézou nutné zdenaturovat v silně denaturujícím pufru při současném zahřívání po dobu 15 minut při 95°C na topném hnízdě. Vzorkový pufr (100 mM Tris-HCl pH 6.8, 200 mM beta-merkapt ethanol, 4% SDS, 0.2% bromfenolová modř, 20% glycerol) byl v poměru 1:1 vůči vzorku.

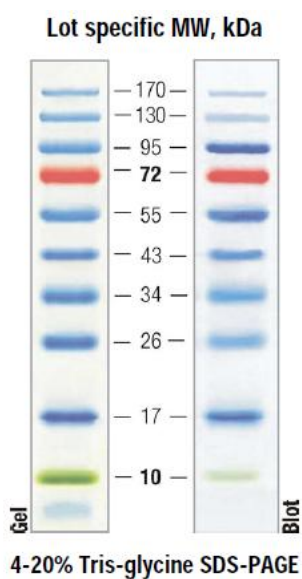
### **5.2.2. SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)**

Proteinové vzorky byly pomocí polyakrylamidové elektroforézy rozděleny dle své velikosti v denaturujícím prostředí obsahujícím SDS (dodecylsírán sodný). Gely se skládaly ze dvou částí, svrchní 4% polyakrylamidový gel a dělicí 10% gel. Nejdříve byl nalit dělicí 10% gel a převrstven několika ml vody, po jeho ztuhnutí byla voda vylita a dolit byl gel 4% a nasazen hřeben. Po ztuhnutí i vrchní části gelu byl hřeben vyjmut a jamky vypláchnuty vodou. Gely byly pak přeneseny do elektroforetické nádoby obsahující elektroforetický pufr (25 mM Tris=tris-hydroxymethyl-aminomethan, 250 mM glycin, 0.1% SDS v H<sub>2</sub>O) a následně zapojeny ke zdroji elektrického napětí. Prvních 15 minut probíhala elektroforéza při napětí 80V, pak 1-1,5h (podle potřeby) při napětí 100V. Gely byly připraveny způsobem uvedeným v tabulce č. 4.

Tabulka č.4

	složka	množství na 1 gel
10% gel	29,2% akrylamid + 0,8% bis-akrylamid v H <sub>2</sub> O	2 ml
	1,5M Tris-HCl pH 8,8	1,5 ml
	H <sub>2</sub> O	2,4 ml
	10% SDS v H <sub>2</sub> O	60 ul
	40% AP (persíran amonný) v H <sub>2</sub> O	7,5 ul
	TEMED	2 ul

	složka	množství na 1 gel
4% gel	29,2% akrylamid + 0,8% bis-akrylamid v H <sub>2</sub> O	350 ul
	0,5M Tris-HCl pH 6,8	625 ul
	H <sub>2</sub> O	1,5 ml
	10% SDS v H <sub>2</sub> O	25 ul
	40% AP (persíran amonný) v H <sub>2</sub> O	5 ul
	TEMED	1,25 ul



Vlevo je obrázek markeru použitého pro všechny proteinové elektroforézy. Jedná se o marker od firmy FERMENTAS s katalogovým číslem SM0671.

### 5.2.3. Vizualizace proteinů rozdělených na SDS-PAGE

Pomocí barviva Coomassie Brilliant Blue ( 0,1% CBB-R, 25% Methanol, 5% kys. octová) po dobu 1h na kývačce a následnému promytí pomocí promývacího roztoku ( 30% ethanol, 10% kys. octová), byly vizualizované rozdělené proteinové vzorky. Gely byly nasnímány pomocí skeneru a snímky uloženy ve formátu .tiff .

### 5.2.4. Izolace a purifikace His-tag rekombinantních proteinů z bakterií

Byla prováděna na dvou různých agaroso-niklových kolonách, která byly (na základě vysoké afinity imobilizovaných Ni<sup>2+</sup> iontů k poly-histidinovému ocásku), schopny purifikovat His-tag rekombinantní protein z buněčného extraktu.

Jednalo se o velkoobjemovou kolonu připravenou v naší laboratoři a kolonu s malým objemem, která byla součástí kitu „His-trap“ od firmy GE HEALTHCARE. Nejdříve bylo potřeba ze suspenze bakterií vyrobit lyzát, který obsahoval vyprodukované rekombinantní podjednotky s polyhistidinovou značkou.

#### Příprava bakteriálního lyzátu

1. Centrifugací v 50 ml zkumavkách byly bakterie sklizeny při 5000 g 10 min.
2. Pelet byl resuspendován v ledově vychlazeném vazebném pufru (20 mM imidazol)
3. K roztoku byly též přidány proteasové inhibitory.
4. 50 µl vazebného roztoku / 1 ml bakterií
5. Sonikace 20 x 8 sec při 50% výkonu.
6. Centrifugace a filtrace přes filtrátka 0,22 µm.
7. Uschování malého vzorku pro kontrolní elektroforézu.

Isolace proteinů s His-tag na velké agarosa-niklové koloně obsahující imobilizované Ni<sup>2+</sup> ionty:

0. Equilibrovat kolonu promytím 2x voda a 4x 10 mM (zředěný) imidazolový pufr (obsahujícím 300 mM NaCl) a změřit OD<sub>280</sub> .
1. Resuspendovat pelet v 4x větším objemu základního pufru. Centrifugovat 4000 g 10 min a vylít supernatant. Vzít trochu supernatantu pro kontrolu (100 µl)
2. Resuspendovat pelet v 3x větším objemu extrakčního pufru a rozbít bakteriální buňky pomocí sonikátoru (20x8sec 50% výkon).
3. Centrifugovat při 20 000g 20 min. Schovat supernatant pro další použití, odstranit pelet. Vzít trochu peletu a supernatantu pro kontroly.
4. Vysrážet proteiny v supernatantu přidáním pufru obsahujícím síran amonný. Měly by se objevit bílé shluky sraženiny v roztoku.
5. Centrifugovat vysrážené proteiny při 20 000g 30 min. Vylít supernatant, uschovat pelet.
6. Rozpustit pelet v 10 mM (zředěném) imidazolovém pufru (obsahujícím 300 mM NaCl) a nalít vzniklý roztok na kolonu opatrně po stěnách.
7. Pokračovat v přidávání imidazolového 10 mM pufru dokud se OD<sub>280</sub> nevyrovná OD<sub>280</sub> , která byla naměřena po equilibraci kolony. Všechny nespecificky navázané proteiny by se tím měly vymýt z kolony.
8. Vzít kontrolní vzorek z roztoku, který protekl kolonou. Pro ověření , že většina His-tag proteinů zůstala navázaná na koloně.
9. Nalít 1x 10mM imidazolový pufr s 1 M NaCl a 1x 10 mM imidazolový pufr s 300 mM NaCl .
10. Změřit OD<sub>280</sub> 250 mM imidazolového pufru a uschovat tuto hodnotu jako „blank“.

Začít promývat kolonu koncentrovaným 250 mM imidazolovým pufrům. Brát frakce o objemech 1ml a měřit jejich  $OD_{280}$  dokud se nevyrovná optické denzity naměřené u blanku. To znamená, že na koloně již nejsou navázány žádné proteiny.

11. Vzáít frakce s největší optickou denzitou a srazit proteiny pomocí síranu amonného s 5 mM EDTA.

12. Centrifugovat 20000g 30 min.

13. Rozpustit pelet v malém množství extrakčního pufru. Skladovat půlku vzorku v lednici při 4°C a půlku v mrazáku při -20°C. Nejlepší možné řešení při neznalosti stability izolovaného proteinu.

#### Izolace His-tag proteinů na malé koloně z His-trap HP kitu

Podrobný postup obsahuje „His-trap HP kit“ (17-5249-01) od firmy AMERSHAM BIOSCIENCES. Metoda spočívá v imobilizaci His-tag rekombinantních proteinů na agarosových kuličkách obsahujících nikelnaté ionty, které jsou situovány jako pevná náplň malé tuby, ke které je připojena injekční stříkačka, pomocí které se do tuby vhání roztok o vzrůstající koncentraci imidazolu, dokud nedojde pročištění a eluci požadovaného proteinu. Měřením optické denzity při 280nm se určí poměrné množství proteinů v jednotlivých jímaných frakcích. Změřením hodnoty optické denzity u promývacího roztoku jako „blanku“, lze z hodnot optických denzit jednotlivých frakcí odečíst relativní množství proteinu. Jako výsledný roztok s vymytým His-tag proteinem bereme 3 frakce s největší optickou denzitou, které by měly obsahovat protein zájmu, ideálně bez kontaminací jinými proteiny, které byly v předchozích krocích odmyty ředící řadou roztoku imidazolu. Pro mé potřeby jsem používal ředící řadu v rozmezí 10 mM-300 mM imidazol v PBS při pH 7,4.

## 5.3.Práce s bakteriemi

### 5.3.1. Transformace bakterií rekombinatní DNA podjednotek ARP2/3 komplexu

Bakterie *E.coli* linií DH5alfa, Rosetta2, BL-21 byly transformovány metodou „Heat shock“. Ta zahrnuje:

1. Rozmražení heat shock kompetentních bakterií na ledu.
2. Přidání 1  $\mu$ l DNA a zamíchání špičkou.
3. Počkat 20 minut.
4. Umístit směs do topného hnízda předehřátého na 42°C po dobu 1 minuty.
5. Přemístění směsi z topného hnízda na led a ponechání 2 minuty.
6. Přidání 1 ml SOC média a inkubace v dlouhé sterilní zkumavce při 37°C 1h na třepačce.
7. Centrifugace směsi a napipetování na povrch pevného agarového LB média s přítomným selekčním antibiotikem na povrchu Petriho misky.
8. Bakterie rozetřené po povrchu pevného média v Petriho misce byly ponechány přes noc v inkubátoru při teplotě 37°C a následující den rozčárkovány a testovány na přítomnost rekombinatní DNA ARP2/3 komplexu pomocí PCR.

### 5.3.2. Expres His-tag rekombinantních proteinů v bakteriích *E.coli* Rosetta 2 a *E.coli* BL-21

Bakterie, které byly ověřeny pomocí PCR na přítomnost správného insertu, byly použity pro expresi proteinů ARP2/3 komplexu. V případě testování exprese byly bakterie v 3 ml LB média/kanamycin (kanamycin 50 $\mu$ g/ml) inkubovány při 37°C na třepačce přes noc a následující den byly centrifugovány a k peletu přidány další 3 ml LB

média/kanamycin s 1 mM IPTG (Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside), který je důležitý pro indukci exprese svou vazbou na represor lac operonu, který expresní vektor pET28b obsahuje. Každých 30 minut bylo odebíráno 0,5 ml kultury, centrifugováno a zamrazeno pro pozdější elektroforézu.

Pro expresi velkého množství proteinu za účelem jeho izolace a biochemických pokusů bylo nutné provést experiment jinak než v případě pouhého testování kultury na expresi. Tedy nasazení pozitivní kultury do 20 ml LB média/kanamycin, inkubace přes noc (16h) při 37°C na třepačce a následující den odebrání malého množství kultury a nasazení do většího objemu LB media/kanamycin, používal jsem objemy 25-500 ml. Čekal jsem zpravidla 4-5 h, než byla optická denzita  $OD_{600}=0,35$ , což vypovídalo o tom, že kultura je již ve stacionární fázi a mohu tedy začít s indukcí exprese pomocí přidání IPTG ve finální koncentraci 1 mM.

### **5.3.3. Možení bakterií za účelem maximální produkce rekombinantní DNA**

Bakterie *E.coli* DH5 alfa byly pro účely množení rekombinantní DNA pěstovány v Erlenmayerových baňkách s 25 ml tekutého LB média obsahujícího antibiotikum kanamycin o koncentraci 50  $\mu$ g/ml. Kultivace probíhala při 37°C na třepačce přes noc (16h).

### **5.3.4. Tvorba konzerv z bakterií**

1. Sterilní smíchání 0,5 ml bakterií s 0,5 ml 30% glycerolu.
2. Zamražení ependrofkou se směsí v nádobě s tekutým dusíkem.
3. Umístění do mrazícího boxu při -70°C.

## 5.4.Práce s buňkami *Nicotiana tabacum* BY-2

### 5.4.1. Udržování kultury *N. tabacum* BY-2

Tabákové buňky byly kultivovány v suspenzní kultuře v Erlenmayerových baňkách v temné místnosti při teplotě 25°C. Pasážování kultury probíhalo 1X týdně přidáním 1ml týdenní suspenze do 30 ml čerstvého média podle Murashige a Skoog (MS médium), obohaceného o další složky, jak je popsáno v tabulce č. 3.

Složení MS média pro <i>N.tabacum</i> BY-2		pH= 7,5
		mg/l
MS- základní směs solí od firmy SIGMA (M5524),podle Murashige a Skoog	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
	KNO <sub>3</sub>	1900
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
	KI	0,83
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0,25
	CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0,025
	CaCl <sub>2</sub>	322
	MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	370
	MnSO <sub>4</sub> . 5 H <sub>2</sub> O	24,05
	ZnSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	8,6
	CuSO <sub>4</sub> . 5 H <sub>2</sub> O	0,025
	FeSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	27,8
	Na <sub>2</sub> EDTA	37,2
Vitamíny	vitamin B1	1
Růstové regulátory	2,4-D (2,4-dichlorfenoxycetová kys., rozpuštěná v H <sub>2</sub> O a 1M NaOH)	0,2
ostatní složky	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	200
	myo-inositol	100
	sacharosa	30000

Tabulka č.3

Popisuje složení média používaného pro udržování kultury BY-2.



## 5.4.2. Imunofluorescence

Je metoda, která na základě interakce specifické protilátky proti proteinu našeho zájmu, umožňuje jeho zviditelnění přítomností fluorescenční značky, která je na protilátku navázaná přímo, nebo nepřímo prostřednictvím sekundární protilátky, která specificky rozeznává protilátku primární.

Postup:

1. Buňky umístit do košíčku s polopropustným dnem.
2. Fixáž I 20 minut
3. Fixáž II 30 minut
4. Promýt v ASB 2x 10minut
5. Enzymace 20 minut
6. Promýt v ASB 3x10 minut
7. Methanol -20°C 10 minut
8. Promýt v PBS 10 minut
9. 1%PBSA 30 minut (PBS+1% BSA)
10. Přenést buňky do eppendorfky, inkubovat s primární protilátkou 2h
11. Promýt v PBS 3x 10 minut
12. Inkubovat se sekundární protilátkou 1h
13. Promýt v PBS 3x10 minut
14. Při posledním promytí přidat 50% glycerol 1:1
15. Vzorky uschovat v ledničce schované před světlem v alobalu.

## Roztoky:

ASB pufr (actin stabilizing buffer): 100mM PIPES, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM EGTA, pH6,4

Fixáž I: 400 µM MBS v ASB

Fixáž II: 2% paraformaldehyd, 0,05% Triton X-100 v ASB fixáži, inhibitory (300 µM PMSF, 0,1 µM leupeptin, 0,025 µM pepstatin

Enzymace: 0,05% pectolyasa Y-23 v ASB, inhibitory (300 µM PMSF, 0,1 µM leupeptin, 0,025 µM pepstatin

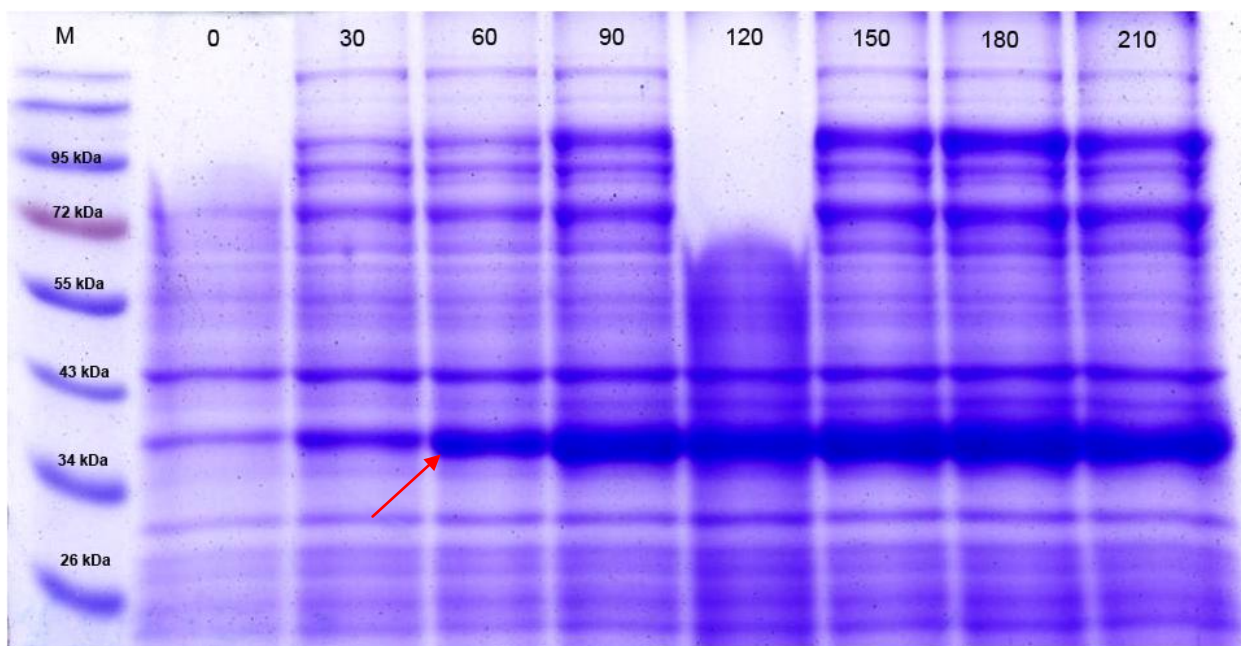
## 6. Výsledky

### 6.1. Expresa His-tag rekombinantních podjednotek ARPC1 a ARPC3 v *E. coli*

Byly k dispozici expresní vektory pET28b, které nesly jako inzert rekombinantní podjednotky ARPC1 a ARPC3 s polyhistidinovou značkou (His-tag). Tento expresní systém byl uveden do bakterií *E. coli* linie Rosetta 2.

V případě proteinu ARPC1-His byla exprese prokazatelná již po 1hodině inkubace s IPTG (Obr.1). U proteinu ARPC3-His se exprese nepodařila.

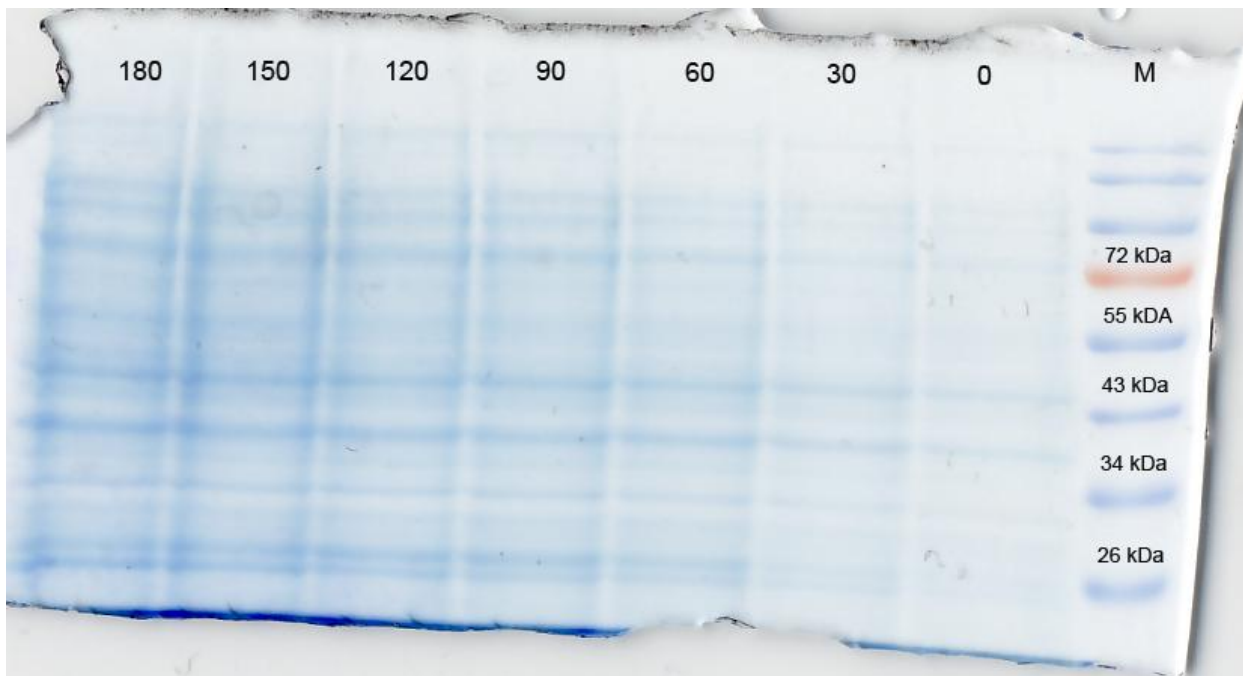
Obr.1



Obrázek č.1 ukazuje expresi podjednotky ARPC1 v časových odstupech 30 minut od indukce exprese pomocí 1 mM IPTG. M znamená marker. U jednotlivých pruhů rozděleného markeru jsou popsány molekulové hmotnosti, čteno od spoda 26, 34, 43, 55, 72 a 95 v (kDa). Čísla 0-210 jsou popsány jednotlivé časové intervaly, doby

inkubace s 1 mM IPTG v (min). červenou šipkou je znázorněn pruh na gelu odpovídající produkované podjednotce ARPC1 s polyhistidinovou značkou.

Obr.2

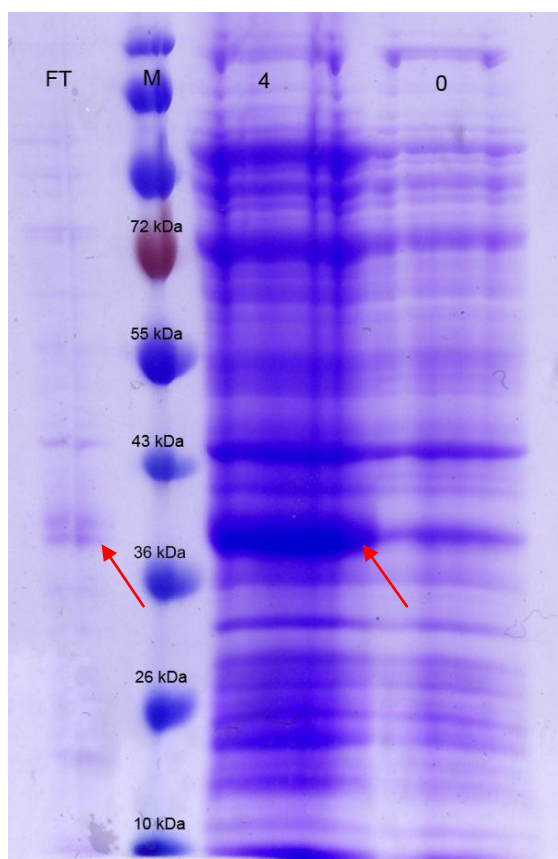


Obrázek č. 2. Ukazuje neúspěšný pokus o expresi podjednotky ARPC3 v *E. coli*. Uvedené časy jsou v minutách od času 0-180, kdy bylo přidáno 1 mM IPTG. M je značka pro marker, kterému odpovídaly pruhy o hodnotách 26 kDa, 34 kDa, 43 kDa, 55 kDa, 72 kDa čteno od spoda. Protein ARPC3 s polyhistidinovou značkou není zobrazen, protože se jeho exprese nepodařila.

Úspěšně exprimovaný protein ARPC1-His byl dále podstoupen procesu purifikace na niklové velkoobjemové koloně. Lyzát byl připraven ze suspenze 500ml bakterií *E.coli*, které byly inkubovány po dobu 4 hodin za přítomnosti 1 mM IPTG při 37°C na třepače. Bakterie byly před indukci exprese ve stacionární fázi růstu.

Izolovaná frakce s největším množstvím proteinů byla rozdělena na SDS-PAGE a výsledný pruh odpovídající velikosti ARPC1 podjednotky vystříhnut a poslán na hmotnostní spektroskopii (MALDI). Na MALDI bylo bezpečně zjištěno, že se jedná o ARPC1 protein.

Obr.3



Obrázek č.3 dává informaci o výsledku separace ARPC1 na  $\text{Ni}^{2+}$  koloně, v pravá část obrázku obsahuje kontrolní vzorek exprese ARPC1 v *E.coli* v časech 0 a 4 hodiny od přidání 1 mM IPTG, jejíž lyzát byl na kolonu nalit. FT je označení pro vzorek frakce s podjednotkou ARPC1 separovanou na koloně. M je označení pro marker. Červenými šipkami jsou označeny místa na gelu odpovídající ARPC1 s polyhistidinovou značkou rozdělenému na elektroforetickém gelu.

Úzký proužek gelu z levé části obrázku č. 3 byl vyříznut skalpelem a odevzdán k analýze metodou MALDI do servisní laboratoře Přírodovědecké fakulty UK v Praze.

## **Závěr**

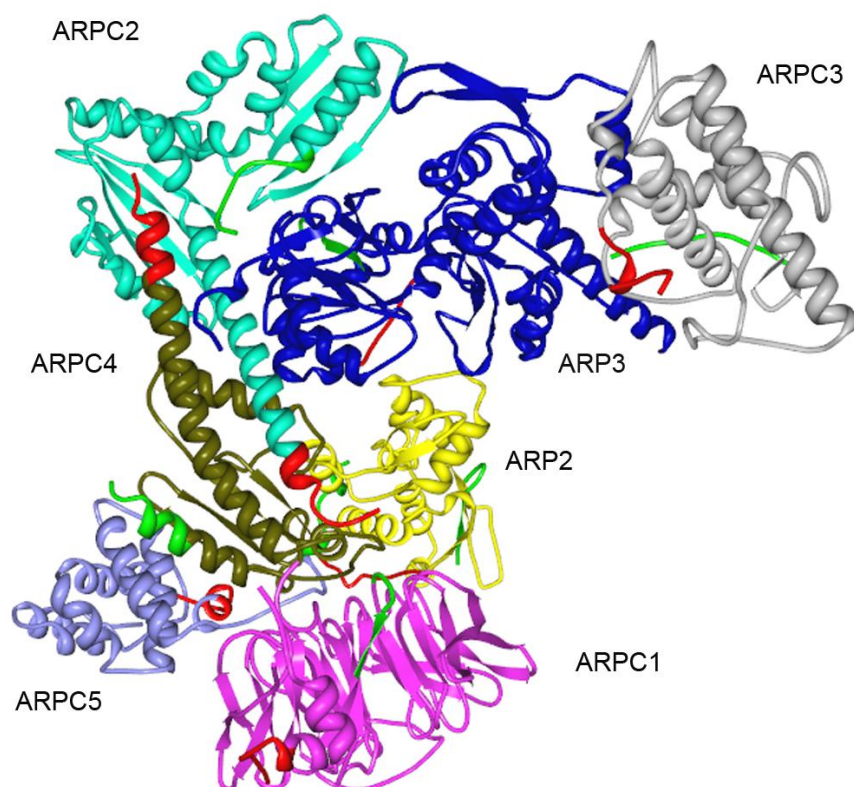
Podářilo se řástečně izolovat protein ARPC1-His. Nepodařila se exprese ARPC3-His v bakteriích. Nutná další optimalizace postupu purifikace a izolace ARPC1-His z bakterií kvůli neřistotám při vymývání z kolony a kvůli nízké výtěžnosti.

## 6.2. Stérická studie

K ověření sterických náležitostí jednotlivých podjednotek v ARP2/3 komplexu byl sestaven 3D model, který znázorňoval pomocí červené barvy C-konce a pomocí zelené barvy N-konce proteinových podjednotek. Model byl sestaven za účelem zjistit zda by mohly N-koncové fúze podjednotek s GFP a mCherry vadit v sestavování komplexu a jeho interakcích.

Byl použit program Jmol verze 12.0.41 ze serveru <http://www.rcsb.org/pdb>.

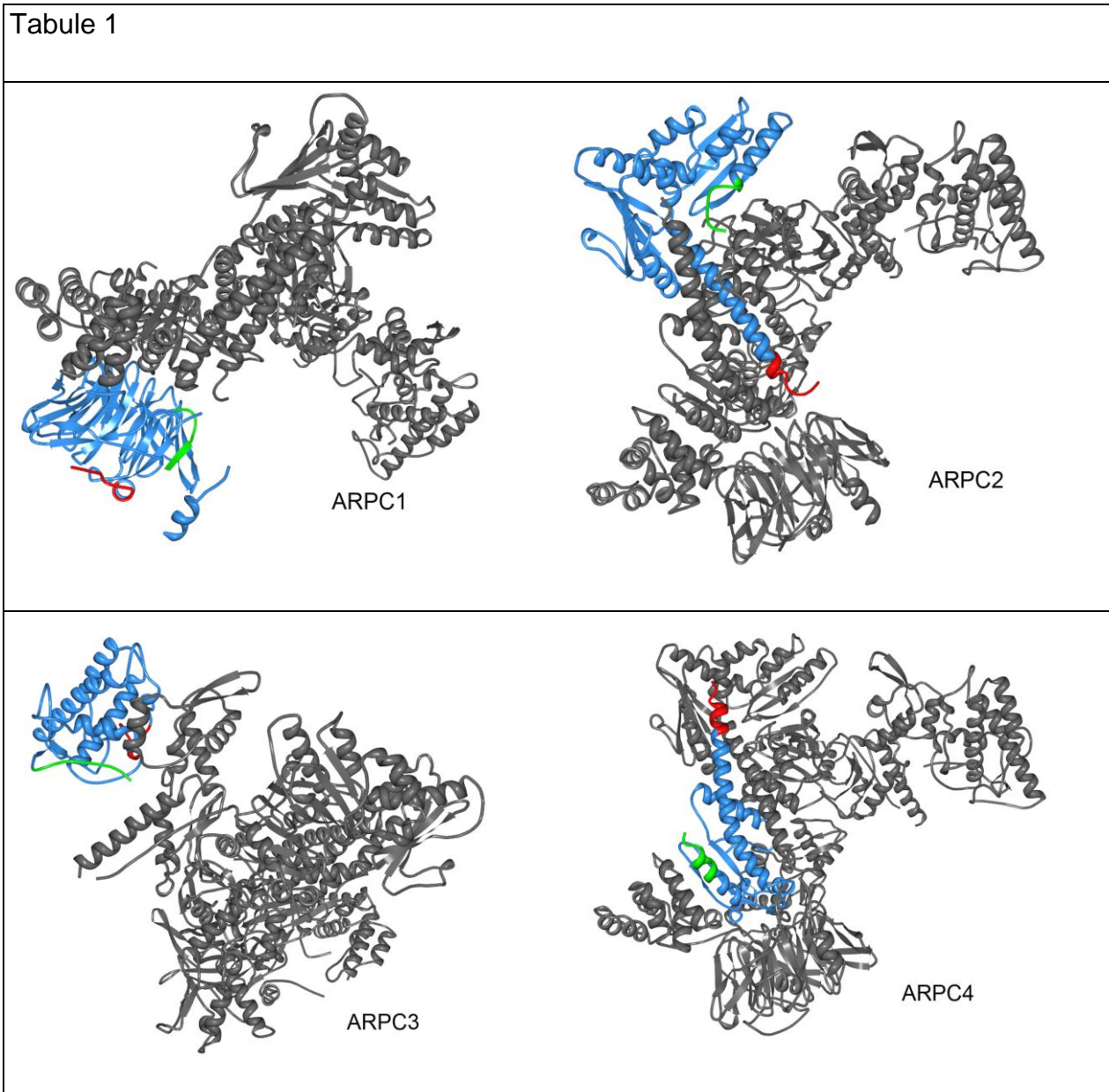
Obr.4



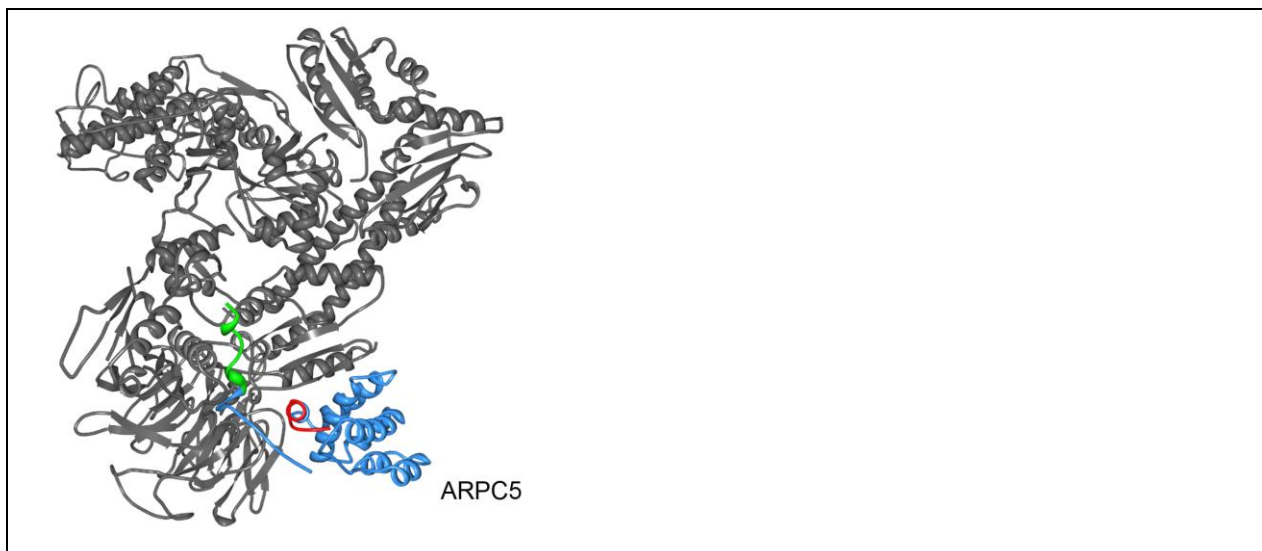
Obrázek č. 4 ukazuje celý ARP2/3 komplex s barevně odlišenými podjednotkami a červeně označenými C-konci, zeleně označenými N-konci proteinů.



Jednotlivé podjednotky byly na následujících obrázcích zvýrazněny modrou barvou, zbytek ARP2/3 komplexu byl pro lepší orientaci označen šedivou barvou. Zelená barva pro identifikaci N-konce a červená barva pro identifikaci C-konce byly zachovány (Viz. tab.č.1).







Tabule č.1 popisuje prostorové uspořádání N a C-konců proteinů jednotlivých podjednotek ve vztahu k celému ARP2/3 komplexu. N-konce zelená barva, C-konce červená barva.

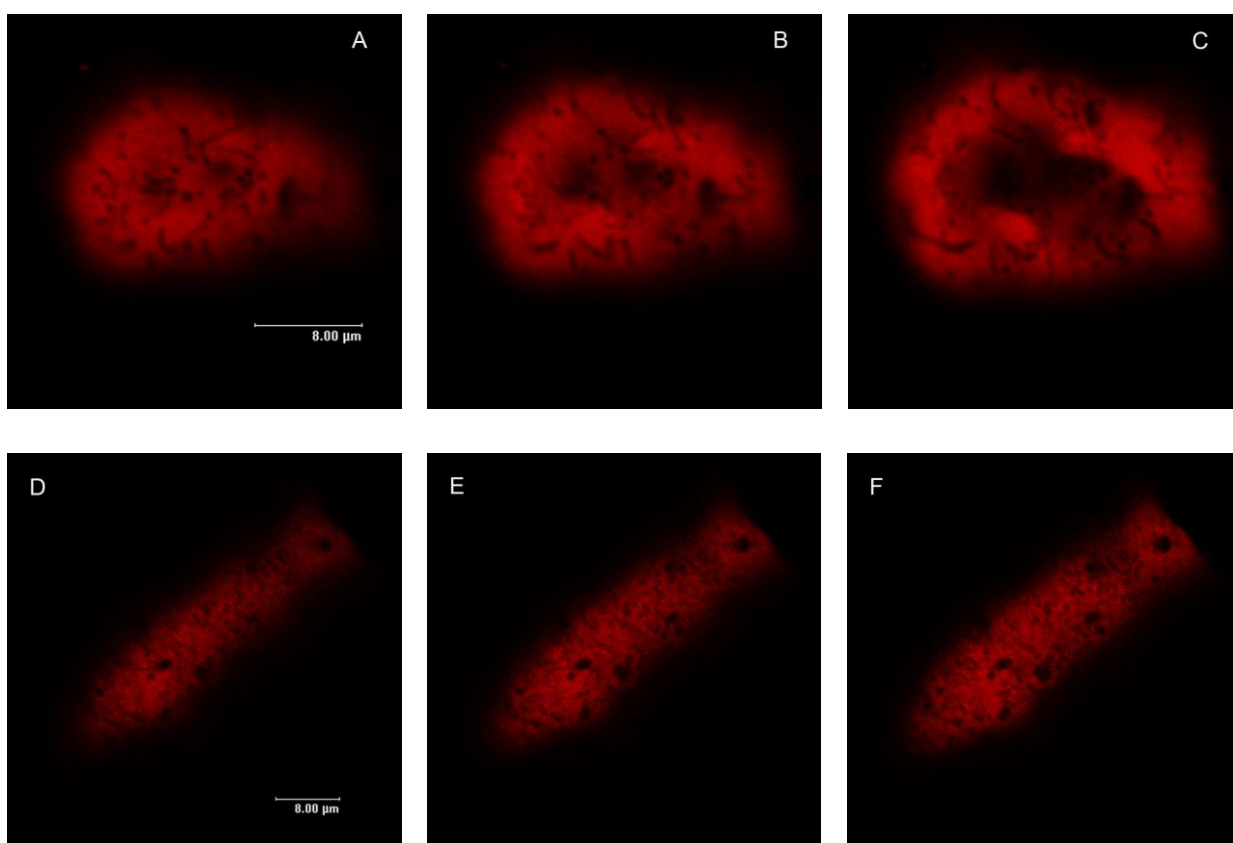
## Závěr

Z uvedeným obrázků vyplývá, že vzhledem k orientaci N-konců jednotlivých podjednotek v komplexu by jejich N-koncové fúze s fluorescenčními proteiny nemusely stericky vadit v sestavování komplexu a jeho funkcích „*in vivo*“. Ve všech zkoumaných podjednotkách směřovaly N-konce k okrajům ARP2/3 komplexu.

### 6.3. In vivo lokalizace nadprodukovných podjednotek ARP2/3 komplexu

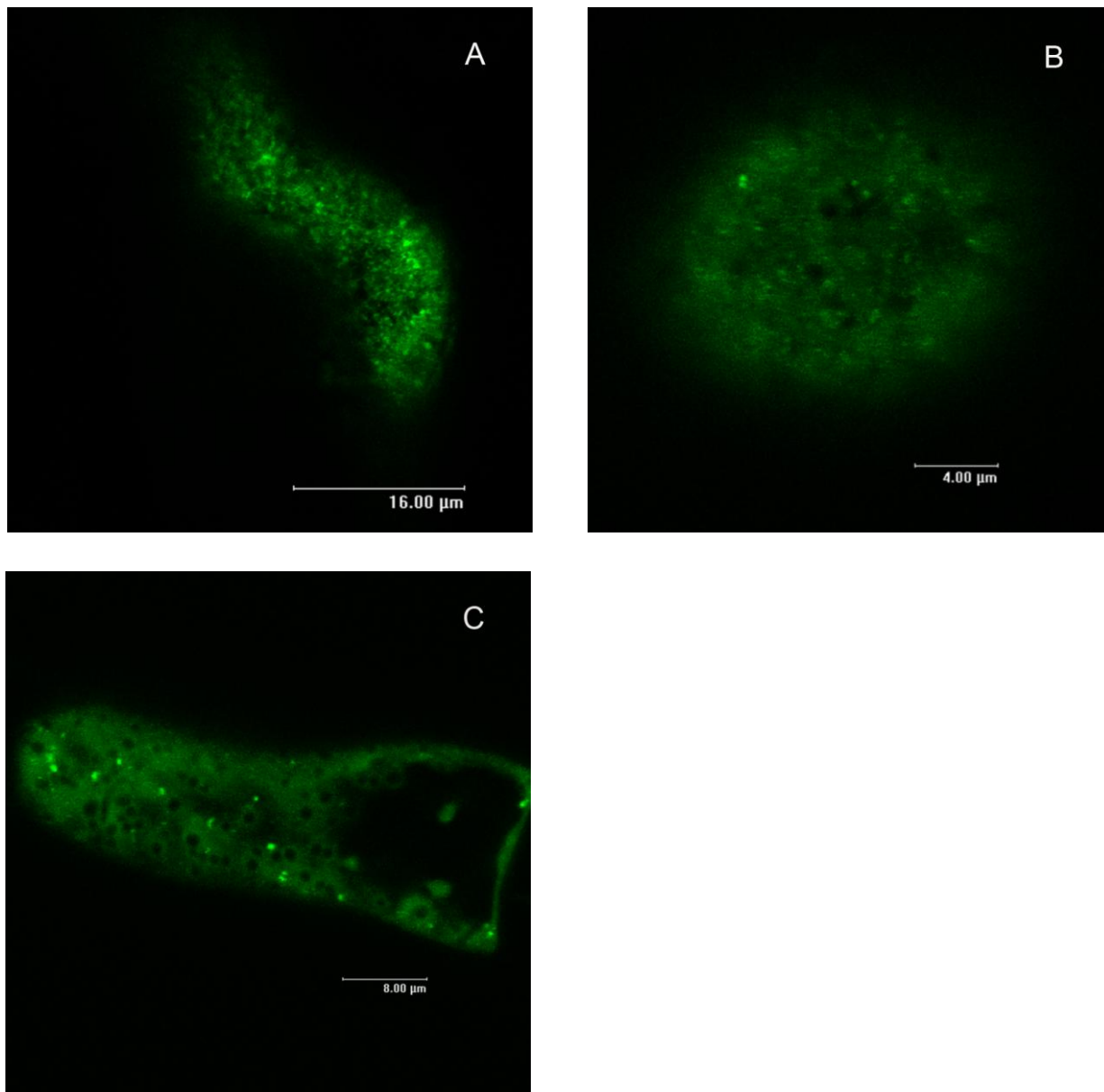
Tabule 2, 3 a 4 podávají přehled výsledků lokalizačních pozorování u 3 denních buněk BY-2, které byly přechodně transformovány biolistickou metodou pomocí fúzních vektorů s GFP a mCherry. V případě mCherry byly buňky transformovány podjednotkami ARPC1mCherry a ARPC2mCherry. GFP fúzními proteiny pak byly ARPC1GFP, ARPC2GFP, ARPC3GFP.

Tabule 2



Tabule č. 2 popisuje nescifickou, difúzní lokalizaci *in vivo* v 3 dny starých buňkách BY-2. V horní části (A, B, C) jsou 3 za sebou jdoucí konfokální řezy kortikální vrstvou buněk obsahujících ARPC1mCherry. Ve spodní části (D, E, F) jsou 3 za sebou jdoucí konfokální řezy kortikální vrstvou obsahující ARPC2mCherry. Kroky mezi řezi byly 0,6 μm.

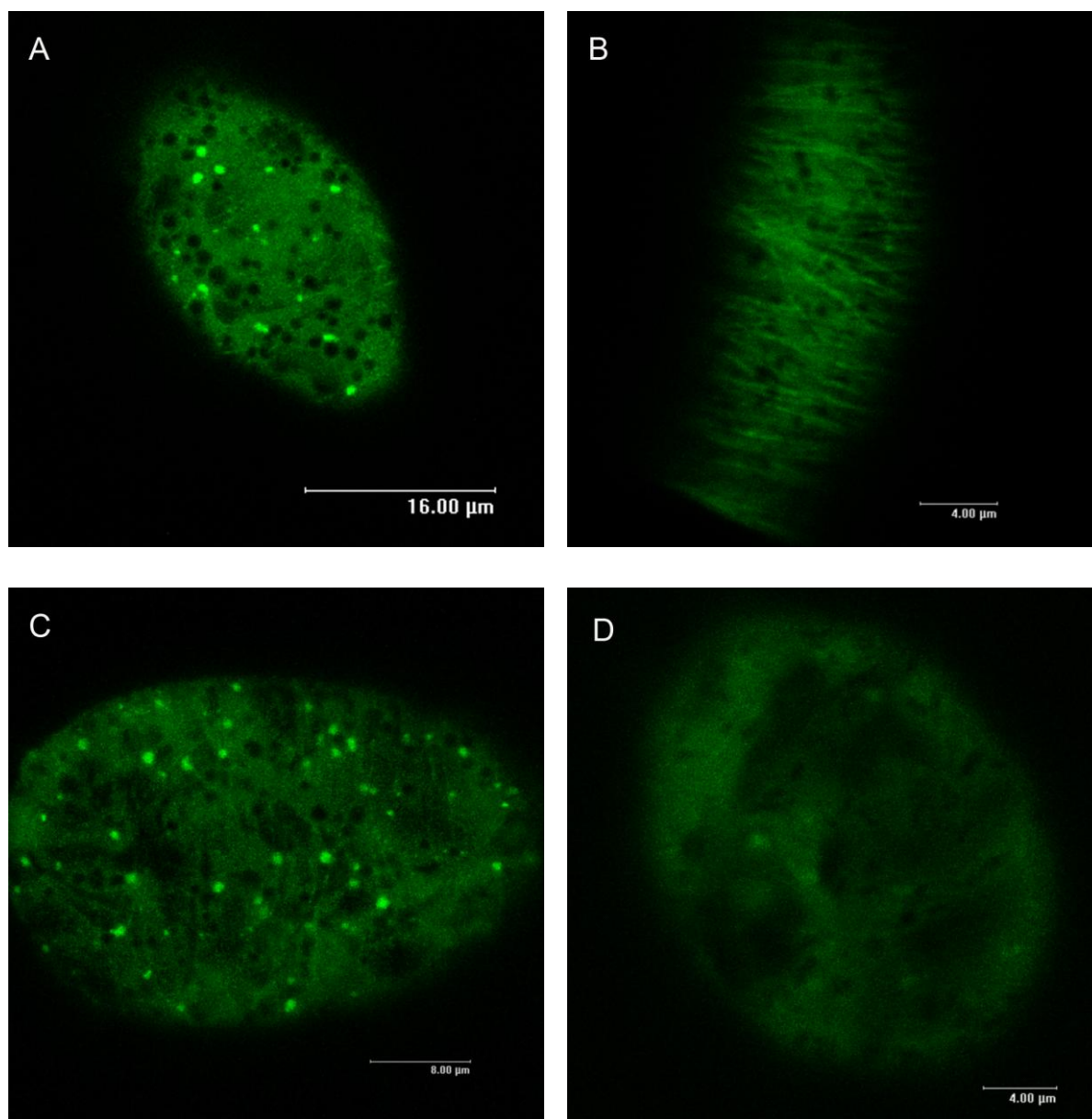
Tabule 3



Tabule č. 3 shrnuje pozorování exprese v 3 dny starých BY-buňkách, které byly transformovány ARPC1GFP biolistickou metodou. Na obrázku A je patrná lokalizace proteinu ARPC1GFP do velkých jasných teček, nácházejících se ve velké hustotě v kortikální vsrtvě. Měřítka je velké 16 µm. Obr. B reprezentuje další způsob lokalizace proteinu ARPC1GFP do menších teček se zrnitým signálem. Měřítka je 4 µm. Na obr. C je vidět opět lokalizace ARPC1GFP do teček s jemným, difúzním signálem ve zbytku

buňky. Měřítka je 8  $\mu\text{m}$ . Obrázky byly pořízeny na konfokálním mikroskopu při 0.5  $\mu\text{m}$  tlustých řezech. Uvedené obrázky jsou maximální projekcí 2 po sobě jdoucích řezů.

Tabule 4



Tabule č. 4 podává přehled pozorování ve 3 dny starých buňkách BY-2, které byly transformovány ARPC2GFP a ARPC3GFP biolisticou metodou. Obr. A ukazuje lokalizaci ARPC2GFP do velkých teček a vláken v kortikální vrstvě. Měřítka 16  $\mu\text{m}$ . Obr. B prezentuje případ lokalizace pouze do vláken v kortikální vrstvě. Měřítka je 4  $\mu\text{m}$ . Na obr. C je vidět lokalizace ARP2GFP do malých a velkých teček bez vláken. Měřítka je 8

$\mu\text{m}$ . Na obr. D je difúzním způsobem lokalizován ARPC3GFP, který ve všech pozorovaných buňkách vykazoval jednotnou difúzní lokalizaci jako je právě na obr.D. Měřítka 4  $\mu\text{m}$ . Obrázky byly pořízeny na konfokálním mikroskopu při 0.5  $\mu\text{m}$  tlustých řezech. Uvedené obrázky jsou maximální projekcí 2 po sobě jdoucích řezů.

## **Závěr**

Byly pozorovány 3 denní buňky BY-2 za přítomnosti nadprodukovaných podjednotek ARP2/3 komplexu, přičemž se ukázalo, že mnou připravená DNA pro varianty ARPC1mCherry a ARPC2mCherry byla v buňkách exprimována, ačkoliv ani v jednom případě nebyl zjištěn specifický signál, či vazba k nějaké buněčné struktuře. Ve všech pozorovaných případech byly ARPC1mCherry a ARPC2mCherry difúzního charakteru a navzájem se od sebe příliš nelišily co do povahy signálu.

Ovšem GFP fúzní konstrukty, jmenovitě ARPC1GFP, ARPC2GFP vykazovaly nápadné značení. V případě ARPC1GFP docházelo buď k tvorbě malých teček s difúzním signálem okolo, nebo k tvorbě větších teček a celkově zrnitějšího signálu. U ARPC2GFP byla zdokumentována vlákna, vlákna s tečkami, nebo pouze tečkovitý signál. ARPC3GFP vykazoval u všech buněk difúzní lokalizaci, nebyla pozorována žádná lokalizace do buněčných struktur.

## 6.4. Imunolokalizace

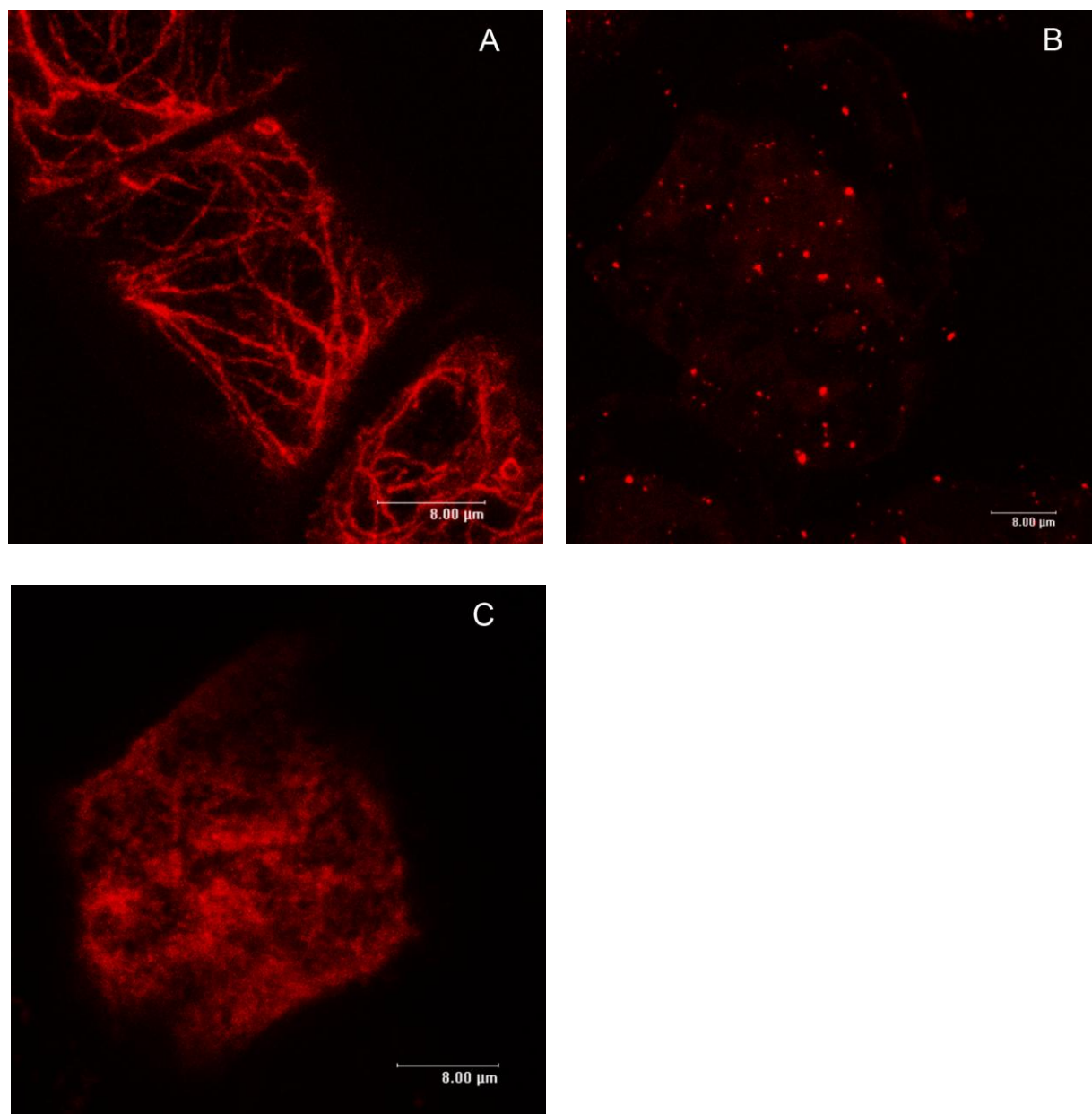
Pro zjištění, zda se mění rozmístění některých vybraných cytoskeletálních proteinů, vlivem overexprese některé z podjednotek, jsem přistoupil k vizualizaci vybraných proteinů pomocí protilátek. Jako primární protilátku proti aktinu jsem použil myší anti-actin. Proti ARP2 jsem použil králičí anti-ARP2 primární protilátku a proti ARPC2 jsem použil králičí anti-ARP2 primární protilátku. Na tyto protilátky jsem pak navázal sekundární protilátku anti-mouse TRITC proti myší protilátce, nebo anti-rabbit TRITC v případě králičích.

Jako kontrolu jsem označil buňky proti vybraným proteinům aktin, ARP2, ARPC2. Jako další kontrola sloužily obrázky ukazující vliv overexprese vybraných podjednotek a biolistické metody na rozložení aktinového skeletu v kortikální vrstvě. V případě těchto obrázků bylo po porovnání s kontrolou zjištěno, že aktinový skelet není výrazně ovlivněn (viz tabule 6, 7, 8).

Dále byla otestována specifita protilátky proti ARPC2. Na snímcích byla viditelná jasná kolokalizace nadprodukováného ARPC2GFP s protilátkou značeným ARPC2. To bylo použito jako další kontrola.

Dále byly pomocí protilátek proti ARP2 značené buňky nadprodukující ARPC1GFP(tabule 11), ARPC2GFP (tabule 9) a ARPC3GFP(tabule 12). Byla zkoumána závislost distribuce ARP2 na nadprodukováných podjednotkách, kterými byly buňky biolistickou metodou transformovány.

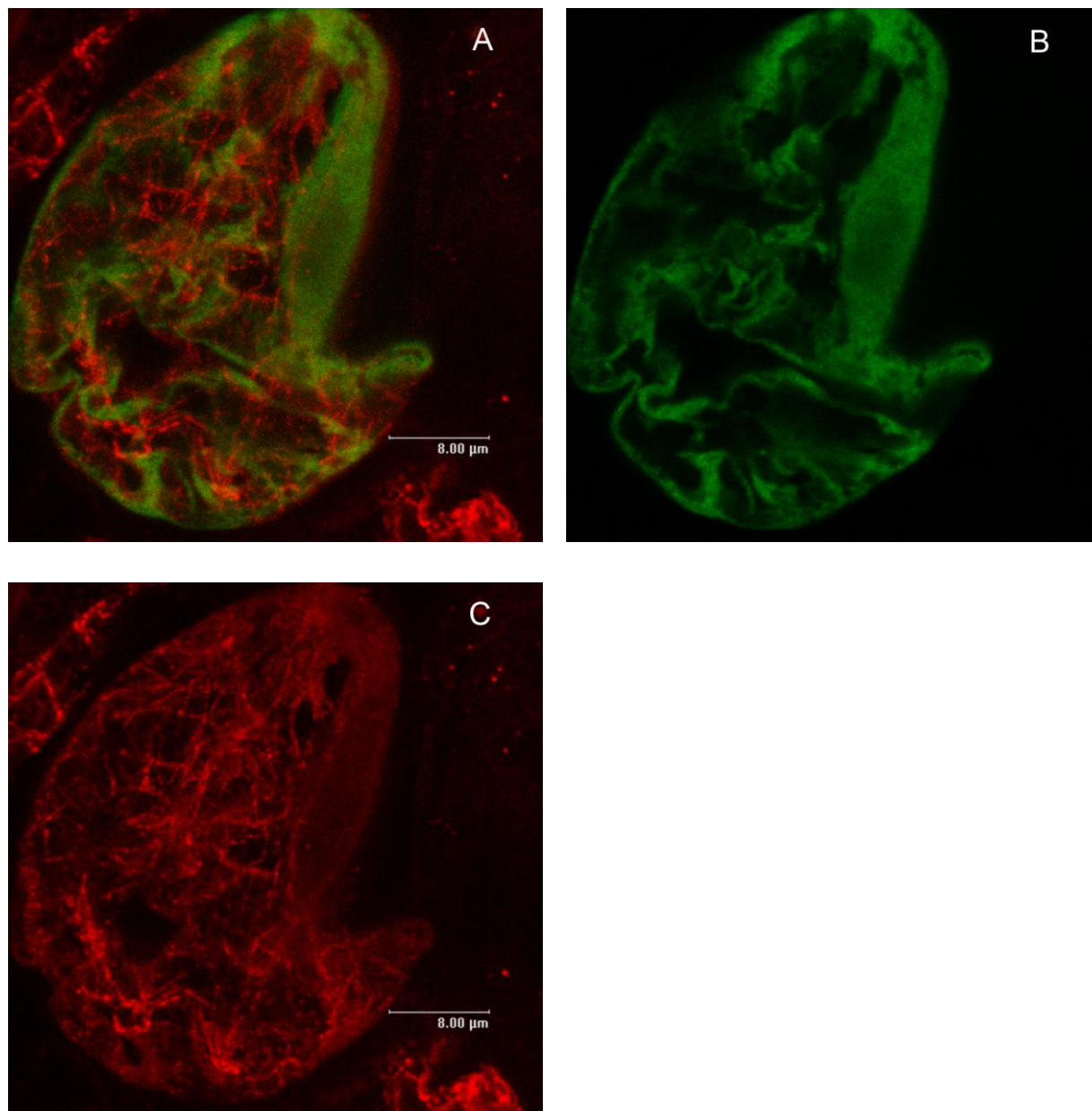
Tabule 5



Tabule č.5 obsahuje kontrolní snímky buněk BY-2, kde byly značeny protilátkami aktin (obr.A), ARP2 (obr.B) a ARPC2 (obr.C). Jedná se o maximální projekce vždy 4 řezů o tloušťce 0.4 μm z konfokálního mikroskopu.



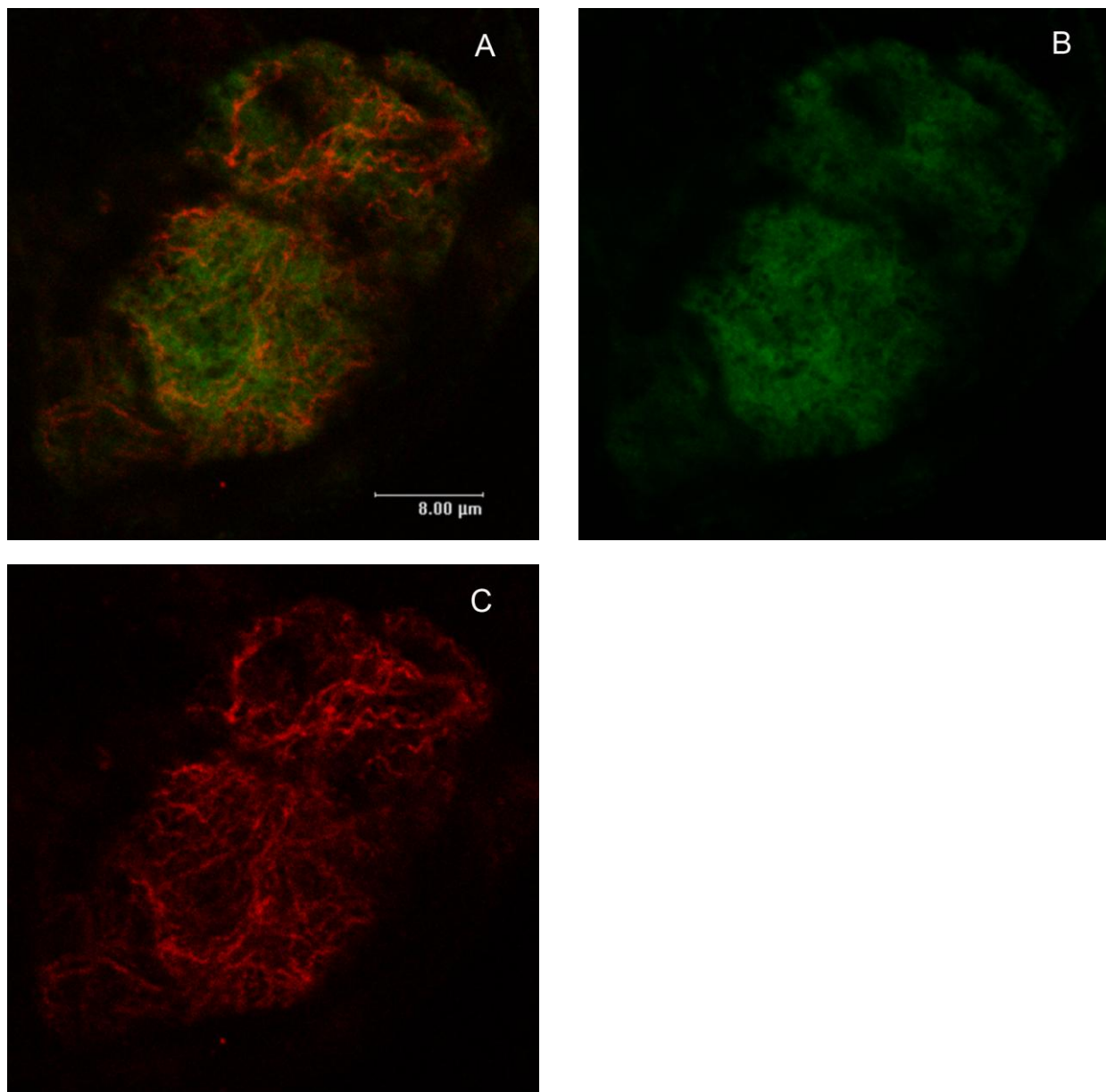
Tabule 6



Tabule č.6 ukazuje 3 denní buňku BY-2, která byla biolistickou metodou transformována konstruktem ARPC1GFP (B) a následně označena protilátkou proti aktinu (C). Jedná se o maximální projekci 4 po sobě jdoucích konfokálních řezů o tloušťce 0,4 μm.

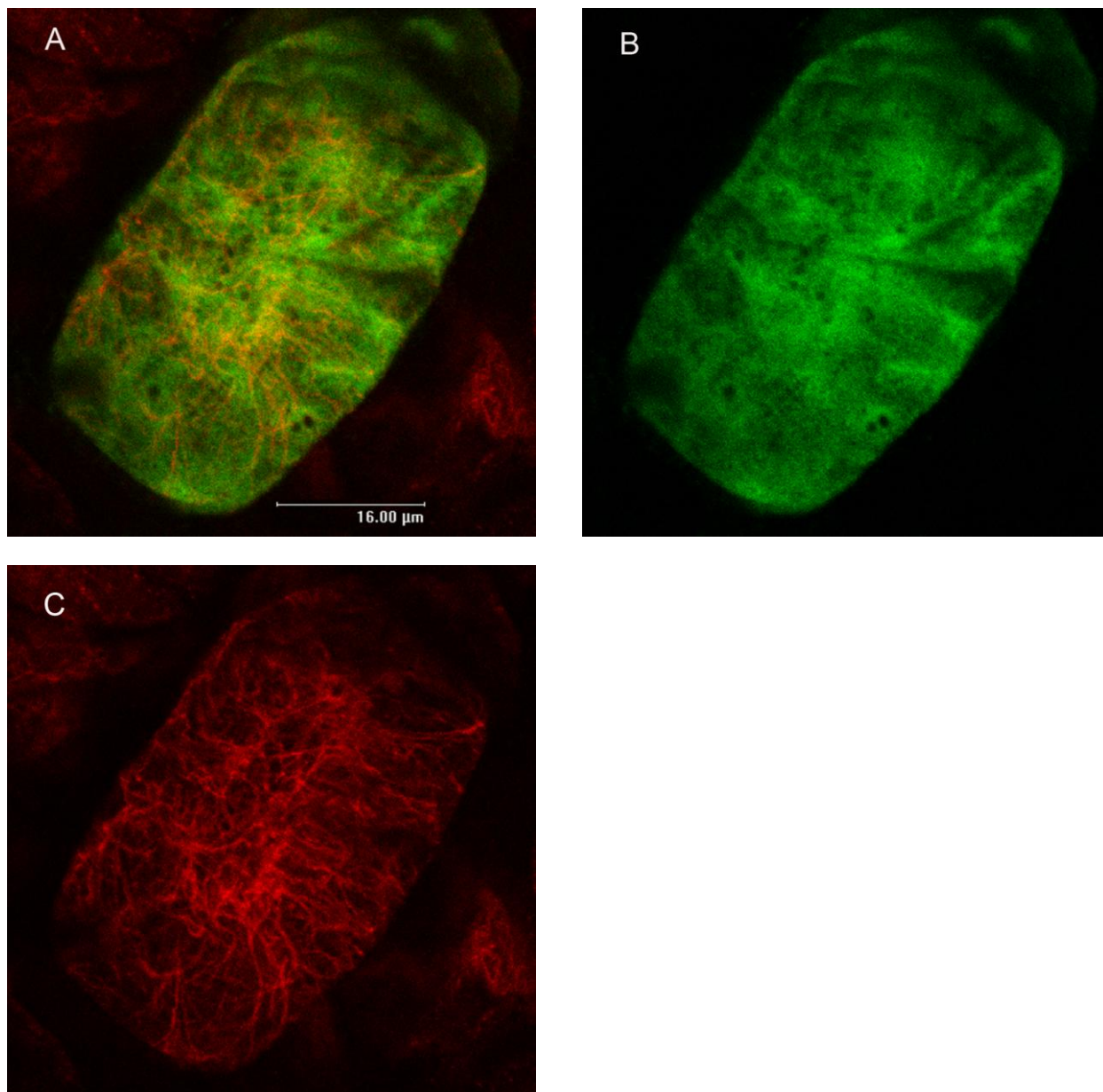


Tabule 7



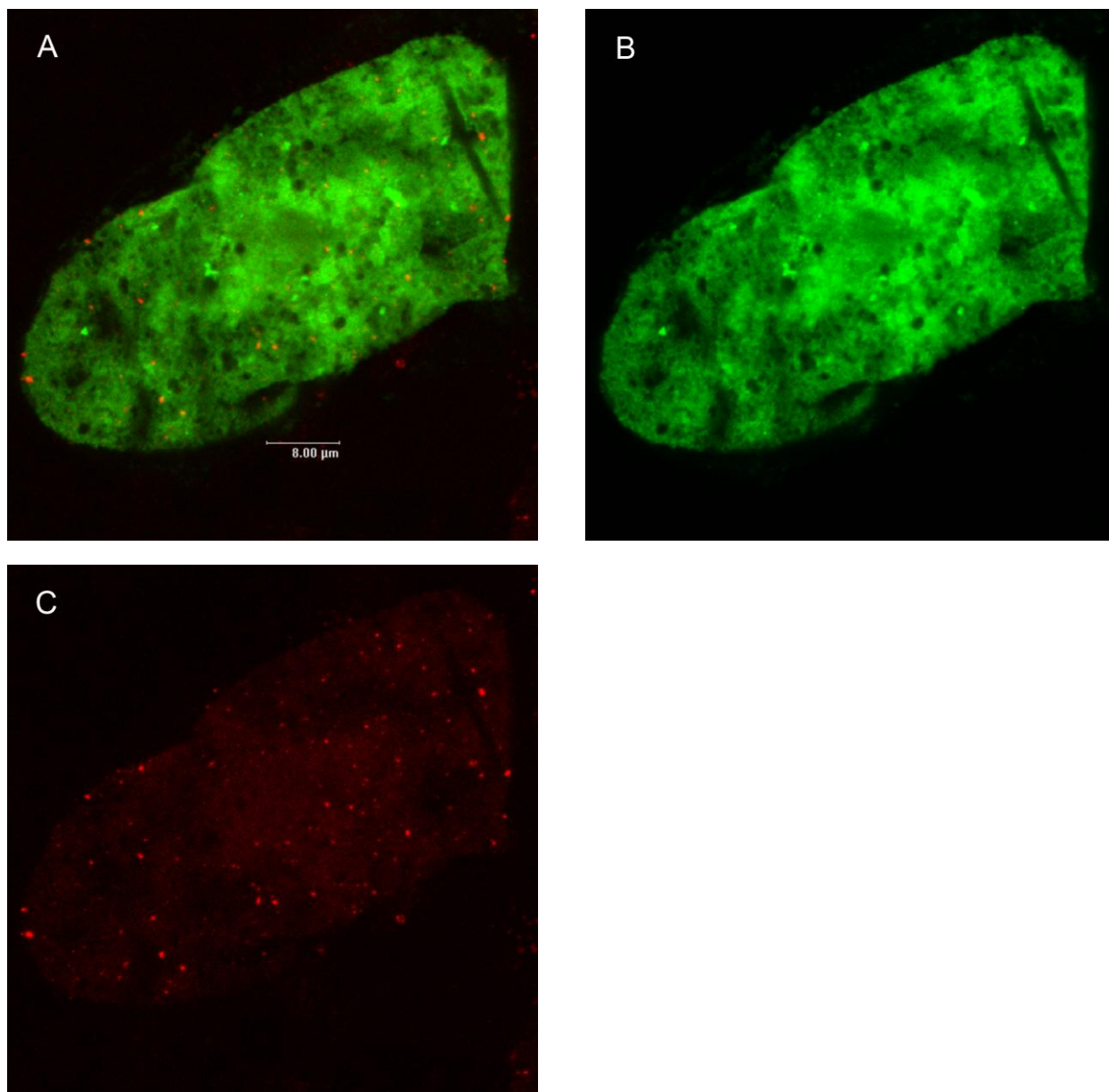
Tabule č.7 dokumentuje 3 denní buňku BY-2, která byla biolistickou metodou transformována konstruktem ARPC2GFP(B) a následně označena protilátkou proti aktinu(C). Je zde patrná kolokalizace s aktinem. Jedná se o konfokální řezy o tloušťce 0,8 μm.

Tabule 8



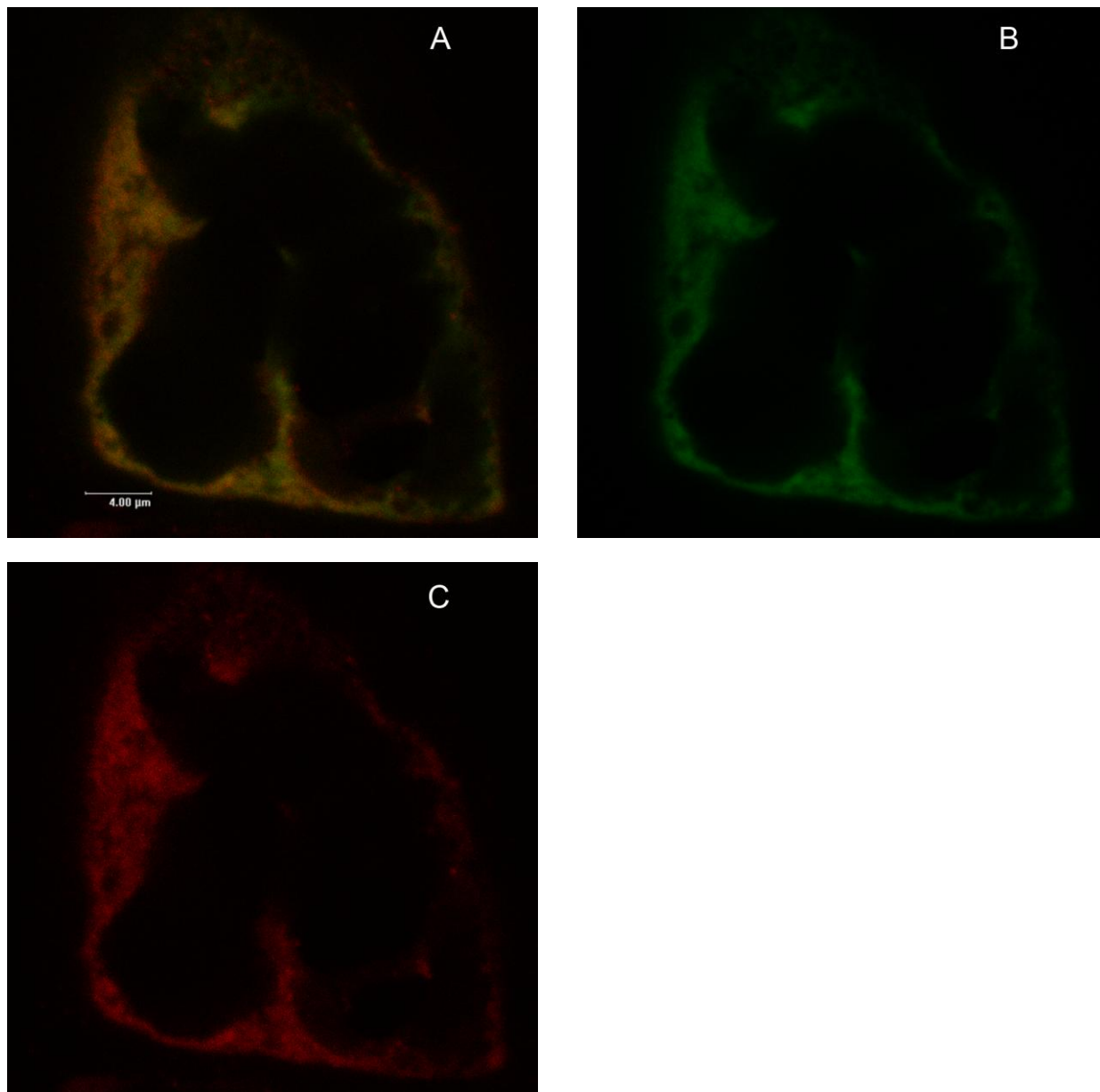
Tabule č.8 obsahuje obrázky 3 denní BY-2 buňky transformované konstruktem ARPC3GFP(B) a následně značené protilátkou proti aktinu (C). Jedná se o maximální projekci 4 po sobě jdoucích konfokálních řezů o tloušťce 0,5 μm. Obrázek podává informaci o stavu aktinového skeletu v nastřílené buňce.

Tabule 9



Tabule č.9 obsahuje snímky 3 denní BY-2 transformované konstruktem ARPC2GFP(B) a naznačené protilátkou proti ARP2(C). Jedná se zde o maximální projekci 5 konfokálních řezů o tloušťce 0,4 μm. Je zde patrné že, signál ARPC2GFP se chová nezávisle na ARP2.

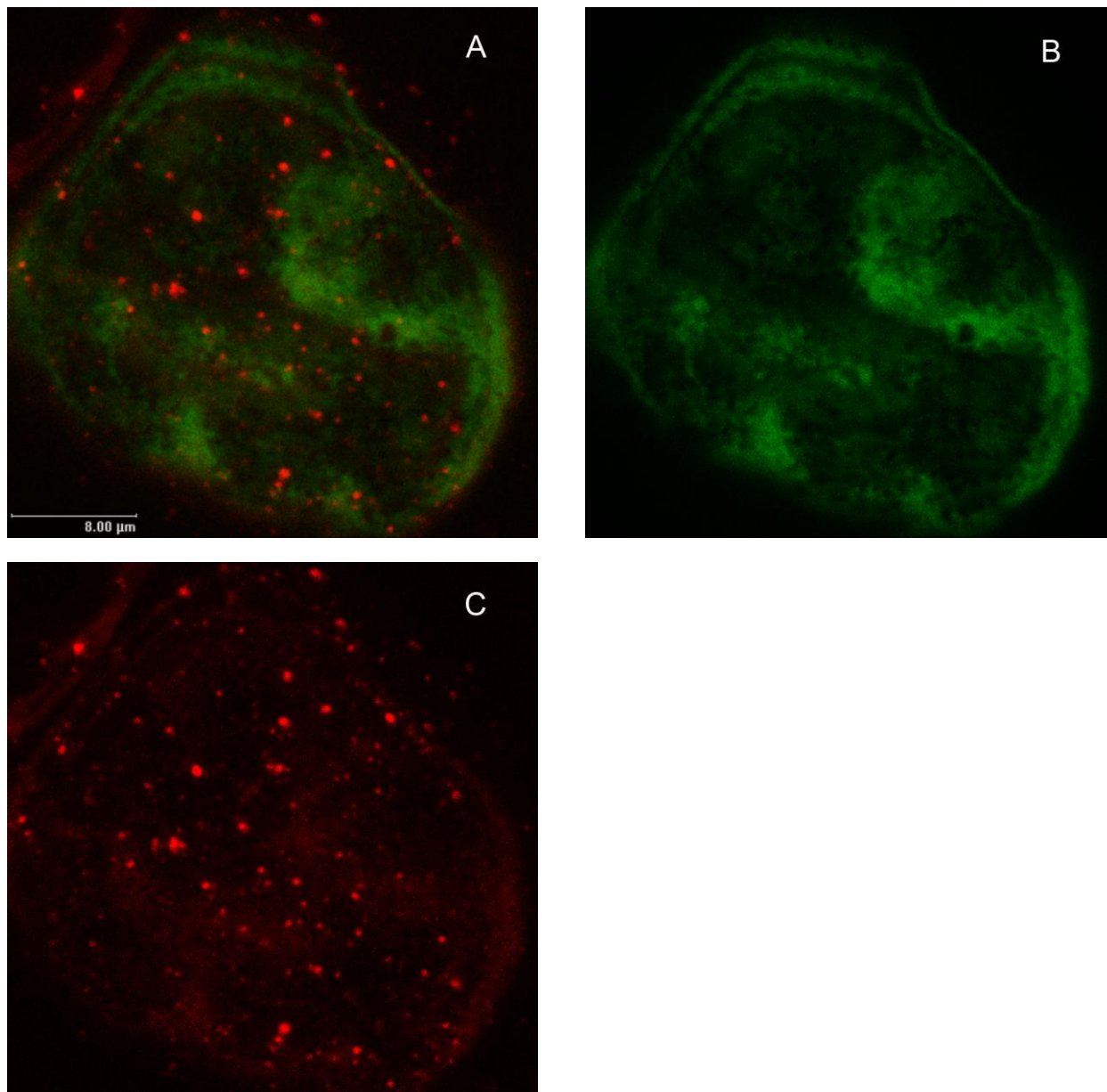
Tabule 10



Tabule 10 nabízí kontrolní snímek, na kterém lze vidět kolokalizaci (A) signálu ARP2GFP(B), kterým byla 3 denní buňky BY-2 transformována a proteinu ARPC2(C), který byl pomocí protilátky naznačen. Tento snímek je důkazem o specifitě ARPC2 protilátky(A).

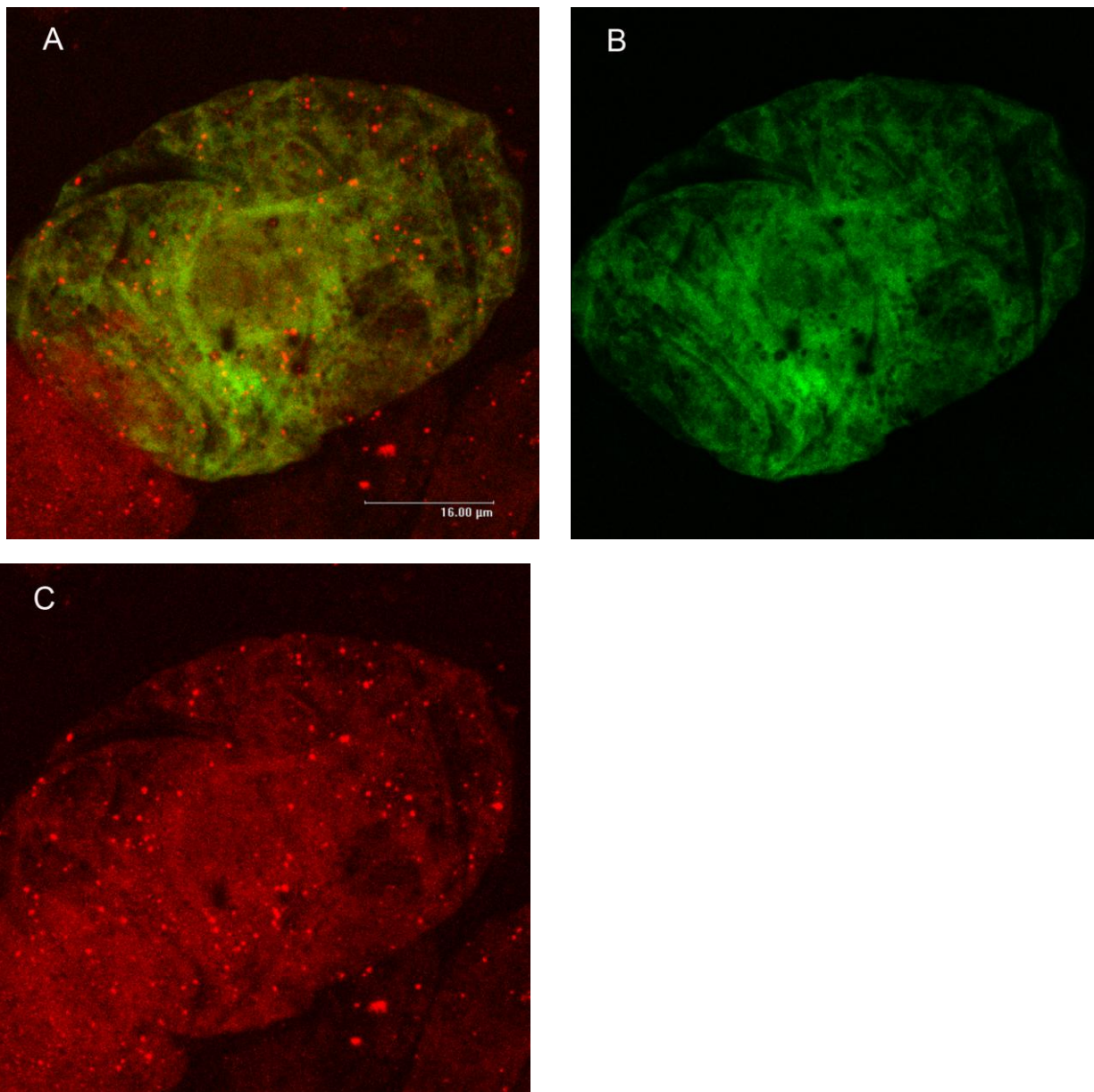


Tabule 11



Tabule 11 Snímky ukazující maximální projekci 5 konfokálních po sobě jdoucích řezů o tloušťce 0,5 μm. Z obrázků je patrné , že lokalizace protilátkou značeného ARP2(C) je nezávislá (C) na lokalizaci ARPC1(B), kterým byla 3 dny stará BY-2 buňka přechodně transformována biolisticou metodou.

Tabule 12



Tabule 12 ukazuje maximální projekce 5 po sobě jdoucích konfokálních řezů o tloušťce 0,6 μm. Na obr. B je vidět signál z nadprodukováného ARP3GFP, který byl do buňky transformován biolistickou metodou. Na obr. C je protilátkou naznačený protein ARP2 ve své typicky tečkovité lokalizaci. Promýtnutí kanálů do sebe ukazuje na nezávislou distribuci ARP2 na nadprodukováném ARP3GFP.

## 7. Shrnutí výsledků

Podařilo se exprimovat rekombinantní ARPC1-His v bakteriích *E.coli*. Podařila se částečně purifikace proteinu ARPC1-His na niklové koloně a protein byl pozitivně detekován na MALDI. Bohužel se nepodařilo izolovat protein v dostatečné čistotě a množství, aby bylo možné postoupit dále k biochemickým experimentům a hledání vazebných partnerů prostřednictvím vyizolované frakce s ARPC1-His. Je nutné v budoucnu optimalizovat proces extrakce ARPC1-His z bakterií a taktéž optimalizovat jeho purifikaci na koloně. V případě ARPC3-His se bohužel nepodařilo protein v bakteriích produkovat.

Stérickou studií pomocí 3D modelu ARP2/3 komplexu a programu Jmol, bylo ukázáno, že N-koncové fúze nemusí vadit při sestavování a správném fungování ARP2/3 komplexu, protože tyto N- koncové části směřují k jeho okraji.

Pomocí restričního štěpení a následnou ligací, byly vyrobeny varianty expresních vektorů obsahujících ARPC1mCherry a ARPC2mCherry, které po použití v biolistické metodě transformace BY-2 buněk, nevykazovaly žádnou specifickou lokalizaci a jejich signál můžeme považovat za difúzní.

Dále bylo využito imunofluorescence a biolistické metody transformace ke kolokalizačním pozorování nadprodukovaných proteinů ARPC1GFP, ARPC2GFP a ARPC3GFP s aktinem, ARP2 a ARPC2. Jako kontrolní buňky byly použity takové, které nebyly biolisticky transformovány. Jako další kontrola sloužily buňky, které byly nastříleny ARPC1GFP, ARPC2GFP, ARPC3GFP a následně byly označeny protilátkou proti aktinu. Zde bylo dokázáno, že střílení a nadprodukce těchto podjednotek, nemá zásadní vliv na aktinový skelet, jehož lokalizace je srovnatelná s buňkami netransformovanými a nenastřílenými. U těchto buněk byla pomocí protilátek určena lokalizace ARP2, ARPC2 a aktinu. Následně byly obrázky těchto buněk porovnány s těmi, které byly před imunoznačením transformovány biolistickou metodou. Jejich

lokalizace nebyla zásadně ovlivněna přítomností nadprodukovaných GFP fúzních podjednotek ARPC1, ARPC2 a ARPC3.



## 8. Diskuze

Záměrem práce bylo blíže studovat interakce jednotlivých podjednotek ARP2/3 komplexu v rostlinné buňce. Tato diplomová práce využila několika již připravených nástrojů pro toto studium, a to vektory obsahující GFP fúze s podjednotkami ARPC1-C5 a protilátky rozeznávající specificky aktin, protein ARP2 (protilátka připravená proti kvasinkovému ARP2) a protein ARPC2 (protilátka připravená proti tabákovému ARPC2, připravená v naší laboratoři) studovaného komplexu. K dispozici byly také informace o lokalizaci podjednotky ARPC2 ve fúzi s GFP po transienční transformaci buněk BY-2, kdy byla pravidelně pozorována tvorba vláken v buňkách overexprimujících ARPC2-GFP. Tato vlákna jsou překvapivě ko-lokalizována s mikrotubuly, jak bylo zjištěno dalšími pracovníky v naší laboratoři. Interakce ARPC2 s mikrotubuly byla dále potvrzena *in vitro*, kdy rekombinantní protein ARPC2 interagoval přímo s mikrotubuly (Havelková et al., nepublikováno).

Konkrétním záměrem bylo tedy pokusit se získat rekombinantní proteiny některých podjednotek komplexu (tabákového ARPC1 a ARPC3) a použít je pro analýzu interakce jak s dalšími podjednotkami (především ARPC2), ale také pro analýzu interakce s aktinem a mikrotubuly *in vitro*. Důvodem tohoto prvního cíle byla možnost, že i některé další podjednotky rostlinného ARP2/3 komplexu mají schopnost interagovat nejen s aktinem, ale též mikrotubuly. První cíl byl částečně splněn, neboť overexprese ARPC1 podjednotky v bakteriích byla úspěšná. Problémy ovšem nastaly během purifikace na afinitní koloně, neboť výsledná frakce obsahovala studovaný protein v pouze nízké koncentraci, která nebyla použitelná pro další analýzu. Vzhledem k nedostatku času nebylo možné optimalizovat krok purifikace proteinu. Optimalizace by mohla zahrnovat inkubace bakterií s expresním vektorem po delší dobu, při nízké teplotě, aby bylo zabráněno tvorbě inkluzí. Jelikož častým problémem bylo získání proteinu ARPC1 sonikační metodou, díky poměrně velké zbytkové koncentraci ARPC1 proteinu v peletě po sonikaci, nabízí se jako alternativa využití metody „french press“.

Vektory byly využity pro expresi ARPC1-GFP a ARPC3-GFP v buňkách, jako kontrola byl exprimován i ARPC2-GFP, jehož exprese je studována v naší laboratoři

v samostatném projektu. Studium lokalizace těchto proteinů v buňce ukázalo, že nadprodukované proteiny s fluorescenční značkou mají do jisté míry unikátní lokalizaci. ARPC1 bylo lokalizováno většinou do tzv. teček, které se nacházely v cytoplazmě. ARPC3 naopak vykazoval lokalizaci vždy difúzní, bez specifických struktur. Naproti tomu ARPC2 dle očekávání vytvářel vlákna či tečky v cytoplazmě. Rozdílné způsoby lokalizace nadprodukovaného proteinu ukazují na specifické role či vlastnosti proteinů komplexu, které uplatňují v komplexu, či případně by mohly představovat specifické vlastnosti podjednotek mimo komplex. Druhá hypotéza však musí být teprve prokázána. Je třeba zmínit, že výše zmíněné lokalizace nepředstavovaly jediný typ lokalizace. V každém experimentu byly nalezeny i buňky, ve kterých byly exprimované proteiny lokalizovány víceméně difúzně. Těchto buněk byla většinou menšina a difúzní lokalizaci v nich lze vysvětlit buď poškozením buněčného aparátu střelbou, kdy umírající buňka stačila protein exprimovat, avšak specifické lokalizace již nebylo kvůli pokračující buněčné smrti možno dosáhnout. Případně je možné, že proteiny své specifické lokalizace dosahují až po dosažení určité kritické koncentrace rekombinačního proteinu v buňce, přičemž v buňce s nízkou koncentrací proteinu lze pozorovat protein jako difúzní.

Dalším záměrem bylo studovat interakce mezi podjednotkami a cytoskeletem pomocí transientních expresí a ko-expresí podjednotek. Cílem této práce bylo především blíže studovat interakce mezi jednotlivými podjednotkami a více osvětlit dosavadní informace především o interakci ARPC1, ARPC2 a ARPC3 podjednotek. Pokud jednotlivé podjednotky budou vykazovat specifickou lokalizaci v buňkách overexprimujících rekombinantní proteiny s fluorescenčními markery, bylo by teoreticky možné studovat interakce mezi podjednotkami tak, že podjednotky mění svou lokalizaci v závislosti na další ko-expresované podjednotce. Pro tento účel bylo třeba vytvořit fúzní proteiny studovaných podjednotek s fluorescenčním markerem spektrálně odlišným od GFP. Na základě předchozích zkušeností byl vybrán fluorescenční protein mCherry, který se osvědčil v předchozích studiích laboratoře např. pro vizualizaci aktinu pomocí fimbrin-mCherry fúze. Stérická studie ukázala, že N-konec studovaných proteinů je vhodný pro fúzi s fluorescenční značkou, neboť se nachází relativně na povrchu komplexu. Mé výsledky bohužel ukázaly, že ačkoliv GFP v N-terminální lokalizaci pravděpodobně neinterferoval s funkcí proteinu, v případě mCherry zřejmě

k podobné interferenci dochází. Důkazem je fakt, že ARPC1-GFP fúzní protein, který vykazoval po transientní expresi specifickou lokalizaci většinou do tzv. teček, vyskytujících se v cytoplazmě, vykazoval pouze nescifickou, difúzní lokalizaci, pokud byl ve fúzi s mCherry (ARPC1-mCherry). Důvodem rozdílného chování fluorescenčních proteinů ve fúzi se studovanými proteiny snad spočívá v rozdílech ve 3D struktuře proteinů GFP a mCherry, kdy připojený mCherry zřejmě brání funkci proteinu, v našem případě některé z důležitých interakcí ARPC1 v buňce. Rozdíly v lokalizaci proteinů v závislosti na fúzi s fluorescenčními proteiny bohužel znemožnila pokračovat v této analýze. V budoucnosti bude třeba testovat další fluorescenční fúze pro správnou volbu druhého fluorescenčního proteinu. V současné době existuje široká škála těchto fluorescenčních markerů, které bude možno využít.

Protože k dispozici pro mou práci byly též protilátky, rozeznávající specificky ARP2 a ARPC2 podjednotky, byly tyto protilátky využity pro obdobnou analýzu. Podjednotky byly imunolokalizovány v buňkách, kde byly transientně exprimovány další podjednotky. V tomto případě se ovšem jednalo o nadprodukcii jedné podjednotky a lokalizaci další podjednotky, jejíž koncentrace v buňce byla nativní. Zajímalo mě, zda tyto podjednotky ko-lokalizují, případně zda se mění lokalizace podjednotky „nativní“ koncentrace v buňce vizualizované pomocí protilátek, kde dojde k overexpresi další podjednotky.

I tyto experimenty bude třeba opakovat pro lepší pochopení výsledků, neboť v rámci této diplomové práce jsem z časových důvodů mohl provést jen málo opakování experimentů. Experimenty byly časově velmi náročné, neboť pro pozorování se hodily pouze transformované buňky, ve kterých byl imunofluorescencí naznačen další epitop. Frekvence transientní transformace biolistickou metodou je však relativně malá, takže pro studium dostatečného počtu dvojitě označených buněk by bylo třeba experimenty několikrát zopakovat.

Mé dosavadní výsledky ukazují, že nadprodukované proteiny ARPC1, ARPC2 a ARPC3 ve fúzi s GFP dobře ko-lokalizují s aktinovým cytoskeletem. Tento výsledek je očekávaný, protože se jedná o podjednotky komplexu interagujícího s aktinem. V experimentech jsem neprokázal, že aktinový cytoskelet je nějak ovlivněn v buňkách exprimujících jednotlivé podjednotky komplexu. Nedostatek dobře označených buněk

však bohužel neumožnil např. studium ko-lokalizace ARPC2-GFP vláken s anti-aktinovou, anti-ARP2 a anti-ARPC2 protilátkou, protože v imunolokalizačních experimentech se mi nepodařilo nalézt buňky, ve kterých byla během transientní transformace vlákna ARPC2 vytvořena. Ko-lokalizace ARPC2-GFP vláken s dalšími podjednotkami by přitom byla extrémně zajímavá a pomohla by nám lépe pochopit interakce v rámci komplexu a komplexu samotného. V budoucnosti bude třeba tyto experimenty zopakovat v dostatečném opakování.

Kontrolní „křížové“ značení buněk exprimujících ARPC2-GFP s označeným anti-ARPC2 pomocí protilátky prokázalo, že protilátka rozeznává nejen endogenní protein, ale též rekombinantní protein s GFP značkou, neboť ko-lokalizace byla téměř 100%. Je to opět výsledek, který lze očekávat, a představuje důležitou kontrolu.

Protilátka anti-ARP2 vizualizovala v buňkách BY-2 specifické struktury ve formě teček. V mých experimentech jsem neprokázal, že jde o stejné tečky, které lze pozorovat po overexpresi ARPC1-GFP či ARPC2-GFP. Obrázek v tab. 10 ukazuje, že tečky vizualizované anti-ARP2 protilátkou nejsou totožné s tečkami ARPC2-GFP. V případě teček vytvářených v buňkách exprimujících ARPC1-GFP také nebyla prokázána kolokalizace s ARP2 tečkami vizualizovanými protilátkou, důvodem byl ale nedostatek buněk exprimujících ARPC1-GFP, kde by fúzní protein lokalizoval do typických teček. Jak již bylo řečeno, kolokalizace ARP2 teček nebylo možno pozorovat s vysoce zajímavými vlákny ARPC2-GFP, neboť takovéto buňky nebyly v mnou provedených experimentech nalezeny a bude třeba tedy experimenty opakovat. V buňkách exprimujících ARPC3-GFP není prozatím možné prokázat kolokalizaci s ARP2 či ARPC2, vizualizovaných pomocí protilátek, neboť difúzní lokalizace ARPC3 není specifická.

## 9. Reference

**Ayscough KR**, (2005) Coupling actin dynamics to the endocytic process in *Saccharomyces cerevisiae*. *Protoplasma* 226:81-88

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

**Basu D**, Le J, El Essal SED, Huang S, Zhang CH, Mallery EL, Koliantz G, (2005) DISTORTED3/SCAR2 is a putative *Arabidopsis* WavE complex subunit that activates the ARP2/3 complex and is required for epidermal morphogenesis. *Plant Cell* 17:502-524

**Biyasheva A**, Svitkina T, Kunda P, Baum B, Borisy G, (2004) Cascade pathway of filopodia formation downstream of SCAR. *J Cell Sci* 117:837-848

**Boldogh IR**, Yang HC, Nowakowski WD, Karmon SL, Hays LG, Yates JR, (2001) ARP2/3 complex and actin dynamics are required for actin-based mitochondrial motility in yeast. *P Natl Acad Sci USA* 98:3162-3167

**Brembu T**, Winge P, Seem M, Bones AM, (2004) NAPP and PIRP encode subunits of a putative wave regulatory protein complex involved in plant cell morphogenesis. *Plant Cell* 16:3168

**Buchanan BB**, Gruissem W, Jones RL, (2000) *Biochemistry and Molecular biology of Plants* Am. Soc. of Plant Biol.

**Caron E**, Crepin V, Simpson N, Knutton S, Garmendia J, Frankel G, (2006) Subversion of actin dynamics by EPEC and EHEC. *Curr Opin Microbiol* 9(1):40-5

**Carreno S**, Engqvist-Goldstein AE, Zhang CX, McDonald KL, Drubin DG, (2004) Actin dynamics coupled to clathrin-coated vesicle formation at the trans-Golgi network. *J Cell Biol* 165:781-788

**Chen M**, Shen X, (2007) Nuclear actin and actin-related proteins in chromatin dynamics. *Current Opinion in Cell Biology*, 19:326-330

**Deeks MJ**, Hussey PJ, (2005) ARP2/3 and scar: Plants move to the fore. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:954-964

**Djakovic S**, Dyachok J, Burke M, Frank MJ, Smith LG, (2006) BRICK1/HSPC300 functions with SCAR and the ARP2/3 complex to regulate epidermal cell shape in *Arabidopsis*. *Dev* 133:1091-1100

**Dos Remedios CG**, Chhabra D, Kekic M, Dedoova IV, Tsubakihara M, Berry DA, Nosworthy NJ, (2003) Actin binding proteins: Regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol. Rev.* 83:433-473

**Duncan MC**, Cope MJ, Goode BL, Wendland B, Drubin DG, (2001) Yeast Eps15-like endocytic protein, Pan1p, activates the ARP2/3 complex. *Nat Cell Biol.* Jul;3(7):687-90

**Egile CT**, Loisel TP, (1999) Activation of the CDC42 effector N-WASP by the *Shigella flexneri* IcsA protein promotes actin nucleation by ARP2/3 complex and bacterial actin-based motility." *J. Cell Biol.* 146, 1319-1332.

**Eitzen G**, Wang L, Thorngren N, Wickner W, (2002) Remodeling of organelle-bound actin is required for yeast vacuole fusion. *J Cell Biol* 158:669-679

**El Assall SED**, Le J, Basu D, Mallery EL, Szymanski DB, (2004) *Arabidopsis* GNARLED encodes a NAP125 homolog that positively regulates ARP2/3. *Curr Biol* 14:1405-1409

**EI Assall SED**, Le J, Basu D, Mallery EL, Szymanski DB, (2004) DISTORTED2 encodes an ARPC2 subunit of the putative *Arabidopsis* ARP2/3 complex. *Plant J* 38:526-538

**Firat-Karalar EN**, Welch MD, (2011) New mechanisms and functions of actin nucleation. *Current Opinion in Cell Biology*, 23, 4-13.

**Fu Y**, Wu G, Yang ZB, (2001) Rop GTP-ase dependent dynamics of tip-localized F-actin controls tip growth in pollen tubes. *J Cell Biol* 152:1019-1032

**Gu Y**, Vernoud V, Fu Y, Yang Z, (2003) ROP GTPase regulation of pollen tube growth through the dynamics of tip-localized F-actin. *J Exp Bot. Jan;54(380):93-101*

**Hepler PK**, Vidali L, Cheung AY, (2001) Polarized cell growth in higher plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:159-187

**Herman IM**, (1993) Actin isoforms. *Current Opinion in Cell Biology* 5:48-55

**Hudson AM**, Cooley L, (2002) Understanding the function of actin-binding proteins through genetic analysis of *Drosophila* oogenesis. *Annu Rev Gen* 36:455-488

**Hussey PJ**, Ketelaar T, Deeks MJ, (2006) Control of the actin cytoskeleton in plant cell growth. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 109-125.

**Hu P**, Wu S, Hernandez N, (2004) A role for beta-actin in RNA polymerase III transcription. *Genes Dev* 18:3010-3015

**Chesarone MA**, Goode BL, (2009) Actin nucleation and elongation factors: mechanisms and interplay. *Current Opinion in Cell Biology*, 21, 28-37.

**Ibarra N**, Pollit A, Insall RH, (2005) Regulation of actin assembly by SCAR/WAVE proteins. *Biochem Soc Trans* 33:1243-1246

**Ingouff M**, Gerald JNF, Guerin C, Robert H, Sorensen MB, Van Damme D, Geelen D, Blanchoin L & Berger F, (2005) Plant formin AtFH5 is an evolutionarily conserved actin nucleator involved in cytokinesis. *Nature Cell Biology*, 7, 374-U34.

**Jones MA**, Shen JJ, Fu Y, Li H, Yang Z, Grierson CS, (2002) The *Arabidopsis* Rop2 GTPase is a positive regulator of both root hair initiation and tip growth.

**Jonsson AP**, Aissouni Y, Palmberg C, Peripalle P, Nordling E, Daneholt B, Jorrvall H, Bergman T, (2001) Recovery of gel-separated proteins for in-solution digestion and mass spectrometry. *Anal Chem* 73:5370-5377

**Kukalev A**, Nord Y, Palmberg C, Bergman T, Percipalle P, (2005) Actin and hnRNP U cooperate for productive transcription by RNA polymerase II *Nat Struct Mol Biol*; 12:238-244

**Le J**, El Assal SED, Basu D, Saad ME, Szymanski DB, (2003) Requirements for *Arabidopsis* BRICK1/HSPC300 is an essential WAVE-complex subunit that selectively stabilizes the ARP2/3 activator SCAR2. *Curr Biol* 16:895-901

**Lee YJ**, Szumlanski A, Nielsen E, Yang Z, (2008) Rho-GTPase-dependent filamentous actin dynamics coordinate vesicle targeting and exocytosis during tip growth. *J Cell Biol* Jun 30;181(7):1155-68

**Li SD**, Blanchoin L, Yang ZB, Lord EM, (2003) The putative *Arabidopsis* ARP2/3 complex controls leaf cell morphogenesis. *Plant Physiol* 132:2034-2044

**Luna A**, Matas OB, Martinez-Menarguez JA, Mato E, Duran JM, Ballesta J, (2002) Regulation of protein transport from the golgi complex to the endoplasmic reticulum by CDC42 and N-WASP. *Mol Biol Cell* 13:866-879



**Ma L**, Rohatgi R, Kirschner MW, (1998) The ARP2/3 complex mediates actin polymerization induced by the small GTP-binding protein Cdc42. *P Natl Acad Sci USA* 95:15362-15367

**Machesky LM**, Atkinson SJ, Ampe C, Vandekerckhove J, Pollard TD (1994) Purification of a cortical complex containing 2 unconventional actins from *Acanthamoeba* by affinity chromatography on profilin agarose. *J Cell Biol* 127: 107-115

**Matas OB**, Martinez-Menarguez J, Egea G, (2004) Association of CDC42/N-WASP/ARP2/3 signaling pathway with golgi membranes. *Traffic* 5:838-846

**Mathur J**, (2005) The ARP2/3 complex: giving plant cells a leading edge. *Bioessays* 27:377-387

**Mathur J**, Mathur N, Kirik V, Kernberk B, Hulskamp M, (2003) Mutations in actin-related proteins 2 and 3 affect cell shape development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15: 1632-1645

**Mathur J**, Spielhofer P, Kost B, Chua NH, (1999) The actin cytoskeleton is required to elaborate and maintain spatial patterning during trichome cell morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Dev* 126:5559-5568

**McKinney EC**, Kandasamy MK, Meagher RB, (2002) Arabidopsis contains ancient classes of differentially expressed actin-related protein genes. *Plant Physiol* 128:997-1007

**Merrifield CJ**, (2004) Seeing is believing: imaging actin dynamics at single sites of endocytosis. *Trends Cell Biol* 4:352-358

**Miller KG**, (2002) Extending the ARP2/3 complex and its regulation beyond the leading edge. *J Cell Biol* 156:591-593

**Muller J**, Oma Y, Vallar L, Friederich E, Poch O, Winsor B, (2005) Sequence and comparative genomic analysis of actin-related proteins. *Mol Biol Cell*, 16:5736-5748

**Mullins RD**, Heuser JA, Pollard TD, (1998) The interaction of ARP 2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6181-6186

**Nagata T**, Nemoto Y, Hasezawa S, (1992) Tobacco BY-2 cell line as the „HeLa“ cell line in the biology of the higher plants. *Int Rev Cytol* 132:1-30

**Pollard TD**, Borisy GG (2003) Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112:453-465

**Pollard TD**, Blanchoin L, Mullins RD, (2000) Molecular mechanism controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Ann Rev Biophys Biomol Struct* 29:545-576

**Pollitt A**, Insall R, (2006) WASP and SCAR/WAVE proteins: the drivers of actin assembly. *Journal of Cell Science* 122, 2575-2578

**Qin Y, Yang Z, (2011)** Rapid tip growth: Insights from pollen tubes *Semin Cell Dev Biol*. 2011 Jun 25

**Qualmann B**, Kessels MM, Kelly RB, (2000) Molecular links between endocytosis and the actin cytoskeleton. *J Cell Biol*. Sep 4;150(5):F111-6

**Robinson RC**, Turbedsky K, Kaiser DA, Marchand JB, Higgs HN, Choe S, Pollard TD, (2001) Crystal structure of ARP2/3 complex. *Science* 294:1679-1684

**Rohatgi R**, Ma L, Miki H, Lopez M, Kirchhausen T, Takenawa T, Kirschner MW, (1999) The interaction between N-WASP and the ARP2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell* 97:221-231

**Saedler R**, Mathur N, Srinivas BP, Kernebeck B, Hulskamp M, Mathur J, (2004) Actin control over microtubules suggested by DISTORTED2 encoding the *Arabidopsis* ARPC2 subunit homolog. *Plant Cell Physiol* 45:813-822

**Sawa M**, Suetsugu S, Sugimoto A, Miki H, Yamamoto M, Takenawa T, (2003) Essential role of the *C. elegans* ARP2/3 complex in cell migration during ventral enclosure. *J Cell Sci* 116:1505-1518

**Seastone DJ**, Harris E, Temesvari LA, Bear JE, Saxe CL, Cardelli J, (2001) The WASp-like protein Scar regulates macropinocytosis, phagocytosis and endosomal membrane flow in *Dictyostelium*. *J Cell Sci* 114: 2673-2683

**Staiger CJ**, Blanchoin L (2006) Actin dynamics: old friends with new stories. *Current Opinion in Plant Biology*, 9, 554-562.

**Welch MD**, DePace AH, Verma S, Iwamatsu A, Mitchison TJ, (1997a) The human ARP2/3 complex is composed of evolutionary conserved subunits and is localized to cellular regions of dynamic actin filament assembly. *J Cell Biol* 138:375-384

**Welch MD**, Iwamatsu A, Mitchison TJ, (1997b) Actin polymerization is induced by ARP2/3 protein complex at the surface of *Listeria monocytogenes* . *Nature* 385:265-269

**Winter D**, Podtelejnikov AV, Mann M, Li R, (1997) The complex containing actin-related proteins ARP2 and ARP3 is required for the motility and integrity of yeast actin patches. *Curr Biol* 7:519-529

**Yarar D**, To W, Abo A, Welch MD, (1999) The Wiskott-Aldrich syndrome protein directs actin-based motility by stimulating actin nucleation with the ARP2/3 complex. *Curr Biol* 9:555-558

**Zallen JA**, Cohen Y, Hudson AM, Cooley L, Wieschaus E, Schejter ED, (2002) SCAR is a primary regulator of ARP2/3 dependent morphological event in *Drosophila*. J Cell Biol 1156:689-701

**Zhang XG**, Dyachok J, Krishakumar S, Smith LG, Oppenheimer DG, (2005) IRREGULAR TRICHOME BRANCH1 in *Arabidopsis* encodes a plant homolog of the actin-related protein 2/3 complex activator Scar/WAVE that regulates actin and microtubule organization. Plant cell 17:2314-2326



GAGTCCGGGCTGCGCGTTGGTGCGGATATCTCGGTAGTGGGATACGACGATAACC  
GAAGACAGCTCATGTTATATCCCGCCGTTAACCACCATCAAACAGGATTTTCGCCT  
GCTGGGGCAAACCAGCGTGGACCGCTTGCTGCAACTCTCTCAGGGCCAGGCGGT  
GAAGGGCAATCAGCTGTTGCCCGTCTCACTGGTGAAAAGAAAAACCACCTGGCG  
CCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGG  
CACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTAA  
GTTAGCTCACTCATTAGGCACCGGGATCTCGACCGATGCCCTTGAGAGCCTTCAA  
CCCAGTCAGCTCCTTCCGGTGGGCGCGGGGCATGACTATCGTCGCCGCACTTATG  
ACTGTCTTCTTTATCATGCAACTCGTAGGACAGGTGCCGGCAGCGCTCTGGGTGAT  
TTTCGGCGAGGACCGCTTTCGCTGGAGCGCGACGATGATCGGCCTGTCGCTTGC  
GGTATTCGGAATCTTGACGCCCCTCGCTCAAGCCTTCGTCACTGGTCCCGCCACC  
AAACGTTTTCGGCGAGAAGCAGGCCATTATCGCCGGCATGGCGGCCCCACGGGTG  
CGCATGATCGTGCTCCTGTGCTTGAGGACCCGGCTAGGCTGGCGGGGTTGCCTTA  
CTGGTTAGCAGAATGAATCACCGATACGCGAGCGAACGTGAAGCGACTGCTGCTG  
CAAAACGTCTGCGACCTGAGCAACAACATGAATGGTCTTCGGTTTCCGTGTTTCGT  
AAAGTCTGGAAACGCGGAAGTCAGCGCCCTGCACCATTATGTTCCGGATCTGCAT  
CGCAGGATGCTGCTGGCTACCCTGTGGAACACCTACATCTGTATTAACGAAGCGC  
TGGCATTGACCCTGAGTGATTTTTCTCTGGTCCCGCCGCATCCATACCGCCAGTTG  
TTTACCCTCACAACGTTCCAGTAACCGGGCATGTTTCATCATCAGTAACCCGTATCG  
TGAGCATCCTCTCTCGTTTTCATCGGTATCATTACCCCATGAACAGAAATCCCCCTT  
ACACGGAGGCATCAGTGACCAAACAGGAAAAAACCGCCCTTAACATGGCCCGCTT  
TATCAGAAGCCAGACATTAACGCTTCTGGAGAACTCAACGAGCTGGACGCGGAT  
GAACAGGCAGACATCTGTGAATCGCTTCACGACCACGCTGATGAGCTTTACCGCA  
GCTGCCTCGCGCGTTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCC  
GGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCA  
GGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGCGGGGCGCAGCCATGACCCAGTCAC  
GTAGCGATAGCGGAGTGTATACTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTA  
CTGAGAGTGCACCATATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAA  
ATACCGCATCAGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTC  
GTTCCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCA  
CAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGC  
CAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCT

GACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGAC  
TATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCG  
ACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGC  
TTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAG  
CTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTA  
ACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGC  
CACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTG  
AAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCT  
GCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAA  
CCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAA  
AAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAA  
CGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAACAATAAACTGTCTGCTTACATAA  
ACAGTAATACAAGGGGTGTTATGAGCCATATTCAACGGGAAACGTCTTGCTCTAGG  
CCGCGATTAAATTCCAACATGGATGCTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCGCGA  
TAATGTCGGGCAATCAGGTGCGACAATCTATCGATTGTATGGGAAGCCCGATGCG  
CCAGAGTTGTTTCTGAAACATGGCAAAGGTAGCGTTGCCAATGATGTTACAGATGA  
GATGGTCAGACTAACTGGCTGACGGAATTTATGCCTCTTCCGACCATCAAGCATT  
TTATCCGTA CTCTGATGATGCATGGTACTCACCCTGCGATCCCCGGGAAACA  
GCATTCCAGGTATTAGAAGAATATCCTGATTCAGGTGAAAATATTGTTGATGCGCT  
GGCAGTGTTCTGCGCCGGTTGCATTTCGATTCCTGTTTGTAAATTGCCTTTTAA  
GCGATCGCGTATTTCTGCTCGCTCAGGCGCAATCACGAATGAATAACGGTTTGGTT  
GATGCGAGTGATTTTGTGACGAGCGTAATGGCTGGCCTGTTGAACAAGTCTGGA  
AAGAAATGCATAAACTTTTGCCATTCTCACCGGATTCAGTCGTCACTCATGGTGATT  
TCTCACTTGATAACCTTATTTTTGACGAGGGGAAATTAATAGGTTGTATTGATGTTG  
GACGAGTCGGAATCGCAGACCGATAACCAGGATCTTGCCATCCTATGGAACCTGCCT  
CGGTGAGTTTTCTCCTTCATTACAGAAACGGCTTTTTTCAAAAATATGGTATTGATAA  
TCCTGATATGAATAAATTGCAGTTTCATTTGATGCTCGATGAGTTTTTCTAAGAATTA  
ATTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAATAGGGGTTCC  
GCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGAAATTGTAAACGTTAATTTTTGTTAAA  
ATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGG  
CAAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTTGTTCCAG  
TTTGAACAAGAGTCCACTATTAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAA

ACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCCCTAATCAAGTTTTTT  
GGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCCGATTT  
AGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCG  
AAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGCGCGTAACC  
ACCACACCCGCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCCATTGCGCA

### **Sekvence vektoru pGreen 0029**

>pGreen0029, 4632 bp

AGCCTGGCGAACAGTTCGGCTGGCGCGAGCCCCTGATGCTCTTCGTCCAGATCAT  
CCTGATCGACAAGACCGGCTTCCATCCGAGTACGTCTCGCTCGATGCGATGTTT  
CGCTTGGTGGTCGAATGGGCAGGTAGCCGGATCAAGCGTATGCAGCCGCCGCAT  
TGCATCAGCCATGATGGATACTTTCTCGGCAGGAGCAAGGTGAGATGACAGGAGA  
TCCTGCCCCGGCACTTCGCCCAATAGCAGCCAGTCCCTTCCCGCTTCAGTGACAA  
CGTCGAGCACAGCTGCGCAAGGAACGCCCGTTCGTGGCCAGCCACGATAGCCGCG  
CTGCCTCGTCTTGGAGTTCATTCAGGGCACCGGACAGGTCGGTCTTGACAAAAAG  
AACCGGGCGCCCCTGCGCTGACAGCCGGAACACGGCGGCATCAGAGCAGCCGAT  
TGTCTGTTGTGCCAGTCATAGCCGAATAGCCTCTCCACCCAAGCGGCCGGAGAA  
CCTGCGTGCAATCCATCTTGTTCAATCATGCCTCGATCGAGTTGAGAGTGAATATG  
AGACTCTAATTGGATAACCGAGGGGAATTTATGGAACGTCAGTGGAGCATTTTTGAC  
AAGAAATATTTGCTAGCTGATAGTGACCTTAGGCGACTTTTGAACGCGCAATAATG  
GTTTCTGACGTATGTGCTTAGCTCATTAAACTCCAGAAACCCGCGGCTGAGTGGCT  
CCTTCAACGTTGCGGTTCTGTCAGTTCCAAACGTAAAACGGCTTGTCCCGCGTCAT  
CGGCGGGGGTTCATAACGTGACTCCCTTAATTCTCATGTATCGATAACATTAACGTT  
TACAATTTGCGGCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCG  
GTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGG  
CGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGG  
CCAGTGAATTGTAATACGATATAGGGCGAATTGGGTACCGGGCCCCCCCCTCGAGG  
TCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGGATCCACTAG  
TTCTAGAGCGGCCGCCACCGCGGTGGAGCTCCAGCTTTTGTTCCTTTAGTGAGG  
GTTAATTCCGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTA  
TCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGHCATAAAGTGTAAGCCTG



GGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTT  
TCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGG  
GAGAGGCGGTTTTCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTG  
CGCTCGGTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATAC  
GGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGAAGGCCTTGACAGG  
ATATATTGGCGGGTAAACTAAGTCGCTGTATGTGTTTGTGAGATCTCATGTGAG  
CAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTT  
CCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGG  
TGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCC  
TCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTC  
CCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGG  
TGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGA  
CCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGAC  
TTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAG  
GCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGAC  
AGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTA  
GCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAG  
CAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTAC  
GGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGGTT  
ACAACCAATTAACCAATTCTGATTAGAAAACTCATCGAGCATCAAATGAACTGCA  
ATTTATTCATATCAGGATTATCAATACCATATTTTTGAAAAAGCCGTTTCTGTAATGA  
AGGAGAAAACTCACCGAGGCAGTTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCT  
GCGATTCCGACTCGTCCAACATCAATACAACCTATTAATTTCCCCTCGTCAAAAATA  
AGGTTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAATGGCA  
AAAGTTTATGCATTTCTTTCCAGACTTGTTCAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCAT  
CAAATCACTCGCATCAACCAAACCGTTATTCATTCGTGATTGCGCCTGAGCGAGA  
CGAAATACGCGATCGCTGTTAAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCAACCG  
GCGCAGGAACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTACCTGAATCAGGATATTCTT  
CTAATACCTGGAATGCTGTTTTCCCTGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCA  
TCAGGAGTACGGATAAAATGCTTGATGGTCGGAAGAGGCATAAATTCCGTCAGCC  
AGTTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTT  
TCAGAAACAACCTCTGGCGCATCGGGCTTCCCATACAATCCATAGATTGTCGCACCT

GATTGCCCGACATTATCGCGAGCCCATTTATACCCATATAAATCAGCATCCATGTT  
GGAATTTAATCGCGGCCTGGAGCAAGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCATAACAC  
CCCTTGTATTACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTTATTGTTTCATGATGATATATTTTT  
ATCTTGTGCAATGTAACATCAGAGATTTTGAGACACAACGTGGCTTTGTTGAATAAA  
TCGAACTTTTGCTGAGTTGAAGGATCAGATCACGCATCTTCCCGACAACGCAGACC  
GTTCCGTGGCAAAGCAAAGTTCAAATCACCAACTGGTCCACCTACAACAAAGCT  
CTCATCAACCGTGGCTCCCTCACTTTCTGGCTGGATGATGGGGCGATTCAAGCGA  
TCCCCATCCAACAGCCCCGCGTCGAGCGGGCTTTTTTATCCCCGGAAGCCTGTGG  
ATAGAGGGTAGTTATCCACGTGAAACCGCTAATGCCCCGCAAAGCCTTGATTCACG  
GGGCTTTCCGGCCCCGCTCCAAAACTATCCACGTGAAATCGCTAATCAGGGTACG  
TGAAATCGCTAATCGGAGTACGTGAAATCGCTAATAAGGTCACGTGAAATCGCTAA  
TCAAAAAGGCACGTGAGAACGCTAATAGCCCTTTCAGATCAACAGCTTGCAAACAC  
CCCTCGCTCCGGCAAGTAGTTACAGCAAGTAGTATGTTCAATTAGCTTTTCAATTAT  
GAATATATATATCAATTATTGGTCGCCCTTGGCTTGTGGACAATGCGCTACGCGCA  
CCGGCTCCGCCCGTGGACAACCGCAAGCGGTTGCCACCGTCGAGCGCCAGCGC  
CTTTG

### **Sekvence ARPC1**

>NtARPC1a

ATGGCAGCAACTTCAGTACATAAGTTTGCTCAGTGCATTACTIONTGGCCATGCTTGGAG  
TCCCGACCTCTCCATGATTGCGCTTTGTCTAACAATAGTGAAGTACATATATATAA  
ACTATCCGAGGACAAGTGGGAGAAGGTCCATGTTCTTCAGAAGCATGACCAAATTG  
TGTCTGGTATAGATTGGAGTTCAAGATCCAATAAAATAGTTACTGTTTCTCATGATC  
GTAATTCATATGTTTGGAAACCAAGAAGCGTCAGGGTGGGTACCTACTCTGGTCATT  
CTCAGGCTAAATCGTGCAGCACTTTGTGTGCAGTGGAGTCCAAAAGAAAACAAGTT  
TGCTGTTGGAAGTGGGGCTAAAAGTGTGTATATGCTACTATGAGCAAGAAAATA  
ACTGGTGGGTGAGTAAGCTAATCAGGAAAAGGCATGATTCATCGGTAACAAGTATT  
GCTTGGCATCCGAATAATATTCTCCTAGCAACAACATCCACTGATGGTAAATGTGCG  
AGTATTTTCAACATTCATTAAGGTGTGCGATGCAAAGGACTCTGCAATGGGGAAATT  
CTGCAGATACCAAATTTGGAGAGCAAATTGTCCAGCTTGATCTCTGCTTTTGGCTGG  
GCTTTTGGTGTGATGTTCCCAAGTGGCAATACCTTATCATATGTAGGTCATAA  
CTCAATGATATACTTTGTTGATGAGGTTGGTCCCTCTGCTGCAGCACAAAGTGTAG

CAATCCGCGATTTGCCTCTTCGTGATGTATCGTTTCTTTCTGAAAGGATGGTTGTTG  
GTGTGGGATTTGATTGCAACCCGATGGTATTTGTGGCAGATGAAAGTGGACTCTG  
GAGTTTCTTGAGATTCCTTGATGAGCGGAAAGCAGCGTCGTCAAGTGCTAAATATG  
GATCACAGTTTTCCGAAGCTTTTGGGAAATTCTATGGTCAATCAAAGTATTCAGCCA  
ACAACAATGTTGAGCAGTCAAGAGGGCGCTCATGACAACGTATCAATTGCATATTA  
CCTTGGCAAACAGAGAAAATCTAGTGTCACCCGTTTCAGCACTTCAGGACTTGA  
TGGAAGGTAGTGATATGGGATTTGCAGAAGCAAGAAGATTTATTGGACTATTTAT  
GA

>Protein sequence NtARPC1a

MAATSVHKFAQCITCHAWSPDLSMIALCPNNSEVHIYKLSEDKWEKVHVLQKHDQIVS  
GIDWSSRSNKIVTVSHDRNSYVWNQEASGWVPTLVILRLNRAALCVQWSPKENKFAV  
GSGAKTVCICYEQENWWWVSKLIRKRHDSSVTSIAWHPNNILLATTSTDGKCRVFST  
FIKGVDAKDSAMGNSADTKFGEQIVQLDLCFCWAFGVRWSPSGNTLSYVGHNSMIYF  
VDEVGPSAAAQSVAIRDLPLRDVSFLSERMVVGVGFDNPMVFADESGLWSFLRFL  
DERKAASSSAKYGSQFSEAFGKFYQSKYSANNNVEQSRGAHDNCINCILPLAKQRK  
SSVTRFSTSGLDGKVIWDLQKQEDLLDYL

### **Sequence ARPC2**

>NtARPC2

ATGATATTACTGCAATCTCCCTCCAGATATCTCCTTCAGATCTTGTCCAATCGCGTC  
CAGAATCTTGAGAAAGGAGTTGAACTGGATTGCCAATGGGTTGAATTTGATGATAT  
CCGTTACCATATTCAGGCTTCAGTGAAAAATCCAAATGTCCTGCTTCTTTCAGTATC  
ATTGCCCATACCACCTCCAGAACTGTCCTCTTTGGTGGACTTCCACTTGGAGCTT  
TAGAAGCCATAAAAGCAGCATATGGTGTAGTTGCACAAATTCTTGATCCTCCAAGA  
GATGGATTTAATCTCACACTTAACTGAACTTGTCAAAACCTCCCCAGATGAAGAA  
CACAAACATGCCCTCTTGACAAAGATTGCATCGGTGAGGGAGGTAGTAATGGGAG  
CCCCACTGAGGGCAGTACTAAAACATCTTGTTTCAAGGACAGTTCCTTCCGATCTA  
GGCAAGCCTGTTGCGCTGGTTCATCGGCCAAATGAGTCTTTTTTCTTGTACCTCA

GGTGGACAAGGTCACtGTCATATTTCCCTATGAGATTTAATGATTCTGTAGATACCGtT  
CTtGCAACTTCCTTCCTACAGGAATTTGTTGAGGCAAGGCGAACTGCTGGACTTAA  
CAATGCCCTCCTTGTTTGTGGTCTCCATCTGCTCCTCAAGAACTGAAGGAAGCTT  
TTACAGAAGCATTATCTGCTAATGCCGGATTTGTTAGTTTTGTTCATCTTTCCTCGCC  
ATGTGGAAGGCAGAAAACCTGGACAGAACTGTTTGGAACTATCGACCTTTCATGCT  
TACGTGAATTATCATGTTAAGTGTCTGAATGTTTCATGCACACCCGAATGAGGCGT  
CAGGTGGAGTCACTGATACAGGCCCTTGATCGTGCCAAACCAGACTCTGAGAAGG  
CCAAACGATCTTCTCCAAGCAGATCATTTAAACGAATGAGCCTCAAGGATGGGAAT  
AACAGTTTGGGTTTCGCGAAGTTGGAAGTAG

>protein sequence NtARPC2

MILLQSPSRYLLQILSNRVQNLEKGVELDCQWVEFDDIRYHIQASVKNPNVLLLSVSLPI  
PPPETVLFGLPLGALEAIKAAYGVAQILDPPRDGFNLTLKLNLSKLPPDEEHKHALLT  
KIASVREVMGAPLRAVLKHLVSRTVPSDLGKPVALVHRPNESFFLVPQVDKVTVIFPM  
RFNDSVDTVLATSFLQEFVEARRTAGLNNAPPCLWSPSAPQELKEAFTEALSANAGFV  
SFVIFPRHVEGRKLDRTVWNLSTFHAYVNYHVKCSECFMHTRMRRQVESLIQALDRAK  
PDSEKAKRSSPSRSFKRMSLKDGNNLSLGSRSWK

### **Sekvence ARPC3**

>NtARPC3

ATGGTTTATCATTCCAGTTTTGTTGACGAGGAAGGAATTAGTAAAGCTTGTGGATG  
CCCTTTATTACCTCTGAAAAGCCATATAAAGGGACCTGCTCCAGTTTCAGAACAAG  
ATACAACCTGATATTGTTGATGAAGCAATCACATTCTTCCGAGCAAATGTCTTCTTCA  
AAAACCTTTGATATTAAGCTCATCTGACAAGCTACTTATCTATTTGACATTGTATAT  
CAACATCGCACTAAAGAGGCTTGAAGGCTGCAGAACTTTAGCTGAAGGAACCAAG  
GCTATCATCAACCTAGGTTTGGAAACGGTTCCTGTACCTGGAGAGTCAGGTTTTCC  
ATTCCCAGGCTTATTTACTGCTGCCCAATCTAAAAAGAAGCAGAACTATTCAGGAA

TTACCTAAGGCAAATAAGGGAGGAACTAGTGGGAGATTATTAAGTGTTGCTTATC  
GACATAATGGAACCTCCTAACAAATGGTGGTTAGCATTGCGCAAGAGAAAGTTTATG  
AACATGGTTCTTCCTTCA

>protein sequence NtARPC3

MVYHSSFVDEEGISKACGCPDLLPLKSHIKGPAPVSEQDTTDIVDEAITFFRANVFFKNFD  
IKSSSDKLLIYLTLYINIALKRLEGCRITLAEGTKAIINLGLETVPVPGESGFPPGLFTA  
AQSKEAELFRNYLRQIREETSGRLLSVAYRHNGTPNKWWLAFKRKFMNMVLP

### **Sequence ARPC4**

>NtARPC4, 510 bp

ATGGCAAATCCATTGCGATTGTATTTAACATGCATAAGAAACACGCTCGAAGCAGC  
TATGTGTCTTCAGAATTTCCCATGCCAAGAAGTAGAGAGGCATAACAAACCAGAGG  
TTGAACTAAAGACAAGCCCAGAACTTCTTCTTAATCCTGTTTTGATTTGTCGAAATG  
AGGCTGAAAGGTGCTTGATTGAAACATCTATTAATTCCTTGCGCATAAGTCTAAAG  
GTGAAACAGTCAGATGAACTTGAAAATATACTAACAAAGAAGTTCCTTAGGTTTTTG  
TCTATGAGAGCAGAAGCGTTCAGGTGTTAAGGAGAAAGCCGGTTCAGGGCTACGA  
CATTAGTTTTCTCATTACAAATTATCATTGTGAAGAGATGCAGAAGCAAAGCTTAT  
TGATTTTCATAGTGAATTCATGGAGGACATCGATAAGGAGATCAGTGAAGTGAAGT  
ATCAGTGAACACCCGAGGGAGGCTTGTTGCTACTGA<sub>g</sub>TTTCTGAAGCAATTCATCT  
GA

>protein sequence NtARPC4

MANPLRLYLTCIRNTLEAAMCLQNFPQEVERHNKPEVELKTSPELLLNPNVLICRNEAE  
RCLIETSINSLRISLKVQSDLENILTKKFLRFLSMRAEAFQVLRKPVQGYDISFLITN  
YHCEEMQKQKLIDFIVQFMEDIDKEISELKLSVNTRGRLVATEFLKQFI

## **Sequence ARPC5**

>NtARPC5

ATGGCTGAGATTGTCGAAGCAGATAATTTTGAAGCCATAATCACCAGAATCGAACA  
CAAGTCCCAGCAAGATCGAAAGCTTACTCAAACAGTATAAACCAGTGGAAGCTCTGA  
AAACAGCTCTAGAAGGATCACCTCCCAAGACCAAAGATGAAAGATGCAAGTCTGCT  
AATTGGATAGTGGTGCATAGGGCTATAATGGCTATCAAAGATGTTGATAGCTTGTT  
CTCTGCTTTGGATCCTGAGTACTATGATATTCTCATGAAGTACTTGTACAGAGGTTT  
GTCTACTGGAGACCGCCCAACATGTGACCAATGCCTAAGGATTCATGAAAACTTA  
CAGAAAAAGCTGGTTTGGGTTGCATACTGCGTTGTCTTGCTGACACTGTGAATACT  
GTGTGA

>protein sequence NtARPC5

MAEIVEADNFEAIITRIEHKSRKIESLLKQYKPVEALKTALEGSPPKTKDERCKSANWIVV  
HRAIMAIKDVDSLFSALDPEYYDILMKYLYRGLSTGDRPTCDQCLRIHEKLTEKAGLGC  
LRCLADTVNTV

>GFP

ATGGGTAAAGGAGAAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTTGAATTAGAT  
GGTGATGTTAATGGGCACAAATTTTCTGTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAA  
CATACGGAAAACCTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAACCTACCTGTTCCCTT  
GGCCAACACTTGTCACTACTTTCTGTTATGGTGTACAATGCTTTTCAAGATACCCAG  
ATCATATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGAGCGCCATGCCTGAGGGATACGTACA  
GGAGAGGACCATCTTCTTCAAGGACGACGGGAACACTACAAGACACGTGCTGAAGTC  
AAGTTTGAGGGAGACACCCTCGTCAACAGGATCGAGCTTAAGGGAATCGATTTCAA  
GGAGGACGGAAACATCCTCGGCCACAAGTTGGAATCAAACTACAACCTCCCACAAC  
GTATACATCACTGCAGACAAACAAAAGAATGGAATCAAAGCTAACTTCAAATTAGA  
CACAACATTGAAGATGGAAGCGTTCAACTAGCAGACCATTATCAACAAAATACTCC  
AATTGGCGATGGCCCTGTCCTTTTACCAGACAACCATTACCTGTCCACACAATCTG  
CCCTTTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCCTTCTTGAGTTTGTA  
ACAGCTGCTGGGATTACACATGGCATGGATGAACTATACAAAAAG

>protein sequence GFP

MGKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLLKFICTTGKLPVWP  
TLVTTFCYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFE  
GDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYITADKQKNGIKANFKIRHNIEDGS  
VQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITHGM  
DELYKK

>mCherry

ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGGCCATCATCAAGGAGTTCATGCGCT  
TCAAGGTGCACATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCG  
AGGGCGAGGGCCGCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTGAAGGTGACC  
AAGGGTGGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTGTCCCCTCAGTTCATGTACG  
GCTCCAAGGCCTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGACTACTTGAAGCTGTC  
CTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGCGT  
GGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCGAGTTCATCTACAAGGTG  
AAGCTGCGCGGCACCAACTTCCCCTCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGACCA  
TGGGCTGGGAGGCCTCCTCCGAGCGGATGTACCCCGAGGACGGCGCCCTGAAG  
GGCGAGATCAAGCAGAGGCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACGACGCTGAG  
GTCAAGACCACCTACAAGGCCAAGAAGCCCGTGCAGCTGCCCGGCGCCTACAAC  
GTCAACATCAAGTTGGACATCACCTCCCACAACGAGGACTACACCATCGTGGAACA  
GTACGAACGCGCCGAGGGCCGCACTCCACCGGCGGCATGGACGAGCTGTACAA  
GTAG

>protein sequence mCherry

MVSKGEEDNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGG  
PLPFAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDYLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQ  
DSSLQDGEFIYKVKLRGTFNPSDGPVMQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGEIKQRLK  
LKDGGHYDAEVKTTYKAKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQYERAEGRHSTG  
GMDELYK