

**Univerzita Karlova**

**Přírodovědecká fakulta**

**Experimentální biologie rostlin**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Experimentální biologie rostlin



Kamila Fišerová

Vliv indukovaného umlčování podjednotek ARP2/3 komplexu na strukturu  
rostlinných buněk

The effect of induced silencing of ARP2/3 complex subunits on plant cell  
structure

Diplomová práce

Praha, 2017

Vedoucí práce: RNDr. Lukáš Fischer, Ph.D.  
Konzultantka: RNDr. Kateřina Schwarzerová, Ph.D.

**Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne: 11. 8. 2017

Podpis:

## **Poděkování**

Chtěla bych velmi poděkovat svému školiteli RNDr. Lukáši Fischerovi, Ph.D. za vedení celé práce, cenné rady, korektury textu a v neposlední řadě i za motivaci, která mi občas chyběla. Dále bych chtěla poděkovat své konzultantce RNDr. Kateřině Schwarzerové, Ph.D. za rady a výpomoc především v práci s proteiny. Velké díky patří také všem členům laboratoře 210, jmenovitě pak RNDr. Lence Sikorové, Ph.D. a Mgr. Vojtěchu Čermákovi za zaškolení do molekulárních metod, RNDr. Miroslavu Srbovi, Ph.D. za rady ohledně BY-2, všem z týmu pak za nesčetné rady, pomoc a za vytvoření příjemného pracovního prostředí. Z podobných důvodů bych také chtěla poděkovat ostatním členům Katedry experimentální biologie rostlin. Děkuji také své rodině, která mi umožnila studium, za podporu a trpělivost. Svým kamarádům a skvělým sestřenicím děkuji za podporu a rozveselení při psaní této práce.

## Abstrakt

Tato práce se věnuje ARP2/3 komplexu, *de novo* nukleátoru aktinového cytoskeletu. Tento vysoce konzervovaný komplex je složený ze sedmi podjednotek a reguluje větvení aktinových filament v konstantním úhlu 70°. ARP2/3 se prostřednictvím iniciace polymerace aktinu podílí na různých funkcích v buňkách rostlin a živočichů. Podílí se například na určení směru a rychlosti růstu buněk, pohybu vezikulů a organel v rámci buňky. Mutace jednotlivých podjednotek je pro živočišné buňky letální, v rostlinách však mají tyto mutanti jen mírné projevy jako je například poškození trichomů nebo změny tvaru pokožkových buněk. Cílem předložené práce bylo studium funkce ARP2/3 komplexu metodou částečného umlčení podjednotek pomocí RNA interference. Konkrétně se jednalo o podjednotku ARPC1 u *Arabidopsis thaliana* a podjednotku ARPC2 studovanou na buněčném modelu tabákové linie BY-2. Experimentální práce zahrnovala tvorbu DNA konstruktů navozujících umlčení, transformaci rostlinného materiálu, analýzy míry umlčení a sledování fenotypu u vybraných linií. Přestože byly nalezeny linie se sníženou hladinou transkriptu dané podjednotky ARP2/3 komplexu, nebyly u těchto linií nalezeny žádné fenotypové změny.

*Klíčová slova – aktin, ARP2/3 komplex, indukované umlčování*

## Abstract

This thesis is focused on the ARP2/3 complex, which is a *de novo* actin cytoskeleton nucleator. This highly conserved complex is composed of seven subunits and regulates branching of actin filaments at a constant angle of 70 degrees. In plant and animal cells ARP2/3 is involved in various processes, which are connected with the initiation of actin polymerization; for example it participates in determining the direction and speed of cell growth and the movement of vesicles and organelles within the cell. The mutation of individual subunits is lethal for animal cells, but in plants, these mutants have only mild symptoms such as distorted trichomes or changes in epidermal cells. The aim of the presented work was to study the function of the ARP2/3 complex by the method of partial silencing of subunits using RNA interference. Specifically, it was the ARPC1 subunit of *Arabidopsis thaliana* and the ARPC2 subunit studied on the cellular model, the tobacco BY-2 cell line. Experimental work involved the creation of DNA constructs for induction of silencing, transformation of plant material, silencing rate analysis, and phenotype tracking in selected lines. Although lines with reduced transcript levels of the given ARP2/3 complex subunit were found, no phenotypic changes were observed in these lines.

*Key words - actin, ARP2/3 complex, induced silencing*

# Obsah

Abstrakt.....	4
Abstract.....	5
Obsah .....	6
Seznam použitých zkratek.....	9
1. Úvod.....	10
1.1. Cíle.....	11
2. Přehled literatury.....	12
2.1. Aktinový cytoskelet.....	12
2.1.1. Funkce aktinového cytoskeletu a jeho využití v buňce.....	12
2.1.2. Regulace polymerace aktinu.....	13
2.2. ARP 2/3 komplex – struktura a nukleace aktinu.....	16
2.2.1. Regulace a funkce ARP2/3 komplexu u živočichů a kvasinek.....	17
2.2.2. Regulace a funkce ARP2/3 komplexu u rostlin.....	20
2.2.3. Popis mutantů v genech pro podjednotky ARP2/3 komplexu u rostlin.....	22
2.2.3.1. ARP2.....	22
2.2.3.2. ARP3.....	22
2.2.3.3. ARPC1.....	23
2.2.3.4. ARPC2.....	24
2.2.3.5. ARPC3.....	24
2.2.3.6. ARPC4.....	25
2.2.3.7. ARPC5.....	25
3. Materiál a metodika.....	26
3.1. Biologický materiál a jeho kultivace.....	26
3.1.1. <i>E.coli</i> .....	26
3.1.2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101 (pMP90) / C58C1 > RifR (pMP90) GV2260.....	26
3.1.3. <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	27
3.1.4. <i>Nicotiana tabacum</i> – buněčná linie BY-2.....	28
3.2. Plazmidy použité při klonování.....	30
3.2.1. Plazmid – pDrive.....	30
3.2.2. Plazmid - pER8.....	31
3.3. Seznam použitých antibiotik.....	32

3.4.	Transformace bakterií a rostlinného materiálu .....	32
3.4.1.	Příprava elektrokompetentních bakterií <i>E.coli</i> .....	32
3.4.2.	Příprava elektrokompetentních bakterií <i>A.tumefaciens</i> .....	33
3.4.3.	Transformace <i>A. tumefaciens</i> a <i>E. coli</i> .....	34
3.4.4.	Transformace <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	34
3.4.5.	Transformace BY-2 .....	35
3.5.	Práce s DNA .....	37
3.5.1.	Izolace plazmidové DNA z <i>E. coli</i> .....	37
3.5.2.	Izolace DNA z agarózového gelu.....	37
3.5.3.	Ligace .....	38
3.5.4.	PCR (Polymerase chain reaction).....	38
3.5.5.	Použité primery .....	39
3.5.6.	Restrikční štěpení .....	40
3.5.7.	Agarózová gelová elektroforéza (DNA) .....	41
3.6.	Práce s RNA.....	41
3.6.1.	Izolace RNA.....	41
3.6.2.	Agarózová gelová elektroforéza (RNA).....	43
3.7.	Práce s proteiny .....	44
3.7.1.	Izolace proteinů z BY-2 .....	44
3.7.2.	Proteinová elektroforéza.....	45
3.7.3.	Western blot.....	46
3.7.4.	Imunodetekce.....	46
3.7.5.	Chemiluminiscentní detekce (ECL Systém) .....	47
4.	Výsledky.....	48
4.1.	Studium snížení exprese ARPC1 podjednotky u <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	48
4.1.1.	Tvorba umlčujícího konstruktů IR-C1 .....	48
4.1.2.	Transformace a selekce .....	50
4.1.3.	Analýza exprese transkriptu ARPC1 .....	52
4.2.	Výsledky BY-2 .....	54
4.2.1.	Tvorba umlčujícího konstruktů IR-C2 .....	54
4.2.2.	Transformace a selekce .....	54
4.2.3.	Analýza míry umlčení.....	54
4.2.3.1.	Linie se značenými vakuolami .....	55

4.2.3.2. Linie se značeným fimbrinem .....	58
4.2.3.3. Linie se značeným Golgiho komplexem .....	61
4.2.3.4. WT linie .....	64
4.2.4. Sledování fenotypu ARPC2A – mikroskopie vybraných linií.....	67
4.2.5. Stanovení proteinu ARPC2A – imunolokalizace na Western blotu.....	68
5. Diskuse .....	70
5.1. Indukované umlčování a jeho využití.....	70
5.2. Studium snížení exprese ARPC1 podjednotky u <i>Arabidopsis thaliana</i> . .....	71
5.3. Studium snížení exprese ARPC2A podjednotky u buněčné linie BY-2. ....	73
5.3.1. Linie se značenými vakuolami.....	74
5.3.2. Linie se značeným fimbrinem .....	74
5.3.3. Analýza hladiny proteinu ARPC2 vybraných linií.....	75
6. Závěr.....	76
7. Seznam použité literatury .....	77



## Seznam použitých zkratek

ABI - abl-interactor

ABIL - ABI-like

ADF - actin depolymerizing factor

ARP2/3 - actin related protein 2/3

ARPC1-5 - actin related protein component1-5

AIP1 – actin-interacting protein 1

APC - adenomatous polyposis coli

BRICK1- bub1-related kinase1

CAP1 - cyclase associated actin cytoskeleton regulatory protein 1

Cas9 - CRISPR-associated

CRISPR - clustered regularly interspaced short palindromic repeat

GFP – green fluorescent protein

EB – extrakční pufr

EST – estradiol

GEF - guanin exchange factor

GMF - glia maturation factor

HSPC300 - haematopoietic stem progenitor cell 300

JMY - junction mediating and regulatory protein

NAPP - nck-associated protein

PICK1 - protein interacting with C kinase 1

PIRP - p53-inducible mRNA protein

SCAR - suppressor of cAMP receptor

SHD – SCAR homology domain

Sra1- steroid receptor RNA aktivátor

Rac - Ras-related C botulinum toxin substrate

Rho - Ras homology

Rop - Rho proteins of plants

WASP - Wiskott–Aldrich syndrome protein

WH2 doména - WASP homology domain-2

WT – wild type

## 1. Úvod

Aktinový cytoskelet zajišťuje vnitřní (u živočichů i vnější) dynamiku buněk – reguluje růst a poskytuje lešení pro pohyb organel a vezikul uvnitř buňky. Aktin je jedním z nejhojnějších proteinů s vysokým stupněm konzervovanosti (Dominguez a Holmes, 2011). Studium regulace uspořádání aktinového cytoskeletu je předmětem výzkumu mnoha vědeckých týmů. Větší pozornost je mu věnována u živočišných buněk v souvislosti s jejich migrací a jeho rolí v nádorovém bujení a tvorbě metastáz (Lauffenburger et al., 1996). Jedním z hlavních regulátorů aktinového cytoskeletu, je ARP2/3 komplex. Tento komplex indukuje *de novo* polymeraci aktinu na existujícím mikrofilamentu, od něhož se odvětluje v konstantním úhlu 70°. ARP2/3 komplex se skládá ze sedmi podjednotek, dvou největších - ARP2 a ARP3, které jsou strukturně podobné aktinu, a pěti malých podjednotek ARPC1-5 očíslovaných podle velikosti (Robinson et al., 2001). Ztráta tohoto komplexu, respektive jeho jednotlivých podjednotek, je pro živočišné buňky letální, zatímco u rostlin se mutace v jednotlivých podjednotkách projevuje relativně mírným fenotypem (Goley a Welch, 2006). Mutanti mají typicky zkroucené trichomy, u některých je narušeno vytváření laločnatých pokožkových buněk, fúze vakuol nebo otvírání průduchů. Rostlinný ARP2/3 komplex je studován převážně na modelové rostlině *Arabidopsis thaliana* (Mathur et al., 2003a; Li et al., 2013). Tato diplomová práce se věnuje dvěma podjednotkám tohoto komplexu – ARPC1 a ARPC2 - u dvou rostlinných modelů. ARPC1 podjednotka studovaná u *Arabidopsis thaliana* byla vybrána proto, že je zatím jediným chybějícím mutantem v podjednotkách ARP2/3 komplexu u této modelové rostliny. Důvodem je to, že se ARPC1 vyskytuje ve dvou paralozích v silné genové vazbě, což brání snadnému vytvoření/nalezení dvojitého mutanta. Možností, jak tento problém obejít, je fenotypový screening F2 generace kříženců jednoduchých mutantů na základě předpokládaného poškození trichomů nebo knock-down obou téměř identických ARPC1 genů pomocí RNAi, čemuž se věnuji v této práci. Druhou vybranou podjednotkou je ARPC2, která je studována na modelu tabákové buněčné linie BY-2. Důvodem k výběru uvedeného modelu je fakt, že zatím není dostupný cytologický model pro studium tohoto komplexu. ARPC2 podjednotka byla vybrána proto, že se spolu s ARPC4 podílí na stabilizaci celého komplexu. Předpokládá se tedy, že sestavení komplexu bez této podjednotky je nemožné, navíc je k dispozici protilátka, kterou lze tabákový protein detekovat. U BY-2 linie nejsou dostupní mutanti, tudíž byla použita opět metoda umlčení genu pomocí RNAi. Konstrukty pro umlčení uvedených ARP2/3 genů byly transformovány

nejen do WT linií, ale i do linií s již vloženými markerovými konstrukty pro značení buněčných komponent pomocí fluorescenčních proteinů (GFP, mCherry) za účelem snazší detekce předpokládaných fenotypových změn v důsledku navozeného umlčení.

### 1.1. Cíle

Cílem této diplomové práce je studium úlohy ARP2/3 komplexu u rostlin, přesněji sledování vlivu náhlého snížení exprese podjednotek ARP2/3 komplexu na rostlinné buňky.

Dílčí cíle práce:

1. Studium snížení exprese ARPC1 podjednotky u *Arabidopsis thaliana*.
2. Studium snížení exprese ARPC2A podjednotky u tabákové buněčné linie BY-2.

## 2. Přehled literatury

### 2.1. Aktinový cytoskelet

Aktin je jeden z nejrozšířenějších proteinů vůbec (velikost okolo 42 kDa) a je vysoce konzervován napříč organismy. Aktinový cytoskelet tvoří uvnitř buněk velice dynamickou síť. Vyskytuje se ve dvou formách: G-aktin (aktinové monomery) a F-aktin (aktinová filamenta), přeměny mezi těmito formami jsou závislé na ATP, které je nutné při přechodu G-aktinu na F-aktin při polymeraci vlákna. Tyto přeměny, které jsou důležité pro dynamiku aktinu, jsou zajištěny regulátory aktinu (viz kapitola 2.1.2.). Ve filamentech je aktin uspořádán do volné pravotočivé šroubovice. Aktinová filamenta jsou polarizovaná, na plus konci polymerují a na nestabilním minus konci depolymerují (Staiger a Blanchoin, 2006; Pollard and Borisy, 2003)

#### 2.1.1. *Funkce aktinového cytoskeletu a jeho využití v buňce*

Funkce aktinu jsou rozmanité – účastní se při dělení buněk, růstu a polarizaci buněk, při organizaci vezikulárního transportu nebo transportu organel (Dominguez a Holmes, 2011).

U rostlin je aktin velmi důležitý právě při polarizovaném růstu, který se uplatňuje při růstu pylové láčky (Vidali et al., 2001) a kořenových vlásků (Baluška et al., 2000). Pro rostliny je také důležitý pohyb organel, jako jsou chloroplasty v závislosti na ozáření, i to zajišťuje aktinový cytoskelet (Kandasamy et al., 1999). Dále se aktin účastní ochrany povrchu rostlin, jelikož se účastní při vývoji trichomů (Szymanski, 2005).

Živočišné buňky používají aktin navíc při pohybu svalů – svalové kontrakci za spotřeby ATP aktinomyozinovým komplexem (Rayment et al., 1993). Pro vývoj živočichů je také nutná migrace buněk, na rozdíl od rostlin, kde při ontogenezi k migraci buněk nedochází. Migrace živočišných buněk je důležitá už při embryonálním vývoji, pohybu fibroblastů (vazivové buňky) nebo při imunitní odpovědi (Lauffenburger a Horwitz, 1993). Schopnost migrace mají i nádorové buňky, z tohoto důvodu je tento fenomén u živočichů intenzivně studován. Například podle práce Rauhala et al., 2013, kdy umlčením podjednotky ARPC4 komplexu ARP2/3, jednoho z hlavních nukleátorů aktinu, vedlo k narušení migrace buněk u rakoviny slinivky.

Dynamiku aktinu, nezbytnou k jeho správné funkci, narušuje řada cytoskeletárních drog jako je například faloidin, latrunculin a cytochalasin. Faloidin je alkaloid, obsažený u některých druhů muchomůrek, stabilizuje aktinová filamenta v F-formě a brání jejich depolymerizaci (Cooper, 1987). Cytochalasin blokuje polymeraci a prodlužování aktinových filament, váže se

na plus konec aktinového vlákna (Cooper, 1987). Podobný efekt má i latrunculin, který váže aktinové monomery, a tím rovněž brání polymeraci (Yarmola et al., 2000). Narušení cytoskeletu pomocí těchto toxinů se využívá při studiu jeho funkce.

### 2.1.2. Regulace polymerace aktinu

Regulaci polymerace aktinu zajišťuje celá řada proteinů, u *de novo* polymerace mikrofilament to jsou ARP2/3 komplex a forminy (Staiger a Blancholin, 2006). Nukleace pomocí ARP2/3 komplexu je detailněji popsána níže v kapitole 2.2., forminy tvoří skupinu proteinů, které indukují nevětvený růstu aktinu (Blancholin a Staiger, 2010). Obsahují specifickou FH2 doménu spolu s prolinem bohatou FH1 doménou. Na základě této specifikace bylo u modelové *Arabidopsis thaliana* nalezeno 21 forminových isoform (Cvrčková et al., 2004). Některé forminy obsahují i FH3 doménu, která ale není specifická pro všechny isoformy (Nielsen et al., 1998).

U živočichů jsou aktinový cytoskelet a jeho regulátory prozkoumány mnohem více než u rostlin, přesto jsou spíše prostudovány individuální dráhy jednotlivých regulátorů a není často známo, jak různé regulátory působí mezi sebou. Příkladem studie, které se věnují spolupůsobení regulátorů je ovlivnění forminů ARP2/3 komplexem a naopak provedené na kvasinkách (Burke et al., 2014). Pokles ARP2/3 (v této práci způsobený inhibitorem CK-666) má za následek zvýšení koncentrace G-aktinu, která je nutná pro polymeraci *de novo* řízenou forminy. Naopak je to podobně, při snížení hladiny forminu (mutanti *cdc 12-112* a *for3*) docházelo ke zvýšení hladiny ARP2/3 komplexu (Burke et al., 2014).

V živočišné říši byly popsány i další proteiny jako Spire, Leiomodín, Cordon Bleu, APC (adenomatous polyposis coli) nebo JMY (junction mediating and regulatory protein), všechny obsahují specifickou WH2 doménu (WASP homology domain-2; Firat-Karalar a Welch, 2011). WH2 je doména s velikostí okolo 35 AK obsahující motiv L++V/T (L-leucin, +-bazická AK, V-valin, T-threonin), tato doména je schopná vázat aktinové monomery. Ukázalo se, že je tato doména přítomna u mnoha regulátorů aktinu (Paunola et al., 2002). Protein Spire obsahuje čtyři WH2 domény, které váží čtyři aktinové monomery. Funkce Spire je komplexní, dokáže nukleovat, oddělit a chránit aktinová filamenta. Zpomaluje depolymeraci na minus konci vlákna. U živočichů je spolu s forminy a profilinem důležitý při určení polarizace oocytů (Bosch et al., 2007). Leiomodín taktéž obsahuje WH2 doménu, nukleuje aktinová filamenta ve svalech (Chereau et al., 2008). Vyskytuje se v několika isoformách, jako Lmod-1, Lmod-2 a Lmod-3. Lmod-1, který se vyskytuje v hladkých svalech, má vysokou podobnost s Lmod-3, vyskytující se u embryí.

Isoforma Lmod-2 je přítomna u embrya, srdeční svaloviny a příčně pruhované svaloviny (Conley et al., 2001). Cordon Bleu je dalším z regulátorů aktinu, který se vyskytuje u obratlovců. Má tři WH2 domény, které váže tři aktinové monomery, indukuje polymeraci aktinu už při nanomolárních koncentracích. Nejvyšší exprese Cordon Bleu byla pozorována v mozku u myši, v ostatních tkáních je exprese zanedbatelná (Ahuja et al., 2007). APC patří mezi tumor supresivní proteiny, reguluje prodlužování buněk a buněčnou migraci. Je lokalizován jak na aktinu, tak na plus konci mikrotubulových vláken. APC spolupracuje s jedním z izoformů forminu (mDia) a váže aktinové monomery (Okada et al., 2010). JMY, protein specifický pro obratlovce, aktivuje ARP2/3 komplex (vazba přes tryptofanový zbytek) a využívá svou WH2 doménu k nukleaci aktinového filamenta. JMY se podílí na pohyblivosti buněk obratlovců (Zuchero et al., 2009).

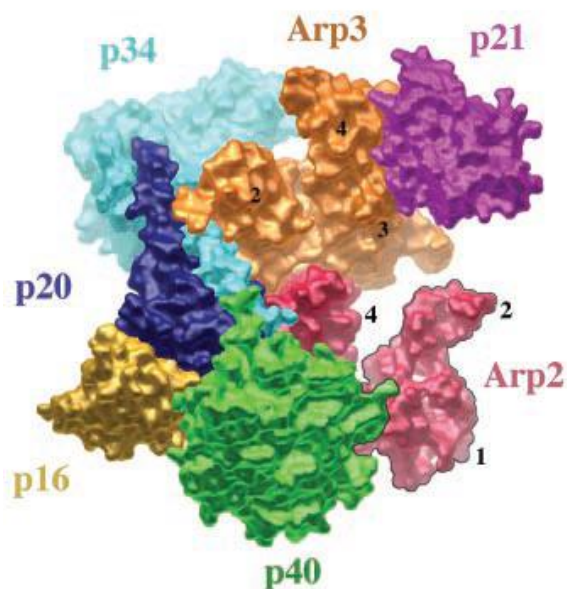
Další regulátory aktinu byly nalezeny i u rostlin, jsou to - profilin, ADF (actin depolymerizing factor), CAP1 (cyclase associated actin cytoskeleton regulatory protein 1), AIP1 (actin-interacting protein 1) a villin (Hussey et al., 2006). Profiliny jsou nízkomolekulární proteiny vázající aktin, u vyšších rostlin byla jejich funkce prokázána v práci Valenta et al., 1993, u živočichů a kvasinek je jejich funkce známa déle (Carlsson et al., 1977). Profilin váže aktinové monomery, přednostně ATP G-aktin a spolupracuje s dalšími regulátory, jako jsou forminy a WASP, polymerace je díky profilinu mnohem rychlejší (Romero et al., 2004). U *Arabidopsis thaliana* způsobuje snížení hladiny profilinu menší vzrůst a dřívější kvetení (až o dvanáct dnů) s nižším počtem listů. Počet semen je přibližně stejný jako u WT a semena nevykazují viditelné fenotypové odchylky. Rostliny bez profilinu mají menší buňky hypokotylu a kořene, naopak je tomu při zvýšené expresi (Ramachandran et al., 2000). ADF/cofilin se váže na F-aktin a spouští fragmentaci aktinových vláken (McGough et al., 1997). Váže i G aktin, preferenčně neaktivní formu s navázaným ADP. Brání tak výměně ADP za ATP a tím aktivaci polymerace (Nishida, 1985). CAP1 váže ADF a je také nezbytný pro jeho správnou funkci. CAP depolymerizuje aktinová filamenta a recykluje aktinové monomery, stimuluje přeměny ADP za ATP na G-aktinu (Moriyama a Yahara, 2002). U živočichů se vyskytují dvě isoformy CAP, CAP1 v nesvalových buňkách a CAP2 v příčně pruhované svalovině. CAP1 je v živočišných buňkách důležitý pro migraci buněk, endocytózu a morfologii celé buňky (Bertling et al., 2004). Mutanti *cap1* u *Arabidopsis thaliana* vykazují sníženou klíčivost semen, pomalejší polární růst kořenových vlásků a pylové láčky. Dále nepřítomnost CAP1 způsobuje morfologické změny při prodlužování epidermálních buněk na stonku a lehké

poškození trichomů (ve srovnání s *arp* mutanty). V buňkách mutantních rostlin se ve velkém množství hromadí F-aktin (Deeks et al., 2007).

Homolog kvasinkového proteinu AIP1 byl nalezen i u rostlin. Funguje stejně jako u živočichů, tedy za přítomnosti ADF/cofilinu depolymerizuje aktinová filamenta. V rostlinách se vyskytuje nejvíce v pylových zrnech stejně jako ADF a ovlivňuje zřejmě růst pylové láčky (Allwood et al., 2002). U mechu *Physcomitrella patens*, kde se gen *AIP1* vyskytuje pouze v jedné kopii, byli pozorováni mutanti v tomto genu. AIP1 je v buňkách mechu důležitý pro polarizovaný růst kaulonemat. Dále bylo zjištěno, že mutanti jsou schopni života, ADF zřejmě dokáže částečně nahradit funkci AIP1. V buňkách se ale více hromadily svazky aktinových filament, byla narušena rovnováha mezi polymerací a depolymerací aktinu (Augustine et al., 2011). Villin zajišťuje svazkování aktinových filament, nukleaci na filamentu nebo ochranu plus konce filamenta, dokáže i oddělit aktinová filamenta. Všechny tyto funkce jsou indukovány v závislosti na koncentraci  $Ca^{2+}$  iontů (Northrop et al., 1986). Zastavení exprese villinu u *Arabidopsis* způsobuje zpomalený růst kořenových vlásků a pylové láčky. Zpomaluje se i proudění cytoplasmy (Zhang et al., 2011).

Jako motorové proteiny aktinového cytoskeletu fungují jak u rostlin, tak u živočichů myosiny. V genomu *Arabidopsis thaliana* je obsaženo sedmnáct genů pro myosiny, které se zřejmě liší od živočišných. Myosiny jsou vysoce konzervované, jsou rozděleny do dvou skupin – VIII a XI myosiny (Reddy a Day, 2001). U mutanta v myosinu XI u *Arabidopsis* byla pozorována sterilita semen, zakrslý růst i defekt v růstu buněk. To vše je zapříčiněno narušením vezikulárního a potažmo i auxinového transportu (Holweg a Nick, 2004). Myosin se totiž zřejmě podílí na váčkovém transportu PIN přenašečů auxinu, které jsou v rostlinných buňkách polarizovaně distribuovány (Ueda et al., 2011).

## 2.2. ARP 2/3 komplex – struktura a nukleace aktinu



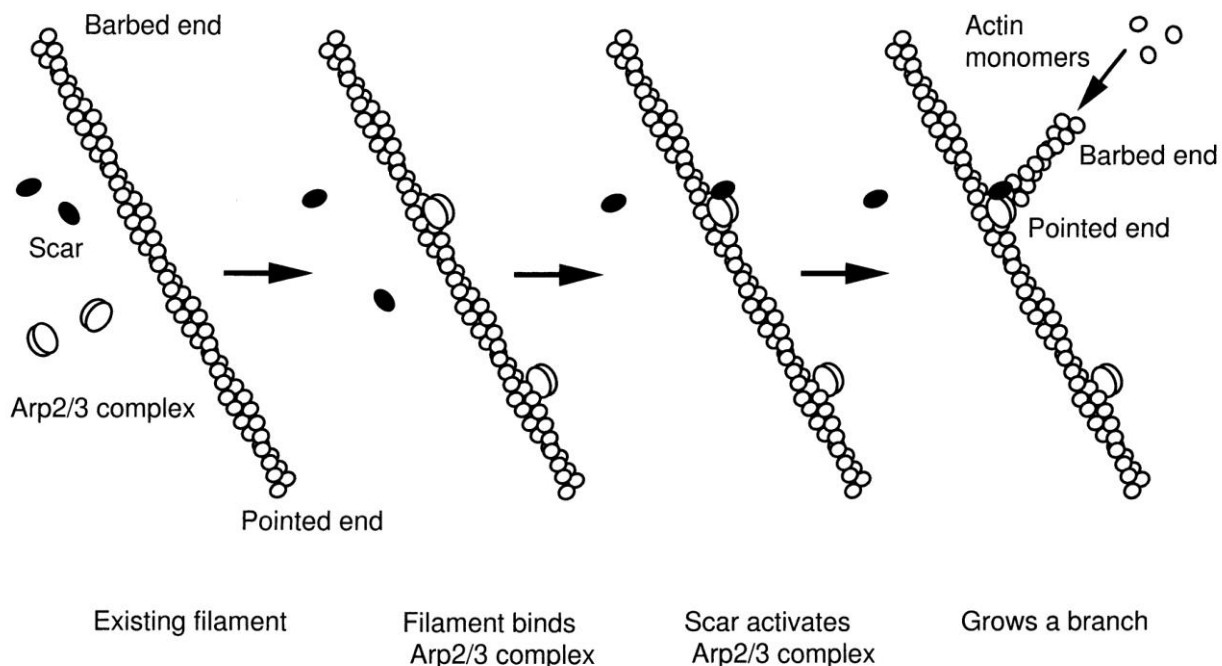
Jde o vysoce konzervovaný komplex napříč organismy, který sestává ze sedmi podjednotek. Skládá se ze dvou velkých - ARP2 a ARP3 a pěti malých podjednotek C1-C5 (Obr. 1). Malé podjednotky jsou v některých pracích označovány i podle své molekulové hmotnosti – p40 (pro ARPC1), p34 (ARPC2), p21 (ARPC3), p20 (ARPC4) a p16 (ARPC5). ARP 2/3 komplex byl objeven v práci od Machesky et al., 1994. Celkově má komplex molekulovou hmotnost okolo 220 kDa.

*Obr. 1 Struktura Arp2/3 komplexu se sedmi podjednotkami. Čísla u ARP2 a ARP3 podjednotek značí subdomény s homologií k aktinu. Komplex byl v této práci izolován z *Bos taurus* (dle Robinson et al., 2001)*

U živočichů i kvasinek je úplné vyřazení tohoto komplexu z funkce neslučitelné se životem, rostliny jsou ale mnohem flexibilnější a ztrátu tohoto komplexu umí kompenzovat zatím neznámými mechanismy (např. možná zastupitelnost forminy). Jak již bylo zmíněno výše, ARP2/3 je jedním z hlavních regulátorů aktinového cytoskeletu. Indukuje *de novo* nukleaci filament a jejich větvení v konstantním úhlu 70° (Goley a Welch, 2006; schéma nukleace viz Obr. 2).

ARP2 a ARP3 podjednotky jsou strukturně tolik podobné aktinu, že mohou vytvořit dimer podobný, jako tvoří dva G-aktiny a slouží pak jako počátek pro polymeraci mikrofilamenta. S aktinem mají společné i to, že váží ATP, které dodává energii nutnou pro polymeraci. ARP2 je také schopný vázat další nukleátor aktinu – profilin, díky tomu je nukleace rychlejší (Kelleher et al., 1995). Pro aktivaci ARP2/3 a počátek polymerační aktivity komplexu jsou důležité aktivátory tohoto komplexu, které jsou zmíněny v kapitolách 2.2.1. a 2.2.2..





Obr. 2 Schéma nukleace pomocí ARP2/3 komplexu, na tomto obrázku je znázorněn jeden z aktivátorů z rodiny WAVE – protein SCAR (dle Machesky et al., 1999).

V práci od Hetrick et al., 2013 byly objeveny dvě molekuly - CK-666 a CK-869, které inhibují ARP2/3 komplex. Těchto inhibitorů se dá využít při studiu funkce tohoto komplexu, což je výhodné hlavně u živočišných buněk a kvasinek *in vivo*, kde není z důvodů letality možné vytvoření mutantů. Bylo zde objasněno, i jak tyto molekuly fungují, způsobují blokaci počátku polymerace aktinového filamenta. CK-666 stabilizuje inaktivní formu komplexu, blokuje pohyb dvou největších podjednotek, tak aby nevytvořili iniciační místo pro aktivaci polymerace. CK - 869 se váže na ARP3 a znemožňuje jeho propojení s ARP2, nedochází tak k vytvoření počátečního místa pro začátek polymerace aktinového filamenta.

### 2.2.1. Regulace a funkce ARP2/3 komplexu u živočichů a kvasinek

Jak již bylo zmíněno výše je vyřazení jednotlivých podjednotek tohoto komplexu u živočichů a kvasinek letální, což komplikuje studium funkce ARP2/3 komplexu. Nabízí se tedy možnost studia na *in vitro* buňkách a využití RNAi umlčení genů. Využití RNAi je u živočišných buněk málo používané kvůli nespecifickému umlčení (potvrzeno např. v práci Caplen et al., 2000), na rozdíl od rostlin, kde malé RNA rozeznávají daný gen s vyšší specifitou. Po objevu inhibujících molekul CK - 666 a CK - 869 byl usnadněn výzkum ARP2/3 komplexu i na *in vivo* buňkách. Obecně funkce ARP2/3 komplexu souvisí s nukleací aktinového cytoskeletu jako je například migrace buněk,

chemotaxe, fagocytóza a endocytóza. Dá se tedy říci, že ARP2/3 se podílí na růstu buněk a jejich organizaci v rámci těla. V rámci buněk se podílí na pohybu váčků a organel, pro které je nezbytný pohyb po aktinových filamentech (Goley a Welch, 2006). V několika následujících větách se budu dále věnovat některým nejnověji objeveným funkcím, které zajišťuje ARP2/3 komplex u živočichů.

ARP2/3 byl studován u radiálních glií, což jsou buňky objevující se při vývoji mozku, které fungují jako kmenové buňky i jako vodící skelet pro migraci nervových buněk. ARP2/3 v těchto buňkách zajišťuje polaritu a morfogenezi. Výzkum byl prováděn díky indukované Cre-lox rekombinaci, která zkrátila gen pro ARPC2 podjednotku u myši při embryogenezi, kdy byl sledován vývoj mozkové kůry (Wang et al., 2016a). Další funkce byla prokázána při vývoji krevních elementů. V lidském genomu se podjednotka ARPC1 vyskytuje ve dvou isoformách, ARPC1A/B, B isoforma je exprimovaná hlavně v krvi. Byla zkoumána ztráta ARPC1B isoformy, která měla za následek poruchy v tvorbě krevních destiček. Při ztrátě této isoformy sice docházelo ke kompenzaci zvýšenou expresí ARPC1A, přesto docházelo k porušení tvorby trombocytů, což naznačuje, že tyto dvě isoformy nejsou plně funkčně zastupitelné (Kahr et al., 2017). Další zajímavá funkce byla zjištěna při pokusech na laboratorních krysách a formování paměti za stresových podmínek. Exprese ARP2/3 komplexu byla zjištěna v amygdale, části mozku, která se podílí na paměti poznatků získaných za emočního vypětí. Bylo zjištěno, že se ARP2/3 komplex podílí na vytváření dlouhodobé paměti, ne však krátkodobé. Tyto pokusy byly provedeny díky využití inhibitoru ARP2/3 molekuly CK-666 (Basu et al., 2016).

Na aktivaci ARP2/3 komplexu u živočichů se podílí hned několik proteinů a proteinových komplexů – WASP (Wiskott–Aldrich syndrome protein), N-WASP, SCAR/WAVE (suppressor of cAMP receptor), WASH a cortaktin (Derivery a Gautreau 2010; Weaver et al., 2001). WASP byl poprvé izolován jako gen, který je poškozený při Wiskott-Aldrichově syndromu, odtud dostal WASP i svoje jméno (Derry et al., 1994). Později bylo prokázáno na lidských buňkách *in vitro*, že WASP aktivuje ARP2/3 komplex (Yarar et al., 1999). Obsahuje VCA (Verprolin homology central acidic) doménu, která je přes ARPC1 podjednotku vázána k ARP2/3 komplexu (Pan et al., 2004). Dalším regulátorem je N-WASP, který se vyskytuje především v mozku, odtud i název neural Wiskott–Aldrich Syndrome Protein. Nejprve bylo zjištěno, že reguluje aktin (Fukuoka et al., 1997), v další studii bylo prokázáno, že aktivuje ARP2/3 komplex tak, že používá svůj C-konec na navázání k ARP2/3 (Rohatgi et al., 1999). SCAR/WAVE, který se objevuje i u rostlin, byl poprvé

objeven u *Dictyostelia* jako protein příbuzný WASP, kdy se u buněk bez tohoto proteinu vyskytovalo málo F-aktinu (Bear et al., 1998). SCAR/WAVE je funkční jako komplex spolu s dalšími čtyřmi podjednotkami, které dodávají komplexu stabilitu. Jeho aktivátorem jsou malé GTPázy z rodiny Rho (Ras homology), u živočichů jsou to Rac GTPázy (Ras-related C botulinum toxin substrate; Ibarra et al., 2005). Vzhledem k tomu, že jde o jediný zatím známý aktivátor ARP2/3 komplexu u rostlin je o něm zmíněno více v kapitole 2.2.2.. Posledním z regulátorů z rodiny WASP je WASH komplex, který je podobný WASP a SCAR. WASH se vyskytuje na nejzazším konci chromosomu v subtelomerické oblasti v mnoha kopiích. Ztráta jeho funkce je letální u zygoty, což bylo prokázáno u octomilky (*Drosophila*). Aktivace ARP2/3 komplexu probíhá přes VCA doménu (Linardopoulou et al., 2007). Dalším aktivátorem je cortaktin, který je slabším aktivátorem v porovnání s N-WASP. Tento protein nepatří jako jediný z aktivátorů do rodiny WASP. Jeho funkcí je jednak přímá aktivace ARP2/3 a dále stabilizace nově vytvořených větvičích míst na filamentu (Weaver et al., 2001).

U kvasinek byl objeven další regulátor z rodiny WASP – Bee1p, který s ARP2/3 komplexem interaguje přes podjednotky ARPC4 a ARPC5. Jeho vyřazením ale nedocházelo k výraznému poškození polymerační aktivity ARP2/3, což naznačuje, že není jediným kvasinkovým aktivátorem (Winter et al., 1999). Další regulátor u kvasinek byl objeven v práci od Duncan et al., 2001, kde bylo zjištěno, že Pan1p je aktivátorem ARP2/3 komplexu. Pan1p se spolu s ARP2/3 podílí na endocytóze.

Kromě aktivátorů ARP2/3 komplexu byly nalezeny i jeho negativní regulátory – GMF (glia maturation factor), coronin, gadkin, PICK1 (protein interacting with C kinase 1) a arpin. GMF byl nalezen jako homolog ADF/cofilinu, se kterým spolupracuje při depolymeraci větvených filament. Dokáže i bránit nukleaci nového vlákna (Gandhi et al., 2010). Později bylo zjištěno, že se GMF váže přímo na ARP2/3 komplex přes ARP2 a ARPC1 podjednotku (Luan a Nolen, 2013). Coronin je antagonistou ke cofilinu, na rozdíl od něj tedy inhibuje aktivitu ARP2/3 a destabilizuje aktinová vlákna (Cai et al., 2008). Gadkin je dalším z inhibitorů ARP2/3, bylo zjištěno, že u buněk bez gadkinu je zvýšená migrace buněk a tím jejich rozšiřování po těle, které je umožněno díky nekontrolovanému ARP2/3. Gadkin se k ARP2/3 váže přes acidický motiv obsahující tryptofan (Maritzen et al., 2012). PICK1 inhibuje ARP2/3 a jeho funkci při transportu vezikulů a při vývoji neuronové sítě. Váže se na F-aktin i ARP2/3 komplex opět přes acidickou oblast s tryptofanovým zbytkem. Negativně reguluje tento komplex tak, že inhibuje VCA aktivační doménu, přímá

interakce s touto doménou ale zjištěna nebyla (Rocca et al., 2008). Arpin je pod kontrolou Rac GTPáz stejně jako ARP2/3 a inhibuje migraci buněk. K ARP2/3 se arpin váže svým acidickým C-koncem (Dang et al., 2013).

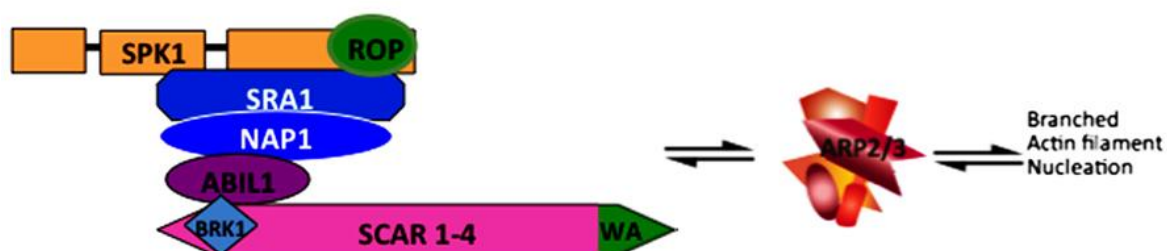
### 2.2.2. Regulace a funkce ARP2/3 komplexu u rostlin

Pro rostlinné buňky, které nejsou schopné migrace, je důležitý orientovaný růst, který zajišťuje ARP2/3 komplex díky dynamické polymeraci aktinového cytoskeletu. Přesto není ztráta tohoto komplexu pro rostliny letální, jak je tomu u živočichů, to je způsobeno jednak jejich flexibilitou vůči poškození a jednak možnou zastupitelností jinými *de novo* nukleátory jako jsou forminy (Goley a Welch, 2006). U rostlin se dále podílí na vývoji trichomů nebo na regulaci otvírání a zavírání průduchů (Hülkamp et al., 1994; Jiang et al., 2012). Rovněž migrace spermatického jádra během oplození je aktin dependentní (na mikrotubulech nezávislé) a ukázalo se, že regulace této migrace je řízena signální kaskádou ARP2/3 a WASP (u tabáku a kukuřice). Myozinové motory se při této migraci neúčastí (Peng et al., 2017). Další funkce jsou zmíněny dále v kapitolách u jednotlivých podjednotek ARP2/3 komplexu.

SCAR/WAVE komplex je zatím jediným známým aktivátorem ARP2/3 komplexu u všech rostlin. SCAR/WAVE funguje v komplexu díky dalším stabilizujícím podjednotkám - BRICK1/HSP300 (Bub1-related kinase1/haematopoietic stem progenitor cell300), NAPP (nck-associated protein), ABI (Abl-interactor), Sra1/PIRP (steroid receptor RNA aktivator/p53-inducible mRNA protein; viz Obr. 3). Je aktivovaný pomocí Rop GTPáz (Rho proteins of plants), které patří do skupiny Rho GTPáz (Yanagisawa et al., 2013).

SCAR/WAVE, který je v *Arabidopsis* zastoupen čtyřmi geny (SCAR1-4), je hlavní podjednotkou tohoto komplexu a obsahuje SHD (SCAR homology domain). Mutanti ve SCAR2 mají poškozené trichomy. S ARP2/3 komplexem je SCAR2 propojen přes podjednotku ARPC3 (Brembu et al., 2004; Basu et al., 2005). HSP300/BRICK1 je jednou z podjednotek, která stabilizuje celý komplex, homologem savčího HSP300 je u rostlin BRICK1. Konkrétně BRICK1 stabilizuje SCAR2 aktivátor ARP2/3 komplexu přes jeho SHD doménu (Le et al., 2006). Mutant *brk1* patří do skupiny tzv. „distorted“ mutantů, kteří mají poškozené trichomy, což je fenotyp typický pro nefunkční ARP2/3 komplex (Szymanski, 2005). U mutantů *brk1* v kukuřici, kde byl tento homolog nalezen, byl pozorován i vliv na vývoj lobů pokožkových buněk a na vývoj průduchů. Na růstu kořenových vlásků nebyly zjištěny změny (Frank a Smith, 2002). NAPP je další podjednotkou SCAR/WAVE komplexu, mutanti *napp1* vykazují také fenotyp poškozených trichomů, poškozená je přímo

organizace F-aktinu v trichomech (Deeks et al., 2004). Tito mutanti u *Arabidopsis* mají i menší semena a jejich kořeny jsou kratší než u WT, mutantní rostliny jsou také citlivější k nedostatku dusíku a méně odolné vůči zasolení. Dále je předpoklad, že se NAPP podílí na regulaci při vytváření autofagosomu (Wang et al., 2016b). NAPP je skladován v zásobní neaktivní formě v endoplazmatickém retikulu, ER je tedy důležitý při organizaci SCAR/WAVE (Zhang et al., 2013). ABI a jeho homolog u rostlin ABIL (ABI-like) jsou dalším stabilizačním proteinem komplexu SCAR/WAVE. Při jeho umlčení pomocí RNA interference byl pozorován fenotyp zkroucených trichomů a byly pozorovány i změny v elongaci kořenových buněk. ABIL také interaguje s kortikálními mikrotubuly (Jörgens et al., 2010). Sra1/PIRP je také důležitá podjednotka pro stabilizaci celého komplexu. Mutanti vykazují poruchy při vytváření laločnatých pokožkových buněk a fenotyp zkroucených trichomů (Zhang et al., 2005; Brembu et al., 2004). Pro Rho GTPázy, které regulují celý SCAR/WAVE komplex je důležitý také GEF (guanin exchange factor), kterým je u rostlin SPIKE1, který aktivuje GTPázy. SPIKE také interaguje s podjednotkami SCAR komplexu a usnadňuje signalizaci mezi nimi (Basu et al., 2008).



Obr. 3 Schéma aktivace ARP2/3 komplexu k nukleaci aktinových filament pomocí SCAR komplexu aktivovaným ROP GTPázami (Převzato od Yanagisawa et al., 2013).

U některých nižších rostlin (zelené řasy, *Physcomitrella* a *Selaginella*) a u jednoděložné rostliny *Sorghum* byl nalezen homolog WASH. V modelové *Arabidopsis* však tento homolog nebyl nalezen (Veltman a Insall, 2010). U osekvenovaných genomů rostlin bylo zjištěno, že u většiny gen WASH buď úplně chybí nebo je v genomu pouze nefunkční pseudogen nebo fragment tohoto genu. WASH byl tedy možná přítomný u společného předka rostlin a živočichů a u rostlin byl později v evoluci ztracen (Yanagisawa et al., 2013).

### 2.2.3. Popis mutantů v genech pro podjednotky ARP2/3 komplexu u rostlin

#### 2.2.3.1. ARP2

ARP2 je druhou největší podjednotkou celého komplexu (45 kDa) s vysokou strukturální podobností k aktinu, spolu s ARP3 daly také název celému komplexu. Díky společnému původu s aktinem jsou ARP2 a ARP3 podjednotky schopné vázat ATP nutné pro polymeraci (Dayel et al., 2001).

Mutanti v ARP2 podjednotce mají typicky poškozené/distorted trichomy, poškozené je i vytváření lobů na typicky laločnatých pokožkových buňkách. Ve vývoji semen ani v růstu pylové láčky nebyly pozorovány žádné změny (Le et al., 2003). Dalšími znaky mutantů *arp2* jsou kratší a vlnité kořenové vlásky proti WT, kratší a zkroucené jsou i buňky hypokotylu. Bylo pozorováno také poškození fúze vakuol, kdy místo jedné vakuoly bylo v buňkách trichomů *arp2* mutantů několik menších provakuol. U většiny mutantních semenáčků byla narušena i diferenciací průduchového komplexu na hypokotylu (Mathur et al., 2003a). Mutanti v ARP2 a v ARP3 podjednotce vykazují poruchy i při otvírání/zavírání průduchů. V práci Li et al. (2013) byla měřena průduchová šterbina u *arp2* a *arp3* mutantů, která byla oproti WT menší. Celkově se průduchové šterbiny otvíraly u mutantů pomaleji. U *arp2* i *arp3* bylo pozorováno i narušení fúze vakuol ve svěracích buňkách a narušení celkové organizace aktinových filamentů nutné pro správnou a rychlou funkci průduchů (Li et al., 2013). ARP2 byl rovněž popsán jako regulátor  $\text{Ca}^{2+}$  dependentních pórů v mitochondriích při odpovědi na zasolení. Bez ARP2 dochází k rozsáhlému zvýšení  $\text{Ca}^{2+}$  v cytosolu, které signalizuje buněčnou smrt. Dále dochází k sníženému pohybu mitochondrií a vyšší senzitivě rostliny k solím. ARP2/3 komplex se také podílí na regulaci růstu během tohoto stresu – moduluje dynamiku mikrofilament (Zhao et al., 2013).

#### 2.2.3.2. ARP3

ARP3 je největší podjednotkou celého komplexu (47kDa) s vysokou strukturální podobností k aktinu.

Mutantní fenotyp v důsledku ztráty této podjednotky zahrnuje typicky poškozené trichomy, narušené vytváření laločnatých buněk epidermis, kratší a pokroucený hypokotyl a narušený kontakt mezi sousedními buňkami. Na délce kořenů ani na pylové láčce nebyl pozorován výrazný fenotyp (podobně jako ARP2 popsáno ve studiích Mathur et al., 2003a; Le et al., 2003). Mutanti v ARP3 byly původně popsány na základě poškozených trichomů jako *dis1* (*DISTORTED1*; Hülskamp et al., 1994). ARP3 se účastní i při gravitropické a fototropické reakci. Tento jev byl

studován na semenáčcích *Arabidopsis* u mutantů *dis1*, u kterých docházelo k narušení zakřivení kořenů ve tmě při změně gravitopického stimulu (otočení kultivačních misek o 90°). Při růstu kořenů na světle nemá ARP3 vliv. V hypokotylu nebyla pozorována žádná změna při studiu gravitropismu. (Reboulet et al., 2010). Umlčením podjednotky ARP3 v práci od Gavrin et al., 2015 u kořenových hlízek *Medicago truncatula* byla zjištěna funkce ARP3 při endosymbióze s dusík vázajícími bakteriemi. V infikovaných hlízkách probíhá velice dynamicky vezikulární transport, který je zajištěn právě aktinovým cytoskeletem, snížením množství ARP3 podjednotky se zpomalila maturace symbiosomu, prostoru ve kterém žijí symbiotické bakterie (Gavrin et al., 2015). Funkce ARP3 v gravitropismu byla studována dále v kořenové čepičce, která obsahuje amyloplasty, které se jako relativně těžké organely dokáží přesouvat v buňce dle gravitace. F-aktin se podílí na přenosu signálu gravitace a účastní se reorganizace statolitů a není proto překvapivé zjištění, že u mutantů *dis1* je gravitropismus narušen. Dále bylo zjištěno i to, že se ARP3 podílí na migraci PIN přenašeče auxinu, který také ovlivňuje gravitropismus (Palmieri a Kiss, 2005; Zou et al., 2016).

#### 2.2.3.3. *ARPC1*

Jde o největší podjednotku (40-41 kDa) z malých podjednotek ARP2/3 komplexu. U *Arabidopsis thaliana* má tato podjednotka dvě prakticky identické isoformy, které jsou navíc v silné vazbě, nejsou tedy dostupní dvojití mutanti v této podjednotce a není dostupný popis fenotypu ztráty ARPC1. Protein ARPC1 se skládá do struktury tzv.  $\beta$ -propeller sestaveného ze sedmi skládaných  $\beta$ -listů. Podjednotka ARPC1 je přímo spojená s ARP2, ARP3 a ARPC5 podjednotkou (dle Robinson et al., 2001). ARPC1 je důležitý při vazbě aktivátorů ARP2/3 komplexu – přes VCA doménu společnou všem proteinům z rodiny WASP, tedy i rostlinnému komplexu SCAR/WAVE (Pan et al., 2004). Jednou ze studií, kde je popsán fenotyp ztráty ARPC1, je studie na mechu *Physcomitrella patens*, je zde využito umlčení ARPC1 pomocí RNAi. Mutantní protoplasty *arpc1* byly citlivější k osmotickému stresu a po regeneraci měly problém s ustavením buněčné polarity. Narušená byla i tvorba kaulonemat, což jsou rhizoidy mečů, pro které je typický rychlý polarizovaný růst. Dále byl narušen i vývoj pupenů, které dávají vznik gametoforu (Harries et al., 2005). Role ARP2/3 komplexu byla popsána také v symbiotickém vztahu u mikrosymbionta *M. loti* s rostlinou *Lotus japonicus*, konkrétně byli sledováni RNAi mutanti v ARPC1 podjednotce. U mutantů nedocházelo k infekci symbiotickou bakterií, při které jsou tedy zřejmě potřeba změny v aktinovém cytoskeletu zprostředkované ARP2/3 komplexem. Mutantní rostliny štírovníku měly i poškozené trichomy a zmenšené lusky. Změny v růstu kořenových vlásků, pylové láčky ani

hypokotylu nebyly zjištěny. Fenotyp nebyl pozorován ani u pokožkových buněk (u štírovníku ale nejsou tyto buňky výrazně laločnaté; Hossain et al., 2012).

#### 2.2.3.4. *ARPC2*

Podjednotka ARPC2 (34 kDa) tvoří spolu s ARPC4 dimer a jádro celého komplexu, významně se tedy podílí na stabilitě ARP2/3 komplexu a při jeho sestavování. Strukturně je podobná s ARPC4 (Robinson et al., 2001). Gen *DISTORTED2* ze skupiny genů, které mají fenotyp poškozených trichomů, kóduje právě ARPC2 podjednotku. Mutanti *dis2* mají kromě distorted trichomů poruchy ve spojení mezi buňkami, menší loby pokožkových buněk a snížený růst vrcholového meristému, celková stavba rostliny ale není ovlivněna. Rozdíl v délce hypokotylu nebyl pozorován, mutantní fenotyp nebyl viděn ani na kořenových vláscích a pylové láčce (El-Assal et al., 2004). Podobně jako ARP3 se ARPC2 podílí na gravitropické odpovědi, ve srovnání s mutanty v ARP3 bylo narušení gravitropismu mírnější u *dis2* mutantů. Fototropické reakce nebyly u *dis2* narušeny (Reboulet et al., 2010). ARPC2 se také podílí na regulaci otvírání a zavírání průduchů a na organizaci aktinu ve svěracích buňkách v závislosti na externích signálech. U mutantů docházelo k vyšším ztrátám vody v důsledku pomalejšího zavírání průduchů, v reakci na světlo se průduchy otvíraly méně oproti WT a byly méně senzitivní k signalizaci kyselinou abscisovou (Jiang et al., 2012). Na tabákových buňkách BY-2 bylo zjištěno, že ARPC2 podjednotka interaguje nejen s aktinem ale i s mikrotubuly (Havelková et al., 2015).

#### 2.2.3.5. *ARPC3*

ARPC3 s velikostí okolo 21 kDa stabilizuje ARP3, se kterou je spojen (Robinson et al., 2001). V dvouhybridním kvasinkovém systému bylo prokázáno, že ARPC3 zajišťuje vazbu se SCAR2 aktivátorem celého ARP2/3 komplexu (Basu et al., 2005). U této podjednotky jsem nenašla žádnou práci, která by se věnovala popisu mutantu u *Arabidopsis*, přestože by mutant měl být relativně snadno dostupný. V *Triticum aestivum* se ARPC3 vyskytuje ve třech kopiích se vzájemně vysokou podobností (nad 92 %) dle BLAST analýzy v práci od Qi et al., 2017. Gen pro ARPC3 z *T. aestivum* dokáže zastoupit funkci u *Saccharomyces cerevisiae*. ARPC3 byl také zfúzován s GFP pro zjištění jeho lokalizace, u *T. aestivum* se ARPC3 vyskytuje v jádře i cytoplazmě. Při umlčení podjednotky ARPC3 se snížila odolnost vůči houbě *Puccinia striiformis*, byla pozorována snížená akumulace peroxidu vodíku, který rostlina využívá při obraně vůči patogenům (Qi et al., 2017).



#### 2.2.3.6. *ARPC4*

Jak již bylo zmíněno výše, tvoří podjednotka ARPC4 (20 kDa) dimer s ARPC2 a sestavuje a stabilizuje ARP2/3 komplex. Interaguje i s ARPC5 podjednotkou, což je zřejmě důležité při stabilizaci komplexu (Zhao et al., 2001). Delece ARPC4 podjednotky byla studována na mechu *Physcomitrella patens* a bylo zjištěno, že se podílí na organizaci polarizovaného růstu. Podobně jako u ARPC1 podjednotky byl pozorován snížený vrcholový růst kaulonemat. Růst gametoforu ani tvorba pupenů nebyla narušena (Perroud a Quatrano, 2006). V práci dle Kotchoni et al., 2009 na *Arabidopsis* bylo zjištěno, že ARPC4 je asociovaná na membráně. Dále byl v této práci popsán fenotyp *arpc4* mutantů u *Arabidopsis* - narušená elongace buněk hypokotylu při růstu ve tmě a poškozené trichomy s více aktinovými svazky. Funkce ARPC4 při regulaci průduchů, podobně jako u jiných podjednotek byla objevena ve studii Li et al., 2014. ARPC4 se podílí na reorganizaci cytoskeletu ve svěracích buňkách nutné k rychlému pohybu při reakci na vnější stimuly. Zavírání u mutantů *arpc4* bylo zpomaleno v reakci na abscisovou kyselinu a peroxid vodíku, což jsou látky stimulující uzavírání průduchů (Kotchoni et al., 2009).

#### 2.2.3.7. *ARPC5*

Poslední podjednotkou komplexu je ARPC5, která je jeho nejmenší podjednotkou s velikostí okolo 16 kDa a stabilizuje ARP2/3 ve spojení s ARPC4 (Robinson et al., 2001). ARPC5 kóduje gen *CROOKED* (mutant *crk*), který také patří do skupiny DISTORTED (Hülskamp et al., 1994; Mathur et al., 2003b). V práci od Mathur et al., 2003b je pak dále popsán fenotyp mutantu *crk* u *Arabidopsis thaliana*. ARPC5 se podílí na rychlém růstu a orientaci F-aktinu v buňce. U mutantů je kratší hypokotyl i trichomy, buňky na děložních lístcích jsou také prokazatelně menší. Byl pozorován opožděný vývoj průduchů, na hypokotylu dokonce chybí průduchy. Kořenové vlásky mutantů jsou také menší a zvlněné, navíc vyrůstá více vlásků z jedné buňky. U nevyvinutých trichomů u mutantů byla pozorována akumulace Golgiho tělísek, která se u WT rostlin nevyskytuje. Může to být zapříčiněno poruchou při pohybu těchto tělísek po aktinových filamentech (Mathur et al., 2003b). V práci od Li et al., 2003 byl zjištěn navíc fenotypový projev u pokožkových buněk, jejichž laločnaté výběžky byly menší. V polarizovaném růstu kořenových vlásků a pylové láčky nebyl u mutantů v ARPC5 zjištěn žádný fenotypový rozdíl oproti WT (Li et al., 2003)

### 3. Materiál a metodika

#### 3.1. Biologický materiál a jeho kultivace

##### 3.1.1. *E.coli*

Ke klonování plazmidů byl použit kmen JM109, který se osvědčil pro přípravu konstruktů s invertovanými repeticemi. Kultivace probíhala buď na pevném LB médiu (Tab. 1) na Petriho miskách s příslušným antibiotikem při 37 °C přes noc nebo v tekutém LB médiu aerobně, za stálého třepání (třepačka Certomat Biotech International, 180 RPM) ve zkumavkách (po 3 ml s příslušným antibiotikem) při 37 °C přes noc. Pro dlouhodobé skladování vybraných bakteriálních klonů byly *E.coli*, po přidání 200 µl 50% sterilního glycerolu k 800 µl bakteriální suspenze, zmrazeny v tekutém dusíku a skladovány v -80 °C.

Tab. 1 – Složení LB média

Chemikálie	g/l
pepton	10
kvasničný extrakt	5
NaCl	10
agar (pro pevné LB médium)	17,5
destilovaná voda	doplnění do 1 l

Sterilizace autoklávováním (SterileMax, 20 min 121 °C, OMEGA Autoclave, 16 min, 121 °C).

##### 3.1.2. *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (pMP90) / C58C1 > Rif<sup>R</sup> (pMP90) GV2260

K transformaci buněčné linie tabáku BY-2 byl použit kmen GV2260 (Deblaere et al. 1985). Pro transformaci *Arabidopsis thaliana* byl použit kmen GV3101 (pMP90). Kultivace probíhala na pevném LB médiu na Petriho miskách o průměru 9 cm (s příslušnými antibiotiky) při 28 °C 3 dny. Před kokultivací s rostlinným materiálem probíhala kultivace v tekutém médiu YEB (Tab. 2) aerobně za stálého třepání (třepačka Certomat Biotech International, 180 RPM) po 10 ml v Erlenmeyerových baňkách s příslušným antibiotikem při 28 °C přes noc. Jako antibiotikum byl použit vždy rifampicin, pro kokultivaci s BY-2 spectinomycin a pro kokultivaci s *Arabidopsis* pak spectinomycin a gentamycin (koncentrace v médiu viz Tab. 7). Rezistence na rifampicin je u *Agrobacterium tumefaciens* podmíněná chromozomálně, gentamicinovou rezistenci má kmen

pMP90 a spectinomycinová rezistence je nesena plazmidem pER8. Pro dlouhodobé skladování vybraných bakteriálních klonů byly bakterie, po přidání 200  $\mu$ l 50% sterilního glycerolu k 800  $\mu$ l bakteriální suspenze, zmrazeny v tekutém dusíku a skladovány v -80 °C.

Tab. 2 - Složení YEB média

Chemikálie	g/l
pepton (tripepton)	10
kvasničný extrakt	1
sacharóza	5
MgSO <sub>4</sub>	0,5

Médium bylo sterilizováno autoklávováním, sterilizace MgSO<sub>4</sub> zvlášť (10x koncentrováný), přidáván 1:10 před kultivací.

### 3.1.3. *Arabidopsis thaliana*

Jako modelový organismus byly použity rostliny *Arabidopsis thaliana* ekotyp Columbia (Col-0, označované jako WT rostliny). Rostliny rostoucí na rašelinových peletách Jiffy byly kultivovány v kultivační místnosti (16/8 hod světlo/tma, při 24 °C). *In vitro* rostliny byly kultivovány v kultivační místnosti (16/8 hod světlo/tma, při 22 °C) ve čtvercových Petriho miskách 12x12 cm s cca 50 ml ½ MS média (Tab. 3). Pro selekci rostlin nesoucích T-DNA z pER8 byl přidán do media hygromycin.

Tab. 3 – Složení ½ MS média pro kultivaci *Arabidopsis thaliana*

Chemikálie	g/l
MS soli - komerční směs (Sigma-Aldrich)	2,2
sacharóza	10
agar 1,2 %	12

Sterilizace média autoklávováním, na pH = 5,7 upraveno 1 M KOH.

### Sterilizace semen *Arabidopsis thaliana*

Pro sterilizaci semen byla použita metoda sterilizace plynným chlórem. Prováděno v digestoři v exsikátoru. Do exsikátoru byly vloženy mikrozkuhavky se semeny a kádinka s 50 ml SAVA (5% NaClO), do které bylo těsně před uzavřením exsikátoru přidáno 1,5 ml koncentrované HCl. Doba

sterilizace se pohybovala mezi 4 – 8 hodinami. Po uplynutí této doby byly mikroskopické vzorky opatrně vyjmuty a uzavřeny, semena byla poté použita pro další výsevy.

#### Seznam markerových linií - *Arabidopsis thaliana*

Tab. 4 - Použité markerové linie *Arabidopsis thaliana* (Nelson a Nebenführ, 2007; Sampathkumar et al., 2011), všechny poskytl Mgr. Jan Martínek

Název	Resistence	Fluorescenčně značená buněčná struktura
ER-RK	kanamycin	červeně endoplazmatické retikulum
GFP $\alpha$ -TUB	kanamycin	zeleně $\alpha$ -tubulin (mikrotubuly)
GFP $\beta$ -TUB	kanamycin	zeleně $\beta$ -tubulin (mikrotubuly)
mCherry FABD	kanamycin	červeně fimbrin (mikrofilamenta)
GFP FIM	kanamycin	zeleně fimbrin (mikrofilamenta)
PX - GK (GFP - PTS1)	kanamycin	zeleně peroxizómy

#### 3.1.4. *Nicotiana tabacum* – buněčná linie BY-2

Pro tuto práci byla jako druhý modelový organismus zvolena buněčná linie BY-2 odvozena z kultivaru *Nicotiana tabacum* L. „Bright Yellow 2“ (Nagata et al. 1992). Tato linie byla pěstována sterilně *in vitro* a to buď ve formě „kalusu“, nebo ve formě suspenzní kultury. Kultivace probíhala vždy ve tmě při 26 °C. Kalusy byly pěstovány na pevném MS médiu (Murashige et Skoog, 1962; Tab. 5) v plastových Petriho miskách po sedmi kalusech na misku (průměr 6 cm s cca 15 ml media a příslušným antibiotikem). Po 4 týdnech byla vždy část starého kalusu přesazena na nové misky s médiem (sterilně v laminárním flow-boxu). Suspenze byly kultivovány ve 100ml Erlenmeyerových baňkách s 30 ml tekutého MS média. Suspenze byly vytvořeny z mladých (1-2 týdenních) kalusů, kdy byla část kalusu sterilně vložena do baňky s médiem a nechala se kultivovat po dobu cca 14-ti dnů. Subkultivační interval byl kolem sedmi dnů, kdy se do nového média přidalo standardně 1 ml staré buněčné suspenze. Kultivace probíhala za stálého třepání na orbitálních třepačkách IKA KS501 (frekvence přibližně 110 RPM).

Tab. 5 – Složení MS média pro BY-2

Chemikálie	Množství
MS soli - komerční směs (Sigma-Aldrich)	4,33 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g/l
myo-inositol	0,1 g/l
sacharóza	30 g/l
zásobní roztok 2,4-D (2 mg/ml)	0,1 ml/l
zásobní roztok vitamínu B1 (10 mg/ml)	0,1 ml/l
agar (do pevného média)	8 g/l

Sterilizace média autoklávováním, na pH = 5,8 upraveno 1 M KOH.

#### Seznam markerových linií - BY-2

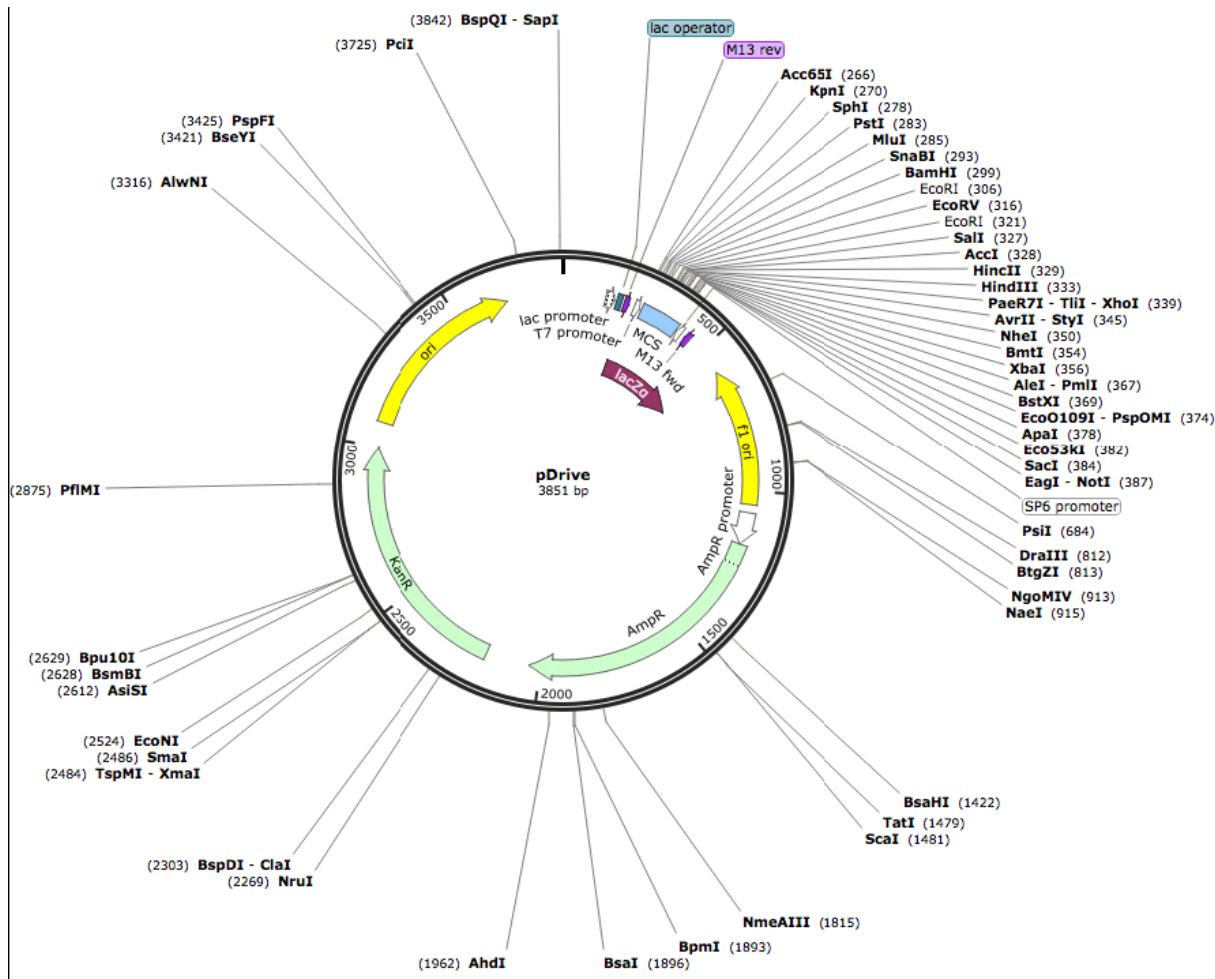
Tab. 6 – Použité markerové linie BY-2 (Nelson a Nebenführ, 2007; Dyachok et al., 2014), poskytla RNDr. Kateřina Schwarzerová Ph.D.

Název	Resistence	Fluorescenčně značená buněčná struktura
VAC	kanamycin	červeně vakuoly
FIM	kanamycin	červeně fimbrin (aktinová mikrofilamenta)
G-GK	kanamycin	červeně Golgiho komplex

### 3.2. 3.2 Plazmidy použité při klonování

#### 3.2.1. Plazmid – pDrive

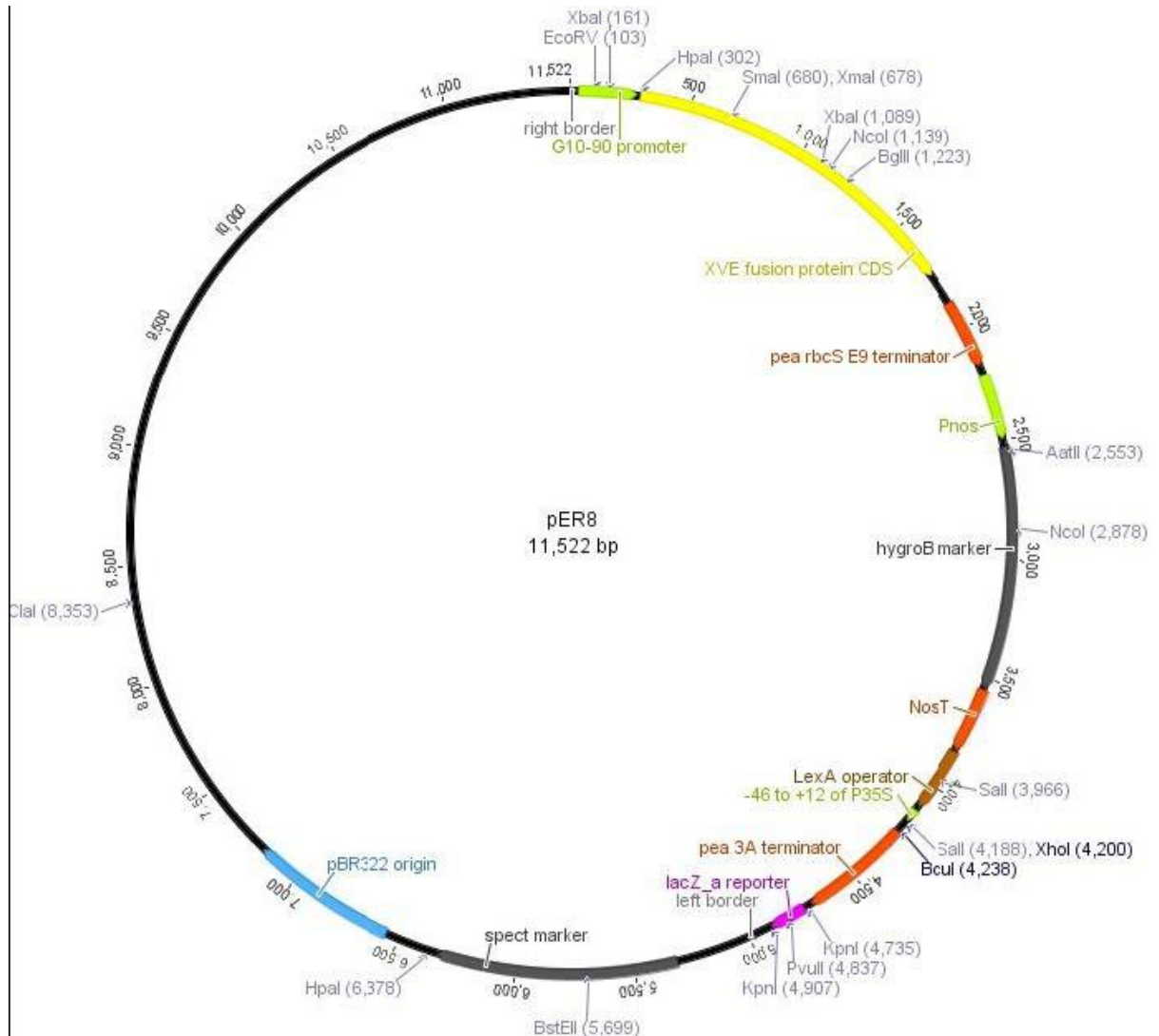
Mnohokopiový plazmid používaný pro TA-klonování PCR fragmentů a k tvorbě vlásenkového konstruktů (Obr. 4). Nese kanamycinovou a ampicilinovou resistenci. Obsahuje MCS (multi cloning site), na jehož okraj nasedají primery M13, které byly využity pro kontrolu plazmidu sekvenováním.



Obr. 4 Mapa plazmidu pDrive dle [www.snapgene.com](http://www.snapgene.com)

### 3.2.2. Plazmid - pER8

Tento plazmid je binární vektor, obsahující spektinomycinovou rezistenci pro selekci v bakteriích (*E. coli*, *A. tumefaciens*) a hygromycinovou rezistenci pro selekci v rostlinách (Obr. 5). Plazmid obsahuje inducibilní promotor, který je indukován  $\beta$  – estradiolem (Zuo et al. 2000).



Obr. 5 Mapa plazmidu pER8, od Mgr. Vojtěcha Čermáka, vytvořeno v programu Geneious

### 3.3. Seznam použitých antibiotik

Tab. 7 - Použitá antibiotika a jejich koncentrace v mediu

<b>Antibiotika</b>	<b>Koncentrace zásobního roztoku [mg/ml]</b>	<b>Koncentrace v mediu [mg/l]</b>	<b>Skladování zásobního roztoku</b>
Kanamycin	50	50	dH <sub>2</sub> O, 4 °C
Spektinomycin	100	100	dH <sub>2</sub> O, -20 °C
Hygromycin	25	100	dH <sub>2</sub> O, -20 °C
Gentamycin	50	50	dH <sub>2</sub> O, -20 °C
Rifampicin	10	100	metanol, -20 °C

Sterilizace pomocí filtrů Nalgene 0,22 µm, mimo rifampicin, který není nutné sterilizovat, antibiotika přidávána vždy až po zchlazení media.

### 3.4. Transformace bakterií a rostlinného materiálu

#### 3.4.1. *Příprava elektrokompetentních bakterií E.coli*

Bakterie byly „rozčárkovány“ na plotny s pevným LB médiem bez antibiotik a kultivovány při 37 °C do druhého dne. Po kultivaci byly zaočkovány samostatné kolonie do 50 ml tekutého LB média ve sterilních Erlenmeyerových baňkách a kultivovány přes noc při 37 °C na třepačce. Další den bylo přeneseno asi 10 ml suspenze do 400 ml tekutého LB média do 2l Erlenmeyerovy baňky. Kultivace probíhala při 37 °C na třepačce do optické density 0,4 při  $\lambda = 600$  nm a délce kyvety 1 cm. Po dosažení této density byla baňka s bakteriemi přenesena na led na 15 – 30 min. za občasného míchání. Bakteriální suspenze byla rozdělena do vychlazených zkumavek (50 ml, Falcon) a centrifugována při 4 °C při 4000 RPM 10 min (centrifuga Universal 32 R Hettich). Supernatant byl slit a sediment byl resuspendován v 6 ml sterilní vychlazené dH<sub>2</sub>O ustříženou špičkou. Dále bylo do každé zkumavky přidáno 34 ml sterilní vychlazené dH<sub>2</sub>O (k 6 ml zahuštěné bakteriální suspenze z předchozího kroku). Celkový objem 40 ml v každé zkumavce byl opět centrifugován, supernatant byl slit a sediment resuspendován v 25 ml 10% glycerolu. Po následné centrifugaci byl supernatant slit a sediment resuspendován v 1 ml sterilního 10% glycerolu a přenesen do jedné zkumavky, která byla centrifugována, supernatant byl odsát



pomocí vývěvy. Pelet byl resuspendován v 800 µl sterilního vychlazeného GYT média (Tab. 8). Z takto vzniklé suspenze bylo odpipetováno 10 µl do 1 ml (100x ředěná) a změřena její OD při 600 nm. Poté byla bakteriální suspenze naředěna na základě změřené OD tak, aby se její koncentrace pohybovala mezi  $2 \times 10^{10}$  a  $3 \times 10^{10}$  buněk/ml dle předpokladu, že  $OD_{600} = 1,0$  odpovídá  $2,5 \cdot 10^8$  buněk/ml. Na závěr byla suspenze rozpipetována po 40 µl do sterilních 1,5ml mikrozkušavek, které byly zmrazeny v tekutém dusíku a skladovány při -80 °C.

Tab. 8 – Složení GYT média

Chemikálie	Množství na 10 ml
glycerol	1 ml
kvasničný extrakt	12,5 mg
trypton (pepton)	25 mg
dH <sub>2</sub> O	doplněna do 10 ml

#### 3.4.2. Příprava elektrokompetentních bakterií *A.tumefaciens*

Příprava probíhala podobně jako u *E.coli*, bakterie byly „rozčárkovány“ na misce s pevným LB médiem a rifampicinem a kultivovány 3 dny při 28 °C. Nově narostlé kolonie byly zaočkovány do 10 ml tekutého LB media s rifampicinem ve 100ml Erlenmeyerově baňce a kultivovány přes noc na třepačce. Další den byly zaočkovány 4 ml takto vzniklé suspenze do 200 ml YEB media s rifampicinem v 1l Erlenmeyerově baňce a kultivovány na třepačce do dosažení OD 0,6 (při  $\lambda = 600$  nm a délce kyvety 1 cm). Po dosažení požadované hustoty byla baňka i s bakteriemi přenesena na led na 15 – 30 min. Následné práce byly prováděny sterilně a na ledu. Centrifugace probíhaly při 4 °C, 4000 RPM, 10 min. Suspenze byla rozlita po 25 ml do osmi 50 ml zkumavek Falcon, zcentrifugována a vzniklý pelet resuspendován v 25 ml dH<sub>2</sub>O. Následovala další centrifugace, pelet byl resuspendován v 10 ml dH<sub>2</sub>O, vždy dvě falkony byly slity dohromady a doplněny dH<sub>2</sub>O do 25 ml. Po následné centrifugaci suspenzí byly pelety resuspendovány ve 2 ml 10% glycerolu a vše bylo slito do jediné zkumavky. Zkumavka byla zcentrifugována a vzniklý pelet resuspendován v 1 ml 10% glycerolu. Suspenze byla rozpipetována po 100 µl do 1,5 ml mikrozkušavek, které byly ihned zmrazeny v tekutém dusíku a skladovány při -80 °C.

### 3.4.3. Transformace *A. tumefaciens* a *E. coli*

Transformace bakterií byla provedena pomocí elektroporace. Byly použity elektrokompetentní buňky bakterií, ke kterým bylo přidáno 1-3  $\mu$ l odsolené ligační směsi či 10 ng (1  $\mu$ g pro *A. tumefaciens*) plazmidové DNA, poté byly buňky ponechány jednu minutu na ledu.

Obsah mikrozkušavky byl poté přenesen do vychlazené elektroporační kyvety. Kyveta byla vložena do elektroporátoru (Gene Pulser Apparatus od firmy Bio-Rad), hodnoty nastavené na 2500 V pro *E. coli* (2000 V pro *A. tumefaciens*) 25  $\mu$ F, a 200  $\Omega$ , byl aplikován elektrický pulz. Ihned po vytažení kyvety z elektroporátoru byl ke vzorku přidán 1 ml SOC média (YEB recovery pro *A. tumefaciens*; Tab. 9) o laboratorní teplotě. Bakterie byly poté kultivovány ve zkumavce na třepačce, pro *E. coli* 37 °C 1 hod a pro *A. tumefaciens* 28 °C 3 hod. Po kultivaci byly bakterie sterilně vysety - 50  $\mu$ l a zbytek (zkonzentrováno krátkou centrifugací, 5000 RPM, 30 s) na Petriho misky s LB médiem a příslušnými antibiotiky. V miskách byly bakterie kultivovány - *E. coli* při 37 °C do druhého dne, *A. tumefaciens* při 28 °C po 3 dny.

Tab. 9 - Složení YEB recovery média

Chemikálie	Množství na 100 ml
pepton	1
kvasničný extrakt	0,1
sacharóza	0,5
MgSO <sub>4</sub>	0,05
MgCl <sub>2</sub>	0,095
KCl	0,019
NaCl	0,058
dH <sub>2</sub> O	doplněna do 100 ml

### 3.4.4. Transformace *Arabidopsis thaliana*

Transformace byla provedena na 5-6 týdnů starých rostlinách *Arabidopsis thaliana* metodou floral dip (Clough a Bent, 1998). Rostlinkám byly před transformací ostříhány narostlé šesule, aby se vyřadila netransformovaná semena. Bylo připraveno bakteriální inokulum *Agrobacterium tumefaciens* transformované binárním vektorem v 5 ml tekutého LB media s příslušnými antibiotiky dle následujícího postupu.

První den bylo zředěno bakteriální inokulum *A. tumefaciens*, transformovaného binárním vektorem, 0,6 ml do 300 ml LB média s příslušnými antibiotiky v 1 l baňce. Kultivace *Agrobacteria*

probíhala na třepačce za stálého míchání při 28 °C do druhého dne. Druhý den byla suspenze *A. tumefaciens* přelita do 50 ml plastových zkumavek a centrifugována při 5000 RPM, 20 min, 4 °C. Supernatant byl slit a sediment resuspendován nejprve v malém objemu media (cca 10 ml) a poté v roztoku 5% sacharózy s 0,05% smáčedla (Silwett L77 od AgroBio Opava). Vše bylo slito do jediné plastové zkumavky a dolito roztokem sacharózy na 50 ml. V této zkumavce pak byly postupně namáčeny rostliny určené k transformaci na 5-10 s. Rostliny byly poté zabaleny do PVC pytle (pro zvýšení vzdušné vlhkosti) a ponechány do druhého dne ve tmě. Poté byly přeneseny do kultivační místnosti, po týdnu byl celý proces zopakován pro zvýšení úspěšnosti transformace.

#### 3.4.5. Transformace BY-2

Transformace byla provedena pomocí dvou protokolů.

Protokol 1 (upraveno podle An, 1985)

Pro transformaci byly použity třídenní buňky (nasazený ze sedmidenní suspenze buněk standardním inokulem 1 ml). Dále byla připravena suspenze *A. tumefaciens* s vneseným plazmidem, bakterie byly zaočkovány do 10 ml tekutého YEB s  $MgSO_4$  a s příslušnými antibiotiky, a kultivovány přes noc při 28 °C.

První den byla zahájena kokultivace (vše sterilně ve flowboxu). Třídenní buňky byly přefiltrovány (filtrátka Nalgene) a resuspendovány v novém tekutém MS médiu do původního objemu 30 ml. Do baňky bylo přidáno 15  $\mu$ l acetosyringonu, suspenze byla protažena cca 20x neustřiženou 10 ml špičkou (poničením buněk). Z této suspenze byl odebrán vzorek 2 ml kontrolních netransformovaných buněk do Petriho misky (průměr 6 cm). Do baňky se suspenzí byly přidány 3 ml suspenze *Agrobacteria*, a směsná suspenze byla několikrát protažena neustřiženou 10 ml špičkou. Směsná suspenze byla rozpipetována po 2 ml do cca pěti malých Petriho misek a kultivována 3 dny při 27 °C ve velké Petriho misce s kouskem mokré gázy.

Po třídenní kokultivaci byla zahájena selekce. Narostlé buňky v Petriho miskách byly resuspendovány přidáním 10 ml 3% roztoku sacharózy, buňky byly přeneseny do sterilního filtrátka Nalgene a promyty 300 ml 3% sacharózy. V dalším kroku byla suspenze promyta 100 ml MS média pro BY-2 se 100  $\mu$ l claforanu. Promyté buňky byly nakonec resuspendovány v malém objemu media (cca 2 ml, s claforanem) a směs byla rozpipetována na selekční pevné medium (s přidaným agarem 8 g/l) s příslušným antibiotikem v malých Petriho miskách (pro kontrolu byly buňky vysety i na médium bez selekčního antibiotika). Směs byla rozprostřena krouživým pohybem po celé ploše média. Netransformovaná kontrola byla pouze resuspendována v médiu,

nepromývána a přímo rozlita na plotny (s a bez selekčního antibiotika). Petriho misky byly poté vloženy do velké skleněné Petriho misky s kouskem sterilní gázy polité sterilní destilovanou vodou a kultivovány přibližně 3-4 týdny při teplotě 27 °C. Po této době byly patrné drobné transformované kalusy, které byly přeneseny sterilně do nových Petriho misek s MS médiem pro BY-2 a selekčními antibiotiky – hygromycinem a claforanem.

## Protokol 2

V tomto optimalizovaném protokolu (Srba, ústní sdělení) je zkrácen celkový čas procedury a je podpořen růst kalusů z transformovaných buněk.

Pro transformaci mohou být použity 4-10-ti denní buňky (4-5 denní buňky nasazeny 10 ml inokulem, 6-10 denní buňky nasazeny 6 ml inokula). BY-2 buněk byly připraveny vždy dvě Erlenmeyerovy baňky s 30 ml tekutého MS media jeden den před transformací. Dále byla připravena suspenze *A. tumefaciens* s vneseným plazmidem, bakterie byly zaočkovány do 10 ml tekutého YEB s MgSO<sub>4</sub> a s příslušnými antibiotiky a kultivovány přes noc při 28 °C.

První den byla zahájena kokultivace (vše sterilně ve flowboxu). K jedné z baněk ze suspenzí připravené předchozí den bylo přidáno 15 µl acetosyringonu. Suspenze byla protažena cca 20x neustřiženou špičkou (poničení buněk). Z této suspenze byl odebrán vzorek 2 ml kontrolních netransformovaných buněk (2 ml suspenze Petriho misky o průměru 6 cm). Suspenze byla rozdělena na alikvoty po 8 ml na variantu, k těm bylo přidáno *Agrobacterium* (100 µl na 1 ml suspenze BY-2). Směsná suspenze byla rozpipetována po 2 ml (slabá vrstva) do cca pěti malých Petriho misek a kultivována do druhého dne při 27 °C ve velké Petriho misce.

Následující den byla druhá suspenze zředěna 30 ml čerstvého MS media, do suspenze byl přidán claforan (1 µl/ml). Směsná suspenze (BY-2 s *Agrobacteriem*) z prvního dne byla přefiltrována (sterilním filtrátkem Nalgene), směs byla promyta pouze 3% roztokem sacharózy (100-150 ml). Promytá suspenze byla poté resuspendována ve dvojnásobku zředěné BY-2 suspenze s claforanem. Směs buněk byla rozpipetována na selekční pevné medium (s příslušným antibiotikem v malých Petriho miskách, pro kontrolu byly buňky vysety i na médium bez selekčního antibiotika). Směs byla rozprostřena krouživým pohybem po celé ploše media.

Netransformovaná kontrola byla pouze resuspendována v mediu, nepromývána a přímo rozlita na plotny (s a bez selekčního antibiotika). Po této době byly patrné drobné transformované kalusy, které byly přeneseny sterilně do nových Petriho misek s MS médiem pro BY-2 a selekčními antibiotiky – hygromycinem a claforanem.

### 3.5. Práce s DNA

#### 3.5.1. *Izolace plazmidové DNA z E. coli*

Plazmidová DNA byla izolována z bakteriální suspenze narostlé přes noc ve 3 ml tekutého LB média s příslušnými antibiotiky. Izolace byla provedena pomocí kitu Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System firmy Promega. Postup dle protokolu výrobce.

#### 3.5.2. *Izolace DNA z agarózového gelu*

Tato izolace byla provedena pomocí komerčně dostupného kitu QIAEX® II Gel Extraction kit. Nejprve byla z agarózového gelu pod UV světlem vyříznuta část obsahující požadovaný fragment. Bloček gelu byl vyříznut co možná nejpřesněji a vložen do předem zvážené mikrozkušavky. Mikrozkušavka byla s bločkem znovu zvážena a byla tak zjištěna hmotnost agarózového bločku, tato hmotnost je důležitá pro přepočítání přidávaného QX1 pufru z kitu (trojnásobný objem). Dále bylo přidáno 10 µl křemičitých kuliček (QIAEX II) na 2 µg DNA, kuličky musí být předem důkladně promíchány vortexem. Vzorek byl poté inkubován při 50 °C 10 min za mírného třepání v termobločku. Po inkubaci byl vzorek zvortexován a proběhla centrifugace jednu minutu při 13 000 RPM. Vzniklý supernatant byl slit a sediment byl resuspendován v pufru QX1 (500 µl). Dalším krokem byla centrifugace (1 min při 13 000 RPM), supernatant byl slit a vzorek byl promyt 2x PE pufrem. Po promytí byl supernatant co nejlépe odpipetován a sediment byl ponechán cca 10 min, aby vzorek vyschl. K bílé zbarvenému peletu bylo přidáno 10 µl 1mM Tris-HCl (pH 8,0), sediment byl zvortexován a proběhla inkubace 5 min při 50 °C v termobločku. Nakonec byl vzorek centrifugován (1 min, 13 000 RPM), vzniklý supernatant byl přenesen do nové mikrozkušavky. Postup byl zopakován – k sedimentu bylo přidáno dalších 5 - 10 µl 1mM Tris-HCl. Tímto způsobem bylo vyizolováno 15 - 20 µl vzorku DNA, vzorky byly skladovány při -20 °C.

### 3.5.3. Ligace

Ligace byla využita ke spojování úseků DNA, které byly získány restrikčním štěpením. Koncentrace fragmentů vzniklých restrikčním štěpením byla určena z gelu. Byla použita T4 DNA ligáza a ligační pufr od firmy Fermentas. Předpis pro ligační reakci je znázorněn v Tab. 10.

Tab. 10 Složení ligační reakce

Složky	Množství - $\mu\text{l}/10 \mu\text{l}$ reakce
vektor	stechiometrický poměr vektor : insert byl 1 : 7; tyto složky byly dodány do celkového množství max. 100 ng, případný zbytek objemu tvořila $\text{dH}_2\text{O}$
insert	
pufr	1
T4 ligáza	0,5

Reakce běžela v thermocykleru 2 h při 15 °C, následovala inaktivace 65 °C 10 min

### 3.5.4. PCR (*Polymerase chain reaction*)

Metoda polymerázové řetězové reakce (PCR) byla používána pro amplifikaci úseků DNA za použití termostabilní DNA-dependentní DNA polymerázy (Taq polymeráza) a DNA primerů (krátké úseky komplementární s okrajovou sekvencí DNA, kterou chceme amplifikovat).

Proces začíná počáteční denaturací DNA vlákna, dále pokračuje cyklus zahrnující kroky: denaturace, nasednutí primerů a polymerace. Tento cyklus se opakuje zpravidla 20 – 30 x (v závislosti na výchozí koncentraci templátu a potřebném množství produktu). Finální fáze je prodloužená polymerace pro dosyntetizování vláken a přidání A na 3' konce DNA (využití při TA-klonování). Složení směsi na PCR je v popsáno v Tab. 11, jednotlivé kroky reakce v Tab. 12.

Tab. 11 Složení PCR směsi

Složení PCR reakční směsi	Objem [ $\mu$ l] na 50 $\mu$ l reakční směsi
templátová DNA	(1)
10 $\mu$ M primery F (forward) + R (reverse)	1 + 1
10 $\times$ PCR pufr	5
25 mM MgCl <sub>2</sub>	3
10 mM dNTPs	1
Taq polymeráza (5 u/ $\mu$ l)	1
dH <sub>2</sub> O	doplněna do 50 $\mu$ l

Reakce probíhaly v 0,5ml tenkostěnných mikrozkuvkách v termocyklu MJ Research PTC-200 nebo termocyklu T-100<sup>TM</sup> od firmy Bio-Rad. Jako templát byly v některých případech využity přímo bakterie, kdy byla část kolonie nanesena přímo na stěnu mikrozkuvky a doplněna PCR směsí. Bylo použito 50–200 ng templátu genomové DNA, plazmidové DNA maximálně 10 ng templátu (většinou <5 ng).

Tab. 12 Program PCR reakce

Krok	Teplota [ $^{\circ}$ C]	Čas	Počet cyklů
počáteční denaturace	94	3 min.	1
denaturace	94	30 s	23 - 30
nasedání primerů (annealing)	T <sub>m</sub> - 5	30 s	
polymerace	72	1 min	
dosyntetizování	72	10 min	1
chlazení	4	$\infty$	

Teplota při nasedání primerů byla o 5 $^{\circ}$ C nižší než jejich vypočtená teplota tání (T<sub>m</sub> – melting temperature). Pro primery byla T<sub>m</sub> vypočítána ze vzorce  $T_m (^{\circ}\text{C}) = 2\Sigma(A + T) + 4\Sigma(C + G)$ .

### 3.5.5. Použité primery

Tab. 13 Seznam použitých primerů

Název	Sekvence	Restrikční místo	T <sub>m</sub> ( $^{\circ}$ C )
MSPi_F	5' - CTC TGC CCT TGT TGT CTC A - 3'	-	57
MSPi_R	5' - GAA CTC CTT CAG CAT TAG CT - 3'	-	57
EFat F1	5' – GCA CTG TCA TTG ATG CTC CTG GTC - 3'	-	66
EFat R1	5' – CAC CAA GGG TGA AAG CAA GGA GAG - 3'	-	66

EF F1	5' - TAC TGC ACT GTG ATT GAT GCC - 3'	-	56
EF R1	5' - AGC AAA TCA TTT GCT TGA CAC C - 3'	-	56
ARPC2A F1	5' – GGA TCC AAT GAT ACT ATT GCA GTC ACA ATT C - 3'	-	56
ARPC2A R1	5' – AAG CTT CTA CTT CGA GTT GGT GTG ATT G - 3'	-	56
AKTIN F1	5' – CCT GAG GTC CTT TTC CAA CCA – 3'	-	63
AKTIN R1	5' – GGA TTC CGG CAG CTT CCA TT – 3'	-	63
ARPC1F1	5' – GGA TCC TGG CAG TGG TGG ATG TTC ATC – 3'	BamHI	57*
ARPC1R1	5' – CTG CAG TCT AGA CAT CTG TTG ATG TCG TTG CCA G - 3'	PstI, XbaI	57*
ARPC1F2	5' – AAG CTT TGG CAG TGG TGG ATG TTC ATC - 3'	HindIII	57*
ARPC1R2	5' – CTC GAG CAT CTG TTG ATG TCG TTG CCA G - 3'	XhoI	57*
M13F (sekvenace)	5' - GTA AAA CGA CGG CCA GT - 3'	-	55
PAF (sekvenace)	5' – CTCGAGATCGTTCAAACATTTGGCA - 3'	XhoI	57

\* Byla použita snížená teplota annealingu, neboť primery obsahují adaptory s restričními místem.

### 3.5.6. Restriční štěpení

Tato metoda byla prováděna pro vyštěpení definovaných úseků plazmidů proto, aby mohly být následně zaklonovány nebo, aby byl ověřen správný výsledek při tvorbě rekombinantních konstruktů. Byly používány restriktázy a jejich pufry od firmy Fermentas. Čím větší je počet (hustota) restričních míst v cílovém plasmidu, tím větší množství enzymu bylo použito, naopak je to s počtem příslušných restričních míst v  $\lambda$  fágu (na rozštěpení  $\lambda$  DNA je definována specifická aktivita enzymu). Vždy byl brán dvojnásobek enzymu oproti vypočtenému množství, avšak tolik, aby celkový objem přidaných enzymů nepřesahoval 10 % objemu reakce. Reakce běžely při 37 °C 1 – 5 hodin.



### 3.5.7. Agarózová gelová elektroforéza (DNA)

Elektroforéza byla použita pro separaci molekul DNA i pro přibližný výpočet koncentrace DNA. DNA putuje díky zápornému náboji stejnosměrným elektrickým polem, rychlost pohybu závisí na délce, komplexitě molekuly DNA a koncentraci agarózy.

Byl používán 1,2% agarózový gel v 0,5 x TAE pufru (Tab. 14), do něhož byl po rozvaření přidán GelRed™ od firmy Biotium v ředění 5 µl na 100 ml. Po zchlazení byl gel nalit do forem s plastovými hřebeny. Po utužení gelu (cca 40 min) byl vložen do elektroforetické vany s 0,5 x TAE puftrem. Vzorky s DNA byly smíchány s nanášecí barvičkou (0,025% bromfenolová modř, 30% glycerol v 10mM Tris, pH 7,8) v poměru 5:1. Velikost napětí byla nastavena na 3 – 5V/ cm. Spolu se vzorky byl nanesen marker 1kb GeneRuler™ (firma Fermentas), díky němuž lze zjistit velikost a dopočítat koncentraci úseků DNA ve vzorku. Gely byly dokumentovány na UV transiluminátoru - G-box, od firmy Syngene. Použité programy - Gene Snap na obrazovou dokumentaci gelu a Gene Tools na výpočet koncentrací, oba od firmy Syngene.

Tab. 14 Složení 50x TAE pufru

Chemikálie	Množství na 1 l pufru
Tris - báze	242 g
kyselina octová (ledová)	57,1 ml
0,5M EDTA (pH 8,0)	100 ml
dH <sub>2</sub> O	doplněno do 1 l

## 3.6. Práce s RNA

### 3.6.1. Izolace RNA

Práce s RNA byla prováděna semi-sterilně s novými špičkami a v latexových rukavicích. Vše probíhalo na ledu a v chlazené centrifuze, aby se minimalizovala potenciální degradace RNA.

RNA byla izolována kyselým fenolem dle následujícího postupu (dle White a Kaper, 1989):

Byly připraveny sterilní třecí misky, které byly chlazeny na ledu (nebo 2ml mikrozkušavky se zámečkem se 2 kovovými kuličkami). Dále byl připraven 1x Extrakční pufr (EB, 600 µl na každý vzorek; Tab. 15 a Tab. 16) a 1,5ml mikrozkušavky pro každý vzorek s vychlazenými 600 µl fenolu (pH 4,3).

Tab. 15 Složení 1x Extrakčního pufru pro izolaci RNA

Chemikálie\ na celkový objem (ml)	5	10	15
Mili-Q sterilní voda	3,5	7	10,5
10x Extrakční pufr	0,5	1	1,5
10% SDS	1	2	3

Tab. 16 Složení 10x Extrakčního pufru, pH = 9,5 (upraveno NaOH)

Složky a jejich finální koncentrace	Množství na 100 ml
1M glycin	7,5 g
100mM EDTA	20 ml 0,5M EDTA (pH 8,0)
1M NaCl	20 ml 5M NaCl

Pufr byl chráněn před přímým světlem, skladován při pokojové teplotě.

Na začátku byly buď vzorky o hmotnosti 100 mg (pro *Arabidopsis* dokonce 10-15 mg) homogenizovány v tekutém dusíku v třecích miskách tloučkem a s přidáním EB (600 µl) přeneseny do připravených zkumavek s fenolem (vortex) nebo byly vzorky s kovovými kuličkami homogenizovány v homogenizátoru (Retsch MM301), poté byl rovněž přidán EB a vzorky byly smíchány s fenolem (vortex). Vzorky byly do poslední chvíle chlazeny v tekutém dusíku u obou postupů.

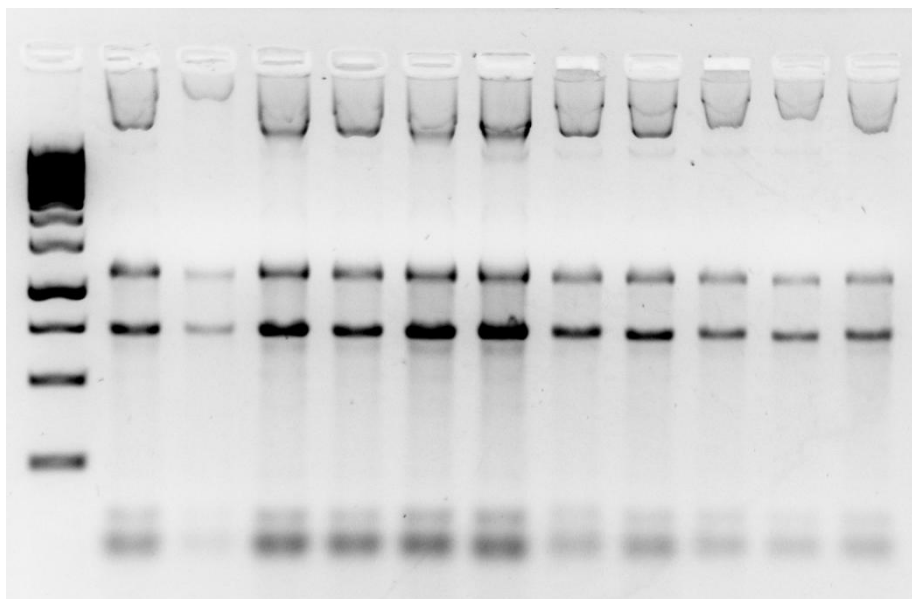
Mikrozkumavky se vzorkem a fenolem byly centrifugovány (5 min při 13 000 RMP, 4 °C, centrifuga Universal 32R Hettich). Mezitím byly připraveny nové 1,5 ml mikrozkumavky s 600 µl směsi fenol:chloroform:isoamylalkohol (25:24:1) pH 4,3. Po centrifugaci byla horní vrstva přenesena do těchto zkumavek (450 – 500 µl), po důkladném vortexování proběhla centrifugace (5 min při 13 000 RPM, 4 °C). Při centrifugaci byly připraveny nové 1,5ml mikrozkumavky na vzorek s vychlazeným 500 µl chloroform:isoamylalkoholem (24:1). Horní fáze (400 – 450 µl) byla po centrifugaci přenesena do zkumavek s chloroform:isoamylalkoholem, vzorky byly promíchány vortexem a proběhla centrifugace (5 min při 13 000 RPM, 4 °C). Dále byla horní fáze přenesena do nových mikrozkumavek (300 – 350 µl) a bylo přidáno 20 µl (1/20 objemu) 3M Na-Acetátu (pH 5,2) a 1 ml (2,5 objemu) vymraženého 96% EtOH, zkumavky byly několikrát opatrně převráceny. Po tomto kroku byly vzorky buď umístěny na 30 min na led, nebo zamrazeny na -80 °C a skladovány do druhého dne. Poté proběhla centrifugace (20 min při 13 000 RPM, 4 °C).

Horní fáze byla vylita a k peletu bylo přidáno 500  $\mu$ l vymraženého 70% EtOH, proběhla krátká centrifugace (3 min při 13 000 RPM, 4 °C), tento krok byl proveden dvakrát. Po poslední centrifugaci byl EtOH vylit a zbytky byly odstraněny pipetou. Pelety byly dále sušeny ve speedvacu, Concentrator plus, od firmy Eppendorf (cca 8 min). Poté byla peleta v každé zkumavce rozpuštěna v 20 – 30  $\mu$ l mili-Q sterilní vody.

Následně byla změřena koncentrace izolované RNA na nanodropu (NanoDrop 2000 Spectrophotometer, ThermoScientific, software NanoDrop2000 ver. 1.5) a zkontrolována kvalita RNA na elektroforéze. Touto metodou je možné izolovat ze 100 mg rostlinného materiálu (buněk BY-2 i *Arabidopsis*) výtěžky v rozmezí 250 – 1500 ng/ $\mu$ l.

### 3.6.2. Agarózová gelová elektroforéza (RNA)

Pracovní materiál, který měl přijít do styku s RNA, byl omyt jarovou a poté destilovanou vodou (misky na gel, hřeben, vana). Byl připraven 1,2% agarózový gel v 0,5 x TBE pufru (Tab. 17), po rozvaření byl přidán GelRed™ od firmy Biotium v koncentraci 10  $\mu$ l na 100 ml. Vzorky byly smíchány se 2  $\mu$ l barvičky FDE (Tab. 18) na 2  $\mu$ l vzorku, proběhla inkubace nejprve 10 min při 65 °C, poté byly vzorky rychle přeneseny na led na 2 min. Dále byly vzorky nanесeny na elektroforézu a byl puštěn zdroj stejnosměrného proudu. Byl použitý marker 1 kb GeneRuler™ (firma Fermentas). Příklad kontroly čistoty a integrity RNA je na Obr. 6.



Obr. 6 Příklad kontroly čistoty a integrity RNA na agarózovém gelu

Tab. 17 Složení 5xTBE pufru

Chemikálie	Množství na 1l
TRIS báze	54 g
kyselina boritá	27, 5 g
0,5M EDTA (pH 8.0)	20 ml

Tab. 18 Složení FDE

Chemikálie	Množství na 10 ml
deionisovaný formamid	10 ml
0,5M EDTA (pH 8.0)	200 $\mu$ l
xylene cyanol FF	10 mg
bromfenolová modř	10 mg

### 3.7. Práce s proteiny

#### 3.7.1. Izolace proteinů z BY-2

Izolace byla provedena ze 100 - 200 mg narostlé suspenze BY-2, vzorek byl rozdrcen v třecí misce v tekutém dusíku a ve zmrzlém stavu přenesen do mikrozkušavky s 300  $\mu$ l extrakčního pufru s inhibitory proteáz (SIGMA, 9599, ředěné 1:100; Tab. 19) + přidáváno PMSF do finální koncentrace 1 mM. Proběhla centrifugace vzorků 15 min, 4000 RPM, při 4°C. Supernatant s proteiny byl přenesen do nové mikrozkušavky, proběhla další centrifugace 1 h, 13 000 RPM, při 4°C. Byly vytvořeny alikvoty supernatantu po 50  $\mu$ l s 2x vzorkovým pufrům s močovinou (1:1; Tab. 20). Proteiny nebyly skladovány, ale ihned použity na proteinovou elektroforézu.

Tab. 19 Složení extrakčního pufru

Chemikálie	koncentrace
MES	50mM
EGTA	10mM
Glycerol	2M
MgCl <sub>2</sub>	10mM

Tab. 20 Složení 2x vzorkového pufru s močovinou

Chemikálie	koncentrace	na 50 ml
glycerol	20 %	10 ml 50%, 5 ml 100%
$\beta$ -mercaptoethanol	10 %	5 ml
SDS	2 %	10 ml 10%
Tris-HCl pH 6,8	20 mM	500 $\mu$ l 2 M
močovina	8 M	24 g
BPB	0,005 %	0,0025 g

### 3.7.2. Proteinová elektroforéza

#### Příprava elektroforézy

Skla na elektroforézu byla umyta EtOH, bylo přiloženo těsnění na jedno ze skel a přiklopeno druhé sklo. Skla byla spojena svorkami a postavena do velké Petriho misky. Byl připraven roztok dělicího a zaostřovacího gelu (Tab. 21) a postupně nanесeny mezi skla (dělicí tuhne 45 minut, zaostřovací 30 minut). Dělicí gel byl po nalití opatrně převrstven destilovanou vodou – polymerace je blokována kyslíkem, po utužení byla voda slita, poté byl nalit zaostřovací gel, do kterého byl vložen hřeben vyčištěný EtOH.

Tab. 21 Složení gelů na proteinovou elektroforézu (množství na 1 velký/2 malé gely).

10% dělicí gel	Množství	4% zaostřovací gel	Množství
roztok monomerů	4 ml	roztok monomerů	0,7 ml
1,5M Tris pH 8,8	3 ml	0,5M Tris pH 6,8	1,25 ml
H <sub>2</sub> O	4,8 ml	H <sub>2</sub> O	3 ml
10% SDS	120 $\mu$ l	10% SDS	50 $\mu$ l
40 % AP	15 $\mu$ l	40% AP	10 $\mu$ l
TEMED	4 $\mu$ l	TEMED	2,5 $\mu$ l

Jednotlivé složky byly napipetovat do 50 ml falkony v uvedeném pořadí a promíchány jemným převrácením. Falkony byly po nalití gelu zlikvidovány i se zbytkem polymerovaného gelu.

#### Zásobní roztoky

Roztok monomerů: acrylamide/bis-acrylamide, SIGMA

1,5 M Tris: 36,3 g Tris, destilovaná voda do 200 ml, pH = 8,8 s HCl,

0,5 M Tris: 3,0 g Tris, destilovaná voda do 50 ml, pH = 6,8 s HCl

Tris pufrы skladovány v lednici ve 4 °C.

40% AP: 0,4 g ammoniumpersulfátu, H<sub>2</sub>O do 1 ml, skladováno po alikvotech v mrazáku.

Elektroforetický pufr (0,025 M Tris-báze, 0,192 M glycin, 0,1% SDS) – skladováno při laboratorní teplotě.

#### Průběh elektroforézy

Spodní komora elektroforézy byla naplněna elektroforetickým pufrem, gely byly upevněny do elektroforetické komory a pufrem byl naplněn i horní rezervoár. Jako marker byl použit - Page Ruler Prestained Protein SM0675, 5  $\mu$ l. Před nanesením vzorků byly jamky propláchnuty pipetou s dlouhou špičkou. Po nanesení vzorků byla spuštěna elektroforéza, případně k velké elektroforéze bylo zapnuto i chlazení. Malá elektroforéza: 100V a 25mA/gel, běží 1,5-2 hodiny. Velká elektroforéza: 220V, 40mA/gel, běží 2 – 2,5 hodiny.

#### *3.7.3. Western blot*

Bylo připraveno 6 filtračních papírů (Watman) velikosti gelu a membrána o stejné velikosti (SERVA Fluorobind membrane, 0,2  $\mu$ m, 42571). Papíry byly namočený v transferovém pufru a membrána aktivována na hladině metanolu. Na blotovací zařízení byly nejprve položeny tři papíry, na které se dala membrána, na ní gel a nakonec zbylé tři papíry. Vše bylo polito transferovým pufrem a válením skleněné tyčinky byly vytlačeny bubliny. Blotovací zařízení bylo zapnuto na 300 V, 300 mA, 10 W, 1 hodinu a zatíženo. Membrána byla pak ihned blokována v pufru s mlékem.

Transferový pufr (1l): 14,4 g glycin, 12,1 g Tris báze, 200 ml MetOH

#### *3.7.4. Imunodetekce*

Nejprve proběhlo blokování membrány (s proteiny nahoře) v 1x TBS pufru s mlékem (1 hodina při laboratorní teplotě na kývačce v uzavřené krabici) – 1x TBS + 4% mléko (1,3 % tuku, rozpuštěno předem a přefiltrováno přes filtrační papír).

Poté byla přidána primární protilátka (králíčí ARPC2A – polyklonální protilátka, v rámci disertační práce Havelková, 2010): v 1x TBS pufru s 0,5% mlékem (inkubace 1 hodina při laboratorní teplotě na kývačce). Blot byl následně promyt 3 x 10 minut v 1x TBS na kývačce (odstranění nespecificky navázaných primárních protilátek).

Byla přidána sekundární protilátka (ENZO goat anti rabbit – IgG polyklonální protilátka) v 1x TBS pufru s 0,5% mlékem, inkubována jednu hodinu při laboratorní teplotě na kývačce. Nakonec byl blot promyt 3 x 10 minut v 1x TBS pufru.

TBS pufr: 20mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, (+ na promývání 1% Triton X-100/0,3% Tween 20), pH 7,4

### *3.7.5. Chemiluminiscentní detekce (ECL Systém)*

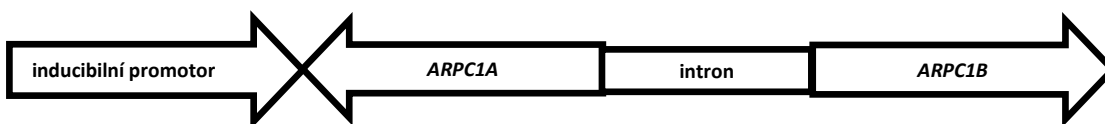
ECL systém byl použit pro detekci sekundární protilátky konjugované s křenovou peroxidázou, která s dodaným substrátem vytváří luminiscenci. Vše bylo prováděno ve fotokomoře za tmy, případně s červeným světlem. Na sklo byl napipetován 1 ml reakční směsi 1, poté 1 ml reakční směsi 2, promícháno špičkou (Pierce ECL Western Blotting Substrate). Membrána byla ponořena stranou s proteiny do reakční směsi na skle a inkubována 1 minutu. Poté byla membrána vložena do kazety mezi folii, na membránu ve folii byl přiložen film. Kazeta s filmem byla zavřena a inkubována nejprve tři minuty. Po expozici byl film ponořen do vývojky (dokud nebyly znatelné obrysy blotu), poté byl film promyt ve vodě a potom v ustalovači (cca 1 min). Film byl opláchnut ve vodě a usušen. Délka expozice byla upravena dle potřeby.

## 4. Výsledky

### 4.1. Studium snížení exprese ARPC1 podjednotky u *Arabidopsis thaliana*

#### 4.1.1. Tvorba umlčujícího konstruktů IR-C1

Pro indukci umlčení byl vytvořen konstrukt IR-C1, s invertovanou repeticí a vloženým intronem uprostřed. Schéma konstruktů je na Obr. 7, skládá se ze dvou sekvencí ARPC1A a ARPC1B v opačné orientaci, tyto sekvence jsou od sebe odděleny intronem. Díky vloženému intronu se zvyšuje účinnost umlčení (Smith et al. 2000). Vektorem tohoto konstruktů byl plazmid pER8.



Obr. 7 Schématický náčrt inducibilního vlásenkového konstruktů IR-C1 pro umlčování genu ARPC1

Nejprve byly pomocí PCR z cDNA z *Arabidopsis thaliana* připraveny dvě sekvence (délka cca 500 nukleotidů) – ARPC1A a ARPC1B, které byly vloženy do plazmidu pDrive. Byly navrženy primery ARPC1 R1/F1 a R2/F2. Dále proběhla PCR s primery ARPC1 R1 a ARPC1 F1 pro získání sekvence ARPC1A a druhá reakce s primery ARPC1 R2 a ARPC1 F2 pro sekvenci ARPC1B. Získané PCR produkty byly ověřeny na agaróзовé elektroforéze, izolovány z gelu a zaligována do vektoru pDrive. Takto vzniklé plazmidy byly poté vneseny do *E. coli* pomocí elektroporace. Narostlé kolonie *E. coli* byly „rozčárkovány“ a ověřeny pomocí PCR (otestováno 40 vzorků). Z pozitivních vzorků (vzorky obsahující sekvenci ARPC1A či B) byla izolována plasmidová DNA, která byla ověřena restričním štěpením pomocí EcoRI a sekvenací. Plazmidy byly označeny jako pDrive-ARPC1A a pDrive-ARPC1B.

Plazmid pDrive s vloženým intronem poskytl Vojtěch Čermák. Intron pochází z genu mangan stabilizujícího proteinu (MSP) ze *Solanum tuberosum*. U bakteriálních klonů *E. coli* (obsahujících plazmid pDrive s intronem) byla ověřena přítomnost tohoto plazmidu pomocí PCR s primery M13F a MSPi R. Tento plazmid byl označen jako pDrive-MSPi.

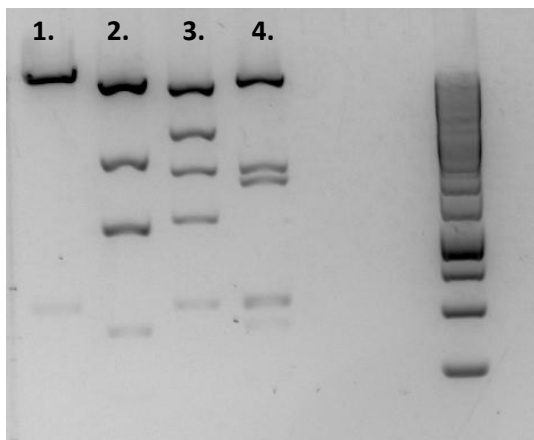
Dalším krokem v tvorbě konstruktů bylo štěpení a ligace připravených sekvencí v pDrive plazmidu. Nejprve byl štěpen plazmid pDrive-ARPC1B (enzymy Hind III a Xho I) a pDrive-MSPi (enzymy Hind III a Xho I). Po restrikci byly fragmenty rozděleny na elektroforéze a následně byly vyizolovány z gelu. Proběhla ligace fragmentu s ARPC1B do linearizovaného vektoru s intronovou sekvencí a produkt byl elektroporován do *E. coli*. Ověření u bakteriálních klonů proběhlo pomocí



PCR s primery *ARPC1 F2/R2*. Další ověření proběhlo pomocí restrikce enzymy *Hind III* a *Xho I*. Při prvním ověřování nebyl nalezen plazmid s vloženým konstruktem, ligace byla proto provedena znovu (znovu byly ověřeny i jednotlivé sekvence vložené do plazmidu). Po druhé ligaci a elektroporaci byl tentokrát u bakteriálních klonů nalezen správný produkt – zaligovaný konstrukt *ARPC1B* s intronovou sekvencí. Tento plazmid byl označen jako *pDrive - MSPi-ARPC2B*.

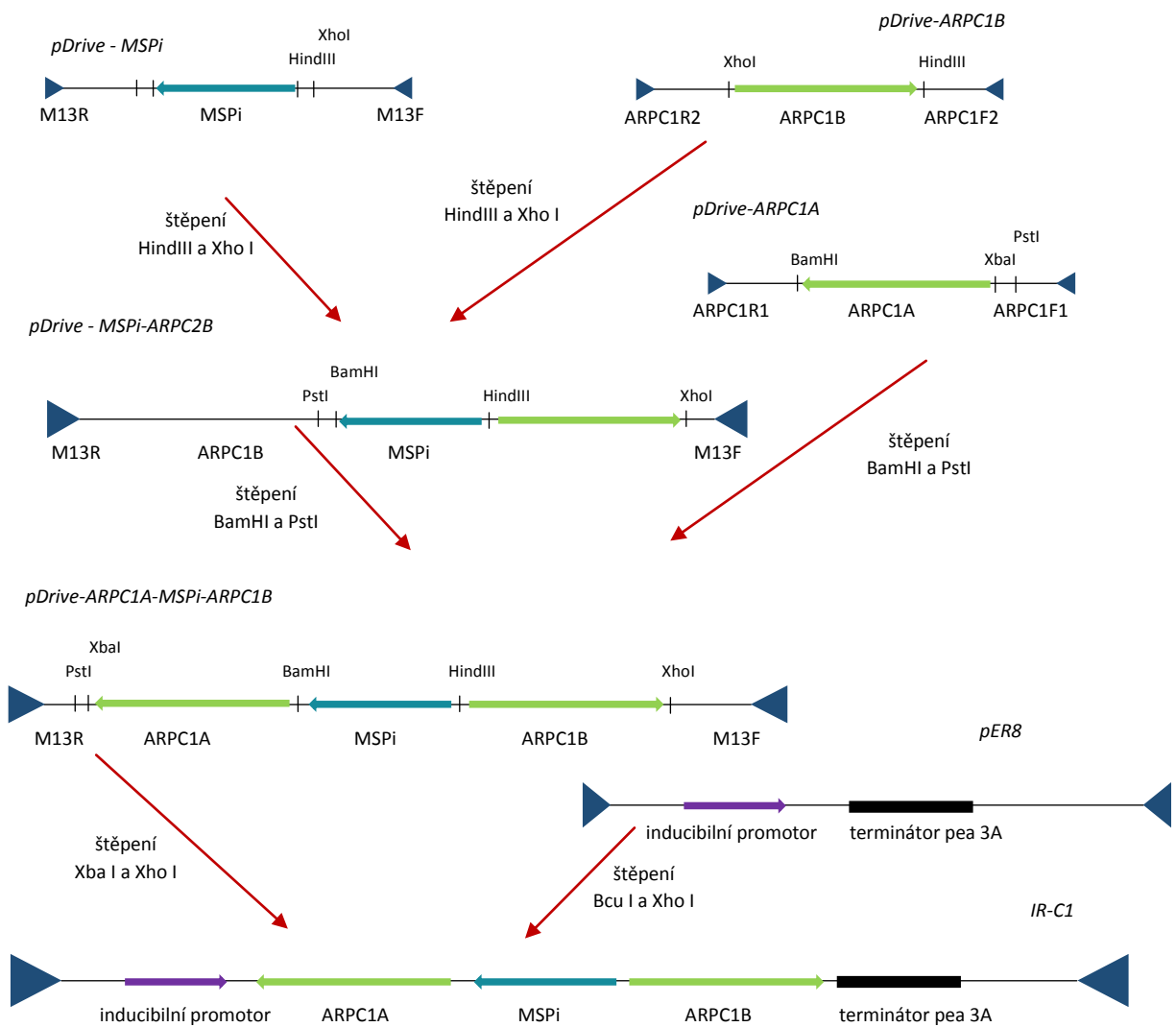
Plazmid *pDrive - MSPi-ARPC2B* a plazmid *pDrive-ARPC1A* byly naštepeny; plazmid *pDrive-MSPi-ARPC2B* byl štěpen enzymy *BamHI* a *PstI*, vzniklý produkt byl rozdělen elektroforézou na agarózovém gelu, fragment byl z gelu vyříznut a vyzolován. Podobně tak plazmid *pDrive-ARPC1A* byl naštěpen *BamH I* a *Pst I*, produkt oddělen a vyzolován. Proběhla ligace fragmentu se sekvencí *ARPC1A* do vektorového plazmidu obsahujícího sekvenci *ARPC1B* a intron. Ligační směs byla poté odsolena a elektroporována do bakterií *E. coli*. Z bakteriálních klonů byla ověřena správnost ligace pomocí PCR s použitím primerů *ARPC1 R1 a R2*. Další ověření proběhlo pomocí restrikce a sekvenace izolovaného plazmidu. Tento plazmid byl označen jako *pDrive-ARPC1A-MSPi-ARPC1B*.

Finálním krokem tvorby konstruktů *IR-C1* bylo zaligování sekvence z *pDrive* plazmidu do plazmidu *pER8*. Plazmid *pDrive-ARPC1A-MSPi-ARPC1B* byl štěpen restrikčními enzymy (*Xba I* a *Xho I*) pro vyštěpení celé vložené sekvence a plazmid *pER8* (vektor) štěpen enzymy – *Bcu I* a *Xho I*. Fragmenty vzniklé štěpením byly rozděleny na agarózovém gelu, následně byly fragmenty vyzolovány. Proběhla ligace obou fragmentů a elektroporace do bakterií. Z vybraných klonů byl plazmid vyzolován, ověření proběhlo pomocí čtyř reakcí s restrikčními enzymy. V první reakci to byly enzymy *Sal I* a *Xho I*, v druhé *EcoR I*, ve třetí *BamH I* a *Pvu II* a ve čtvrté *BamH I* a *Sal I* (viz Obr. 8). Díky tomuto komplexnímu ověření pomocí řady štěpení nebylo nutné ověřovat vložený konstrukt sekvenováním. Tento konstrukt byl finálním produktem, který byl dále použit



k transformaci rostlin *Arabidopsis thaliana* a byl označen jako *IR-C1*. Schéma vytvoření celého konstruktů je na Obr. 9.

Obr. 8 Ověření finálního produktu na elektroforéze pomocí čtyř štěpení – (v sloupci 1.) enzymy *Sal I* a *Xho I*, (2.) *EcoR I*, (3.) *BamH I* a *Pvu II* a (4.) *BamH I* a *Sal I*.



Obr. 9 Schéma vytvoření konstruktů *IR-C1*

#### 4.1.2. Transformace a selekce

K transformaci *Agrobacterium tumefaciens* byl použit vytvořený plazmid *pER8* s vneseným konstruktům *IR-C1*. Plazmid byl vnesen do *Agrobacterium* elektroporací (viz kap. 3.4.3), buňky byly po elektroporaci vysety na pevné médium LB s antibiotiky (rifampicin, spectinomycin a gentamycin). Transformace rostlin *Arabidopsis thaliana* proběhla dle protokolu, metodou floral dip, popsanou v kap. 3.4.4. konstruktům *IR-C1*. Přehled genotypů transformovaných linií je v Tab. 22.

Semena transformovaných rostlin (T1 generace) byla selektována pomocí selekčního antibiotika *in vitro* na čtvercových Petriho miskách 12x12 cm s ½ MS médiem a hygromycinem (100 µl/na 100 ml), po cca dvou až třech týdnech byly semenáčky vyjmuty a přesazeny do rašelinových pelet Jiffy a dopěstovány do dospělosti, v kultivační místnosti (16/8 hod světlo/tma, při 24°C). Z těchto rostlin byla poté sklizena semena T2 generace, která by měla za přítomnosti jedné kopie T-DNA štěpit v poměru – 1 WT: 2 heterozygot: 1 homozygot.

Selekce homo- a heterozygotů v T2 generaci probíhala stejně jako u T1 generace antibiotikem hygromycinem. Vznikla tak směs heterozygotních a homozygotních rostlin resistantních na hygromycin (u markerových linií i na kanamycin). Počty transformovaných a vyselektovaných rostlin jsou v Tab. 22.

Tab. 22 Přehled transformovaných genotypů a počet (*super*)transformovaných linií v T1

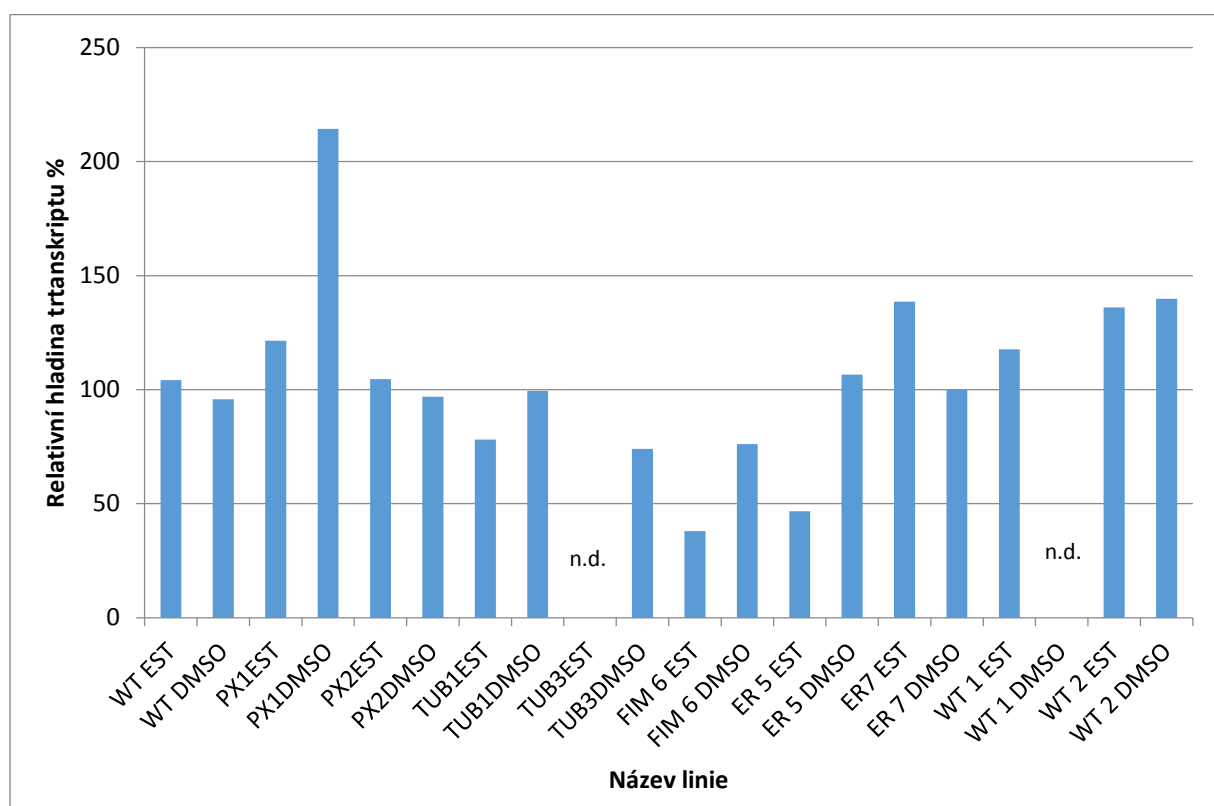
Název linie (genotyp)	Zkratka	Počet transformovaných rostlin (T0)	Počet vyselektovaných rostlin T1 generace
Linie se značenými peroxizómy	PX	2	10
Linie se značeným tubulinem	(GFP) TUB	2	13
Linie se značeným fimbrinem	(GFP) FIM	2	6
Linie se značeným fimbrinem	mCh FABD	1	4
Linie se značeným endopl. retikulem	ER-RK	2	5
WT linie	WT	2	2

Pro selekci umlčujících rostlin dle fenotypu zkroucených trichomů, který se projevuje u všech popsaných mutantů v ARP2/3 komplexu u *Arabidopsis thaliana*, byla T2 generace semen různých linií vyseta na plotny s hygromycinem a estradiolem pro indukci RNAi proti ARPC1. Jako kontrola byly použity plotny s hygromycinem a DMSO. Byly pozorovány trichomy na prvních pravých listech (2-3 týdny). V případě fenotypu zkroucených trichomů by bylo možné přímo vyselektovat rostliny, které mají umlčenou ARPC1 podjednotku.

Šlo o potomstvo celkem deseti rostlin ze čtyř různých genotypů – PEX, mCh FABD, GFP FIM a GFP TUB – vždy cca 15 semen na misku od každé rostliny. Jako negativní kontrola (bez poškozených trichomů) byla použita varianta na DMSO a WT-Col-0, pro pozitivní kontrolu byla vyseta semena mutantů *arpc5* (se zkroucenými trichomy), rostliny byly pěstovány na médiu bez antibiotik. Žádné poškozené trichomy ale nebyly pozorovány. Byla tedy provedena analýza hladiny transkriptu *ARPC1* podjednotky.

#### 4.1.3. Analýza exprese transkriptu *ARPC1*

Hladina transkriptu *ARPC1* byla sledována pomocí metody semikvantitativní RT-PCR. Nejprve byla ze vzorků (týdenních semenáčků *Arabidopsis thaliana*) izolována RNA. Rostliny byly vysety *in vitro* na plotny s hygromycinem a estradiolem či DMSO. Jako kontrola byla použita linie WT-Col-0 (estradiol/DMSO), tato linie byla vyseta na médium bez antibiotik. U izolované RNA byla zkontrolována její integrita (elektroforéza) a stanovena koncentrace RNA (nanodrop). Do reakce pro syntézu cDNA byl přidán 1  $\mu$ g RNA. Proběhlo odstranění DNA ze vzorků a následovala reverzní transkripce. Vznikla tedy cDNA, se kterou byla provedena PCR s primery *ARPC1 R1/F1* a jako kontrola primery *EFat R1/F1* (viz Graf 1).



Graf 1.: Relativní hladiny transkriptu *ARPC1* u transformovaných rostlin vysetých na médium s estradiolem a DMSO. Hladiny transkriptu *ARPC1* vztaheny na interní standard *EF1a* a poté na průměr hladin transkriptu u WT linie pěstované na EST a DMSO, n.d. – data se nepodařilo získat.

Nejlépe umlčujícími liniemi (na cca 40% vůči WT rostlinám) byly FIM 6 a ER 5. U linií TUB 3 EST a WT 1 DMSO se z technických důvodů nepodařilo získat data. U nejlépe umlčujících linií byla znovu provedena analýza trichomů na prvních pravých listech se stejnými kontrolami, jako bylo uvedeno dříve.

Na Obr. 10 jsou vidět trichomy u WT (A), poškozené trichomy u mutanta *arpC5* (B), trichomy u linie FIM6 - rostliny pěstované na indukčním médiu s estradiolem (C) a linie ER5 – také na estradiolu (D). Trichomy byly zdokumentovány na rostlinách *Arabidopsis thaliana* po dvou až třech týdnech od vysetí na prvních pravých listech.

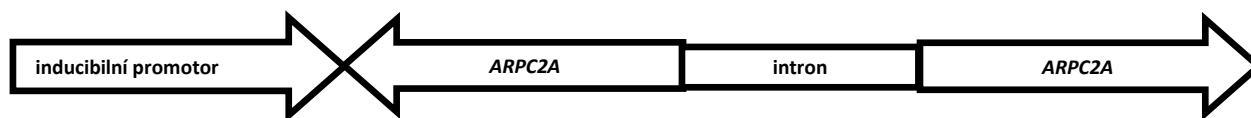


Obr. 10 Trichomy na prvních pravých listech *Arabidopsis thaliana*, (A) WT, (B) *arpC5*, (C) FIM 6, (D) ER 5.

## 4.2. Výsledky BY-2

### 4.2.1. Tvorba umlčujícího konstruktů IR-C2

Pro transformaci byl použit konstrukt *IR-C2A* připravený dr. Lenkou Sikorovou a dr. Lukášem Fischerem (Obr. 11).



Obr. 11 Schématický náčrt indukibilního vlásenkového konstruktů *IR-C2* pro umlčování genu *ARPC2A*.

### 4.2.2. Transformace a selekce

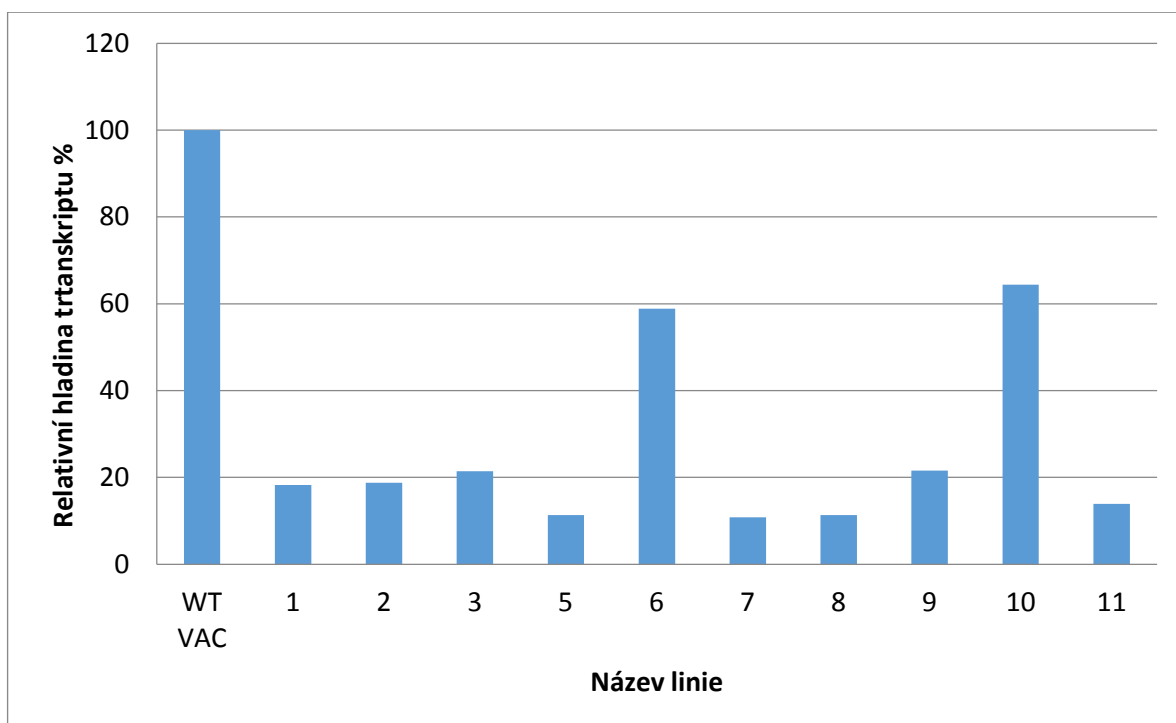
Transformace všech linií (WT, Golgi, VAC, FIM) konstruktem *IR-C2* probíhala nejprve podle běžně používaného Protokolu1, protože se však transformace opakovaně nedařila, bylo nutné protokol upravit. Po konzultaci s RNDr. Miroslav Srba, Ph.D., byl pro další transformace použit jeho upravený Protokol2, který podporoval růst kalusů. Transformované linie charakterizované v další práci, vznikly při použití zkráceného třídenního Protokolu2, kterým bylo získáno okolo 50 kalusů od každé transformované linie.

### 4.2.3. Analýza míry umlčení

Na analýzu míry umlčení byly sklizeny vzorky (transformované *IR-C2A* konstruktem, kalusy sedm dní po pasáži/ suspenze po třech dnech po pasáži) a kontrola WT příslušná k dané linii (kalusy sklizené sedm dní po pasáži / suspenze po třech dnech po pasáži), bylo sklizeno vždy po 0,1g vzorku. Hladina transkriptu *ARPC2A* byla sledována pomocí metody semikvantitativní RT-PCR. Nejprve byla ze vzorků (kalusy/suspenze) izolována RNA. U izolované RNA byla zkontrolována její integrita (elektroforéza) a stanovena koncentrace RNA (nanodrop). Dle naměřené koncentrace byla pak do dalších reakcí přidána RNA tak, aby do reakce byl přidán vždy 1  $\mu$ g RNA. Proběhlo odstranění DNA ze vzorků a následovala reverzní transkripce. Vznikla tedy cDNA, se kterou byla provedena PCR s primery *ARPC2A R1/F1* a pro kontrolu koncentrace izolovaných vzorků PCR s primery *EF R1/F1* nebo *AKTIN R1/F1*.

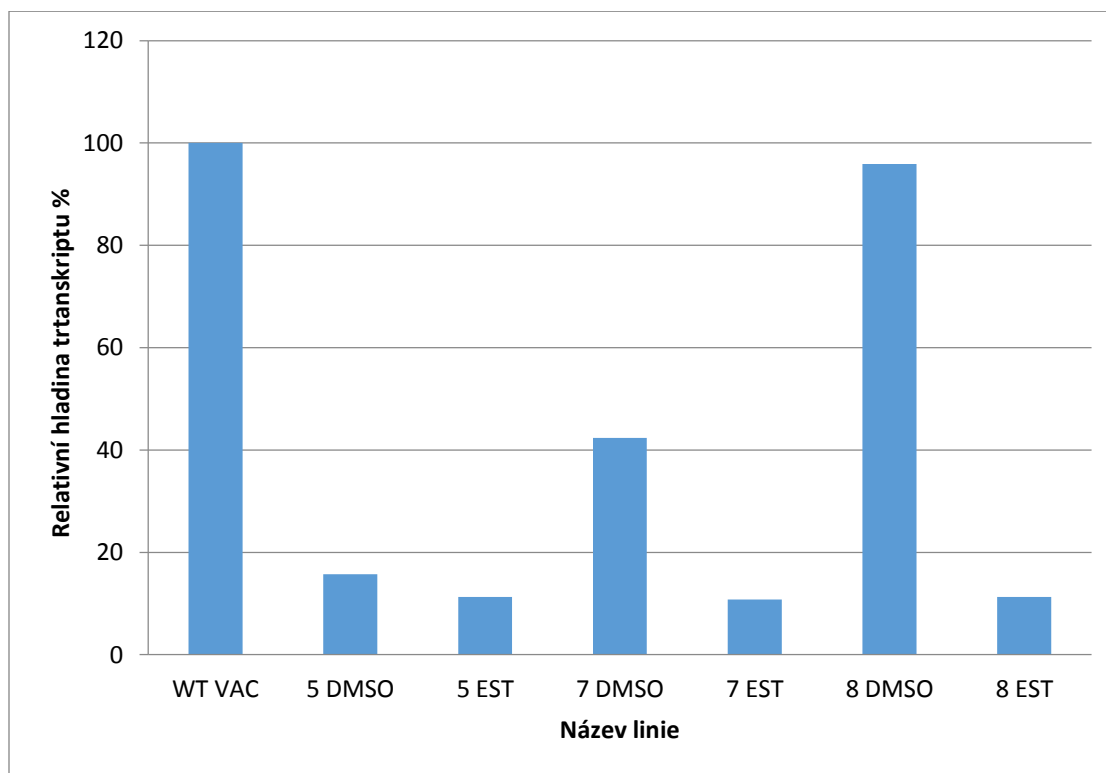
#### 4.2.3.1. Linie se značenými vakuolami

Nejprve byla izolována RNA z deseti vzorků pěstovaných na estradiolu, jako kontrola byla použita linie WT VAC na estradiolu (Graf 2), u linií s nejnižší hladinou transkriptu oproti WT VAC byla izolována RNA i z linií pěstovaných na DMSO (Graf 3). Nejlépe umlčující či stabilně umlčené linie byly poté převedeny do suspenzí, u kterých byla znova provedena analýza hladiny ARPC2A jak na estradiolu, tak s DMSO (Graf 4). Odběr vzorků ze suspenzí probíhal na tří denních buňkách, estradiol/DMSO přidány v čase 0, tj. v den pasáže do nové 100ml Erlenmeyerovy baňky. Pro RT-PCR byly použity primery *EF R1/F1* a *ARPC2A R1/F1*.



Graf 2 Relativní hladiny transkriptu ARPC2A kalusů pěstovaných na médiu s estradiolem. Hladiny transkriptu ARPC2A vztaženy na interní standard a poté na hladinu transkriptu u WT VAC linie pěstované na EST.

Z těchto linií pěstovaných na estradiolu byly vybrány linie 5, 7 a 8 jako nejlépe umlčující. Většina vzorků (mimo 6, 10) umlčuje na 30% a méně oproti WT VAC. Pro vzorky 5, 7 a 8 byla dále stanovena hladina transkriptu ARPC2A u linií pěstovaných na DMSO.

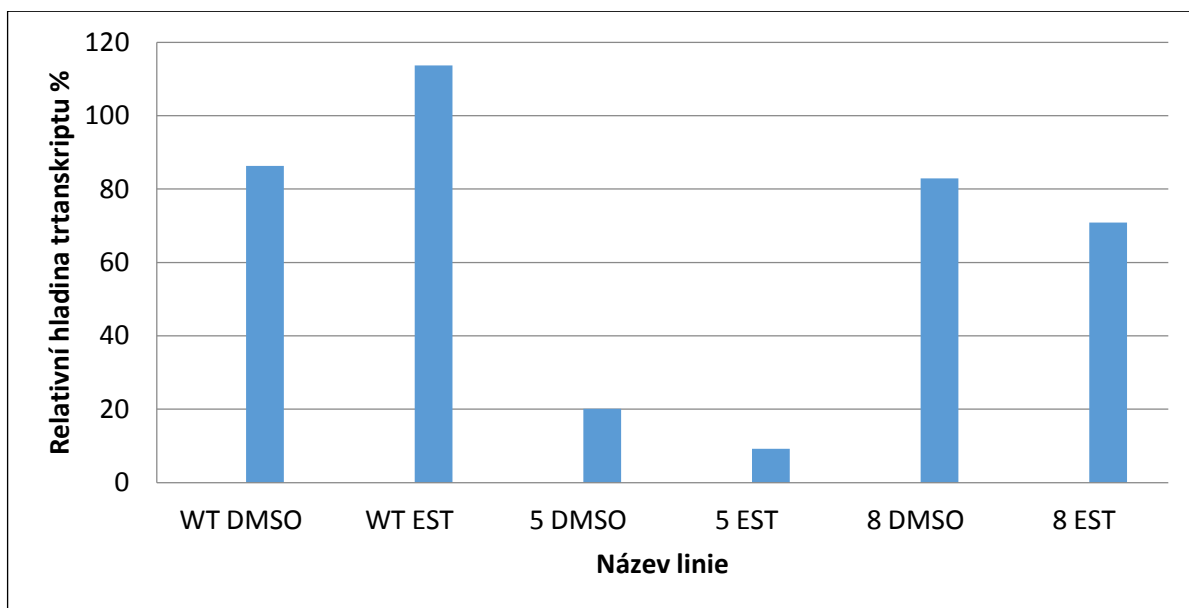


Graf 3 Relativní hladiny transkriptu ARPC2A u kalusů pěstovaných na médiu s estradiolem a médiu bez indukce (s DMSO). Hladiny transkriptu ARPC2A vztaheny na WT VAC linie pěstované na EST.

Při porovnání hladiny transkriptu u vzorků pěstovaných na DMSO (bez indukce umlčení) vyšla, jako nejlépe umlčující linie č. 8, relativní hladina transkriptu je na DMSO přibližně stejná jako u WT VAC. U vzorků 7 a 5 zřejmě dochází k samovolnému umlčení i bez aplikace estradiolu - u linie č. 5 je hladina transkriptu na estradiolu a DMSO zcela srovnatelná, oproti WT nižší cca šestinásobně.

Pro další práci byly vybrány - vzorek 5 umlčující nezávisle na přidání estradiolu a vzorek 8 umlčující na nejnižší hladinu po přidání estradiolu vůči variantě na DMSO. Tyto linie byly převedeny do suspenzí a pěstované jak na estradiolu, tak na DMSO. Pro kontrolu byla opět přiřazena WT VAC suspenze.



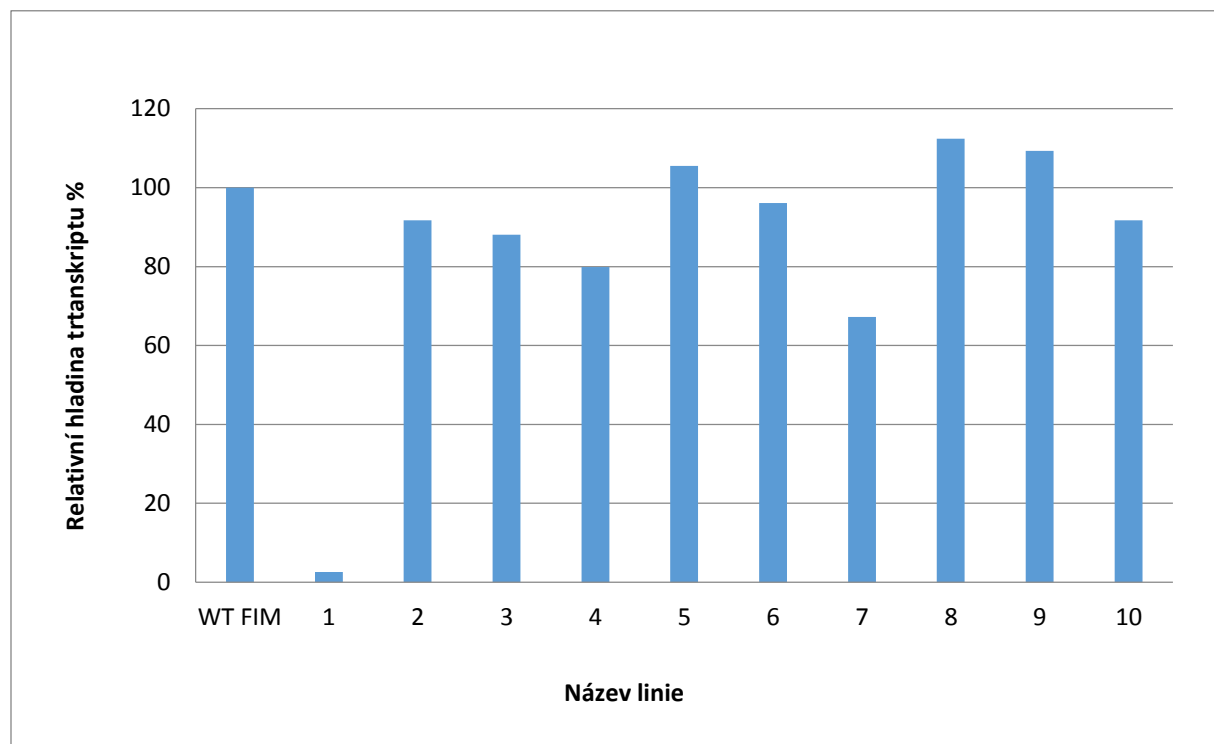


*Graf 4 Relativní hladiny transkriptu ARPC2A 3denních suspenzí pěstovaných na médium s estradiolem a DMSO. Hladiny transkriptu ARPC2A vztaženy na interní standard a poté na průměr hladin transkriptu u WT VAC linie pěstované na EST a DMSO.*

U linie 5 v suspenzi setrvale docházelo k samovolnému umlčování, které se možná ještě prohloubilo při aplikaci estradiolu. Linie 8 bohužel ve formě suspenzí přestala reagovat na estradiol, tak jak bylo pozorované na kalusech. Hodnoty jsou  $\pm$  stejné jako WT VAC, tedy bez umlčení.

#### 4.2.3.2. Linie se značeným fimbrinem

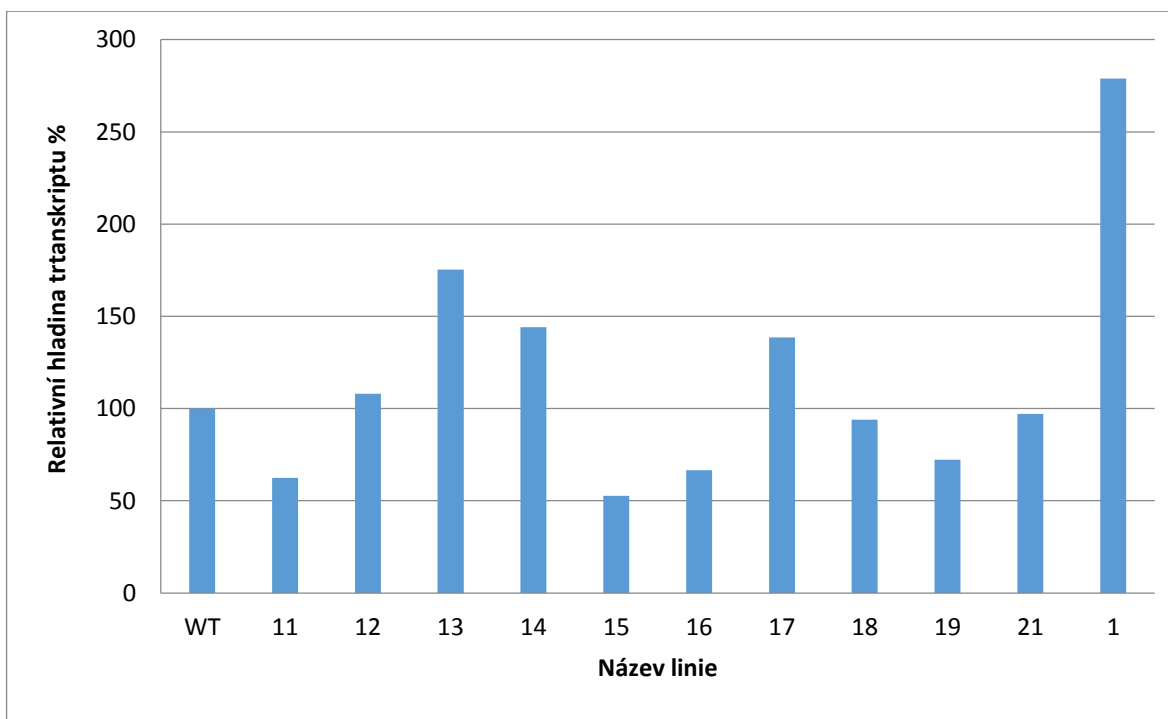
Nejprve byla izolovaná RNA z deseti vzorků pěstovaných na estradiolu, jako kontrola byla použita linie WT FIM na estradiolu (Graf 5). Protože nebyla u prvních deseti vzorků nalezena linie, která by výrazněji umlčovala, byla izolace provedena na dalších vzorcích (Graf 6). K liniím s nejnižší hladinou transkriptu oproti WT FIM byla izolována RNA a zjištěna hladina transkriptu i u linií pěstovaných na DMSO (Graf 7). Byly použité primery *EF R1/F1* a *ARPC2A R1/F1*.



Graf 5 Relativní hladiny transkriptu *ARPC2A* kalusů pěstovaných na médiu s estradiolem. Hladiny transkriptu *ARPC2A* vztaženy na interní standard a poté na hladinu transkriptu u WT FIM linie pěstované na EST.

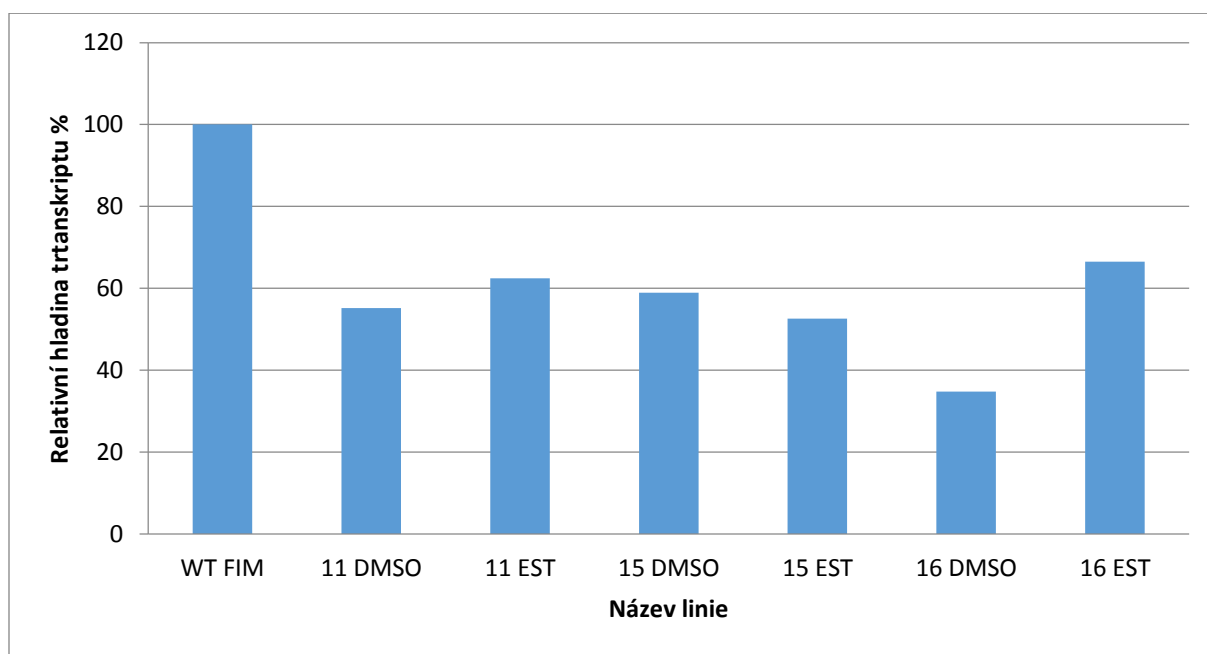
Mimo vzorku č. 1 nevykazují linie výrazné umlčení oproti WT. Oproti liniím se značenými vakuolami je trend umlčování značně odlišný – většina vzorků má podobné hladiny transkriptu jako WT, tedy je bez umlčení.

S linií 1 byla analýza hladiny transkriptu zopakována (RNA nebyla znovu izolována, pouze DNazována a reverzně transkribována na cDNA). Dále byla provedena analýza hladiny transkriptu *ARPC2A* u dalších deseti fimbrinových linií pěstovaných na estradiolu.



*Graf 6 Relativní hladiny transkriptu ARPC2A kalusů pěstovaných na médium s estradiolem. Hladiny transkriptu ARPC2A vztaheny na interní standard a poté na hladinu transkriptu u WT FIM linie pěstované na EST.*

Ani při analýze dalších deseti vzorků linie se značeným fimbrinem nebyla nalezena žádná, která by umlčovala pod 50 %. Nejlépe umlčující byly linie č. 11, 15 a 16. K těmto vzorkům byla izolována RNA z linií pěstovaných na DMSO. Hodnota u linie 1 byla velmi odlišná od předchozího měření, zřejmě chybou v předchozí analýze transkriptu.

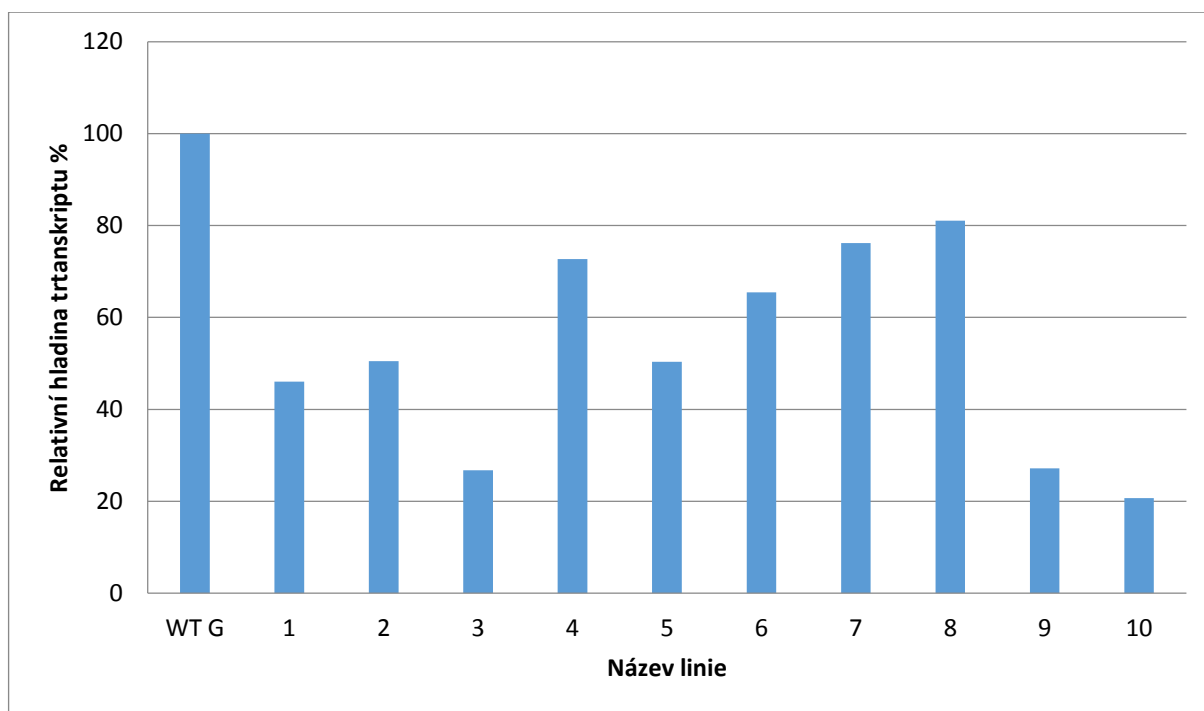


*Graf 7 Relativní hladiny transkriptu ARPC2A kalusů pěstovaných na médiu s estradiolem a DMSO. Hladiny transkriptu ARPC2A vztaženy na hladinu transkriptu u WT FIM linie pěstované na EST.*

Při porovnání dat z linií 11, 15, 16, pěstovaných na estradiolu a DMSO, není vidět výrazný pokles u linií na estradiolu vůči DMSO. Oproti WT hodnotám jsou tyto hodnoty sníženy pouze na cca 60% (i na DMSO). U linií se značeným fimbrinem tedy nebylo pozorováno žádné výrazné umlčení ani v jednom z 20 analyzovaných vzorků.

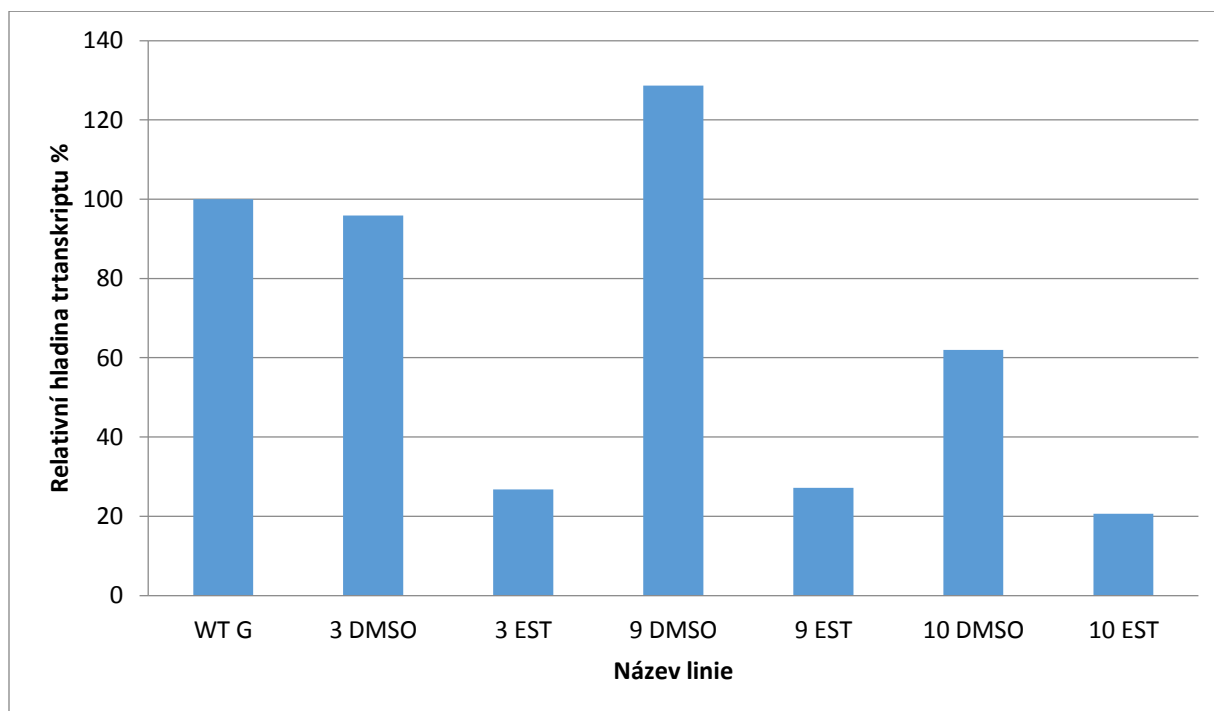
#### 4.2.3.3. Linie se značeným Golgiho komplexem

Nejprve byla izolovaná RNA z deseti vzorků pěstovaných na estradiolu, jako kontrola byla použita linie WT G na estradiolu (Graf 8), k liniím s nejnižší relativní hladinou transkriptu oproti WT G byla izolována RNA i z linií pěstovaných na DMSO (Graf 9). Nejlépe umlčující linie byly poté převedeny do suspenzí, u kterých byla provedena analýza hladiny transkriptu *ARPC2A* (Graf 10). Odběr vzorků ze suspenzí probíhal na třídenních buňkách, estradiol/DMSO přidány v čase 0, tj. v den pasáže do nové 100ml Erlenmayerovy baňky. Byly použité primery *EF R1/F1* a *ARPC2A R1/F1*.



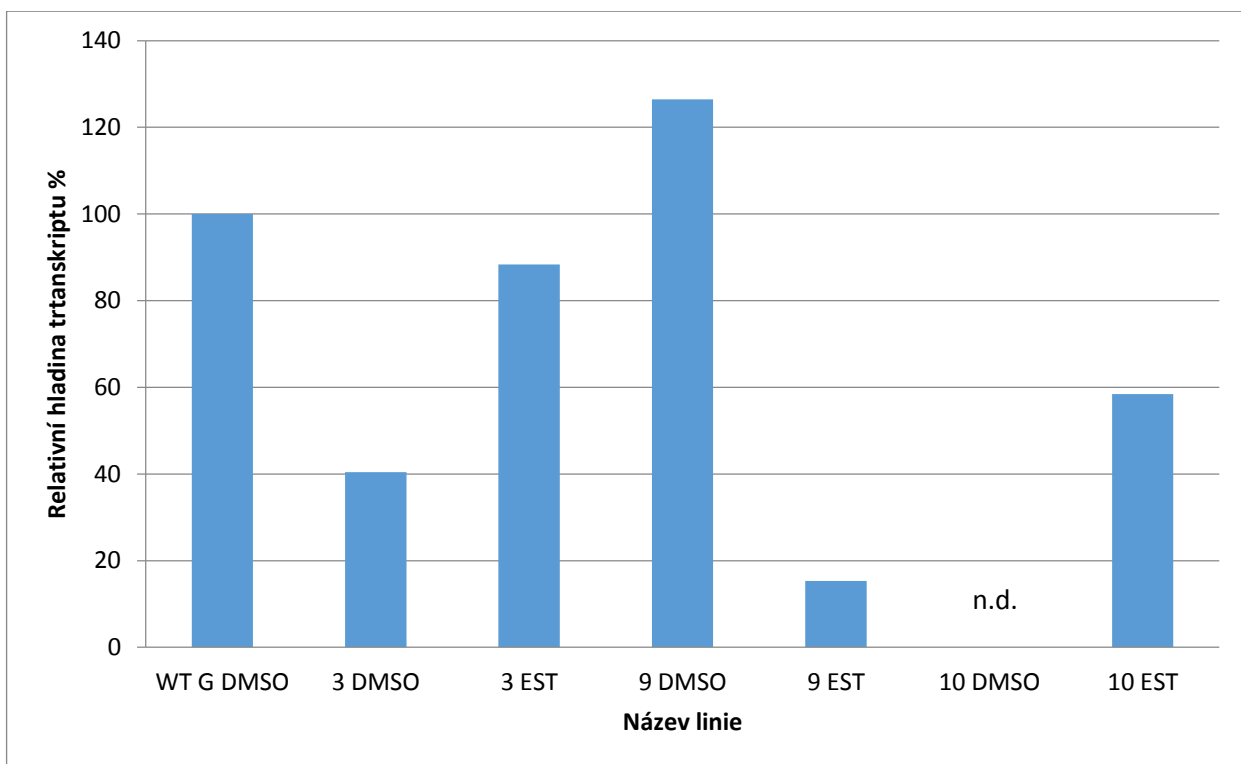
Graf 8 Relativní hladiny transkriptu *ARPC2A* kalusů pěstovaných na médiu s estradiolem. Hladiny transkriptu *ARPC2A* vztaženy na interní standard a poté na hladinu transkriptu u WT G linie pěstované na EST.

Při analýze hladiny transkriptu u prvních deseti vzorků linie se značeným Golgiho komplexem byly jako nejlépe umlčené vyhodnoceny linie 3, 9 a 10. K těmto liniím byla tedy zjištěna hladina transkriptu u kalusů pěstovaných na médiu bez indukce (DMSO).



Graf 9 Relativní hladiny transkriptu ARPC2A kalusů pěstovaných na médiu s estradiolem a DMSO. Hladiny transkriptu ARPC2A vztaženy na WT G linie pěstované na EST.

U všech analyzovaných vzorků byla míra umlčení u kalusů vysoká. Hodnoty na DMSO byly přibližně stejné, jako u WT G. Tyto kalusy byly použité pro další práci (tj. převedení do suspenze a analýzu hladiny transkriptu u suspenzí).

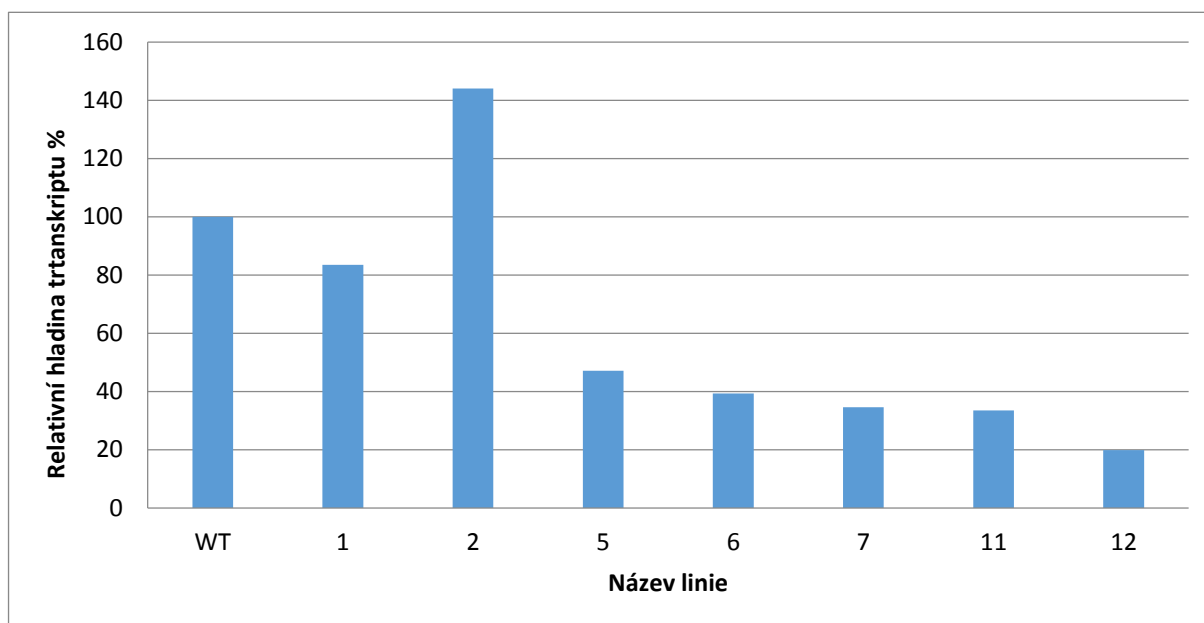


*Graf 10 Relativní hladiny transkriptu ARPC2A 3denních suspenzí kultivovaných v tekutém médiu s DMSO/EST. Hladiny transkriptu ARPC1 vztaženy na hladinu transkriptu u WT G linie pěstované na DMSO, n.d. – data se nepodařilo získat.*

Z výsledků suspenzí vychází jako nejlépe umlčující a dále použitelná pouze linie 9. U linie 3 není jisté, zda nedošlo k prohození vzorků během celé procedury, ani tak ale hodnota 40% umlčení není dostatečná. K linii 10 nebyla z technických důvodů vyizolovaná RNA ze vzorku pěstovaného na DMSO, i tak ale hodnota 58% umlčení není dále použitelná.

#### 4.2.3.4. WT linie

RNA byla izolovaná ze sedmi vzorků pěstovaných na estradiolu, jako kontrola byla použita linie WT na estradiolu (Graf 11), k liniím s nejnižší hladinou transkriptu oproti WT byla izolována RNA i z linií pěstovaných na DMSO (Graf 12). Nejlépe umlčující linie byly poté převedeny do suspenzí, u kterých byla znova provedena analýza hladiny ARPC2A (Graf 13). Odběr vzorků ze suspenzí probíhal na třídenních buňkách, estradiol/DMSO přidány v čase 0, tj. v den pasáže do nové 100ml Erlenmeyerovy baňky. Byly použity primery *EF R1/F1*, *AKTIN R1/F1* a *ARPC2A R1/F1*.

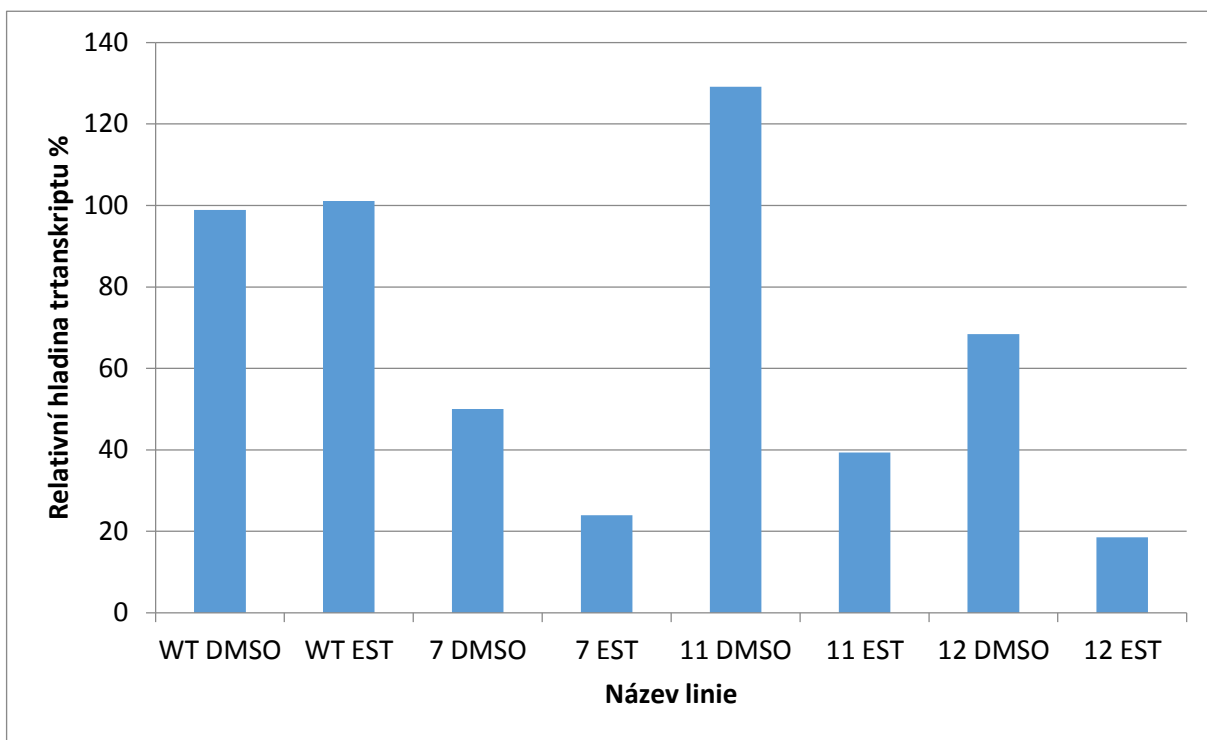


Graf 11 Relativní hladiny transkriptu ARPC2A kalusů pěstovaných na médiu s estradiolem. Hladiny transkriptu ARPC2A vztaženy na interní standard a poté na hladinu transkriptu u WT linie pěstované na EST.

Z analyzovaných linií byly vybrány jako nejlépe umlčující linie 7, 11 a 12. K těmto liniím byla zjištěna hladina transkriptu na kalusech pěstovaných na médiu s DMSO.

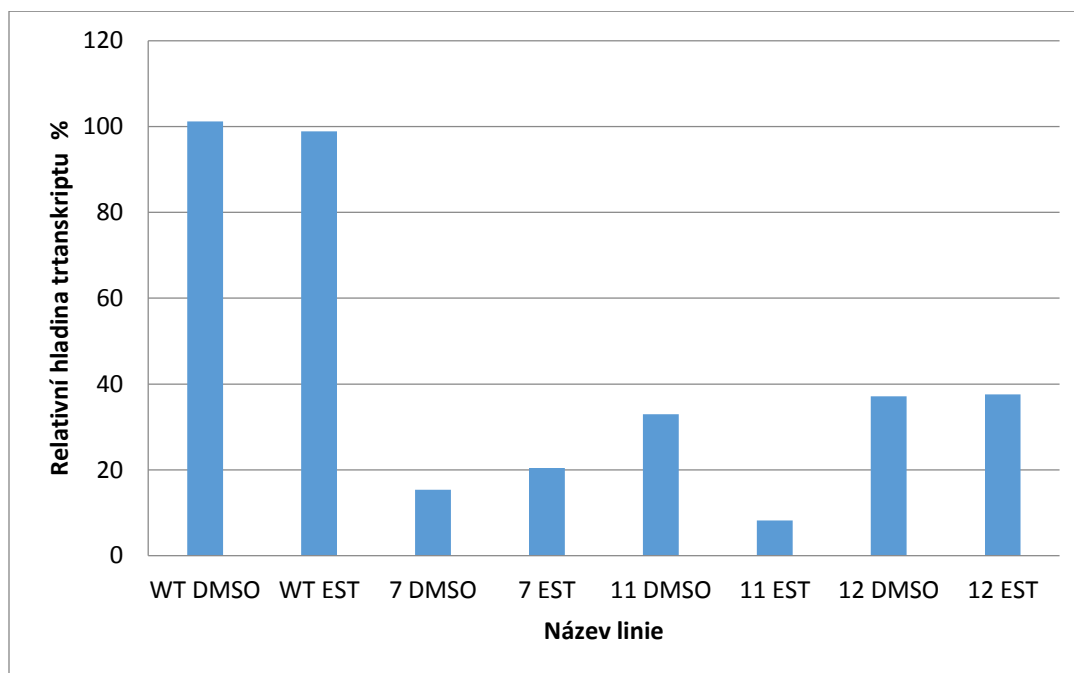
Jako standart byly místo EF primerů použity primery pro AKTIN, u BY-2 dávají produkt i u vzorků s nižší vyzolovanou koncentrací RNA (koncentrace cDNA použité v PCR reakcích byly  $\pm$  stejné).





*Graf 12 Relativní hladiny transkriptu ARPC2A kalusů pěstovaných na médiu s estradiolem a DMSO. Hladiny transkriptu ARPC2A vztaheny na interní standard a poté na průměr hladin transkriptu u WT linie pěstované na EST a DMSO.*

Z tohoto grafu se zdá být nejlépe použitelná linie 11, ale všechny tři linie byly převedeny do suspenze a byla u nich analyzována hladina transkriptu. Jako kontrola byly použity primery pro AKTIN.

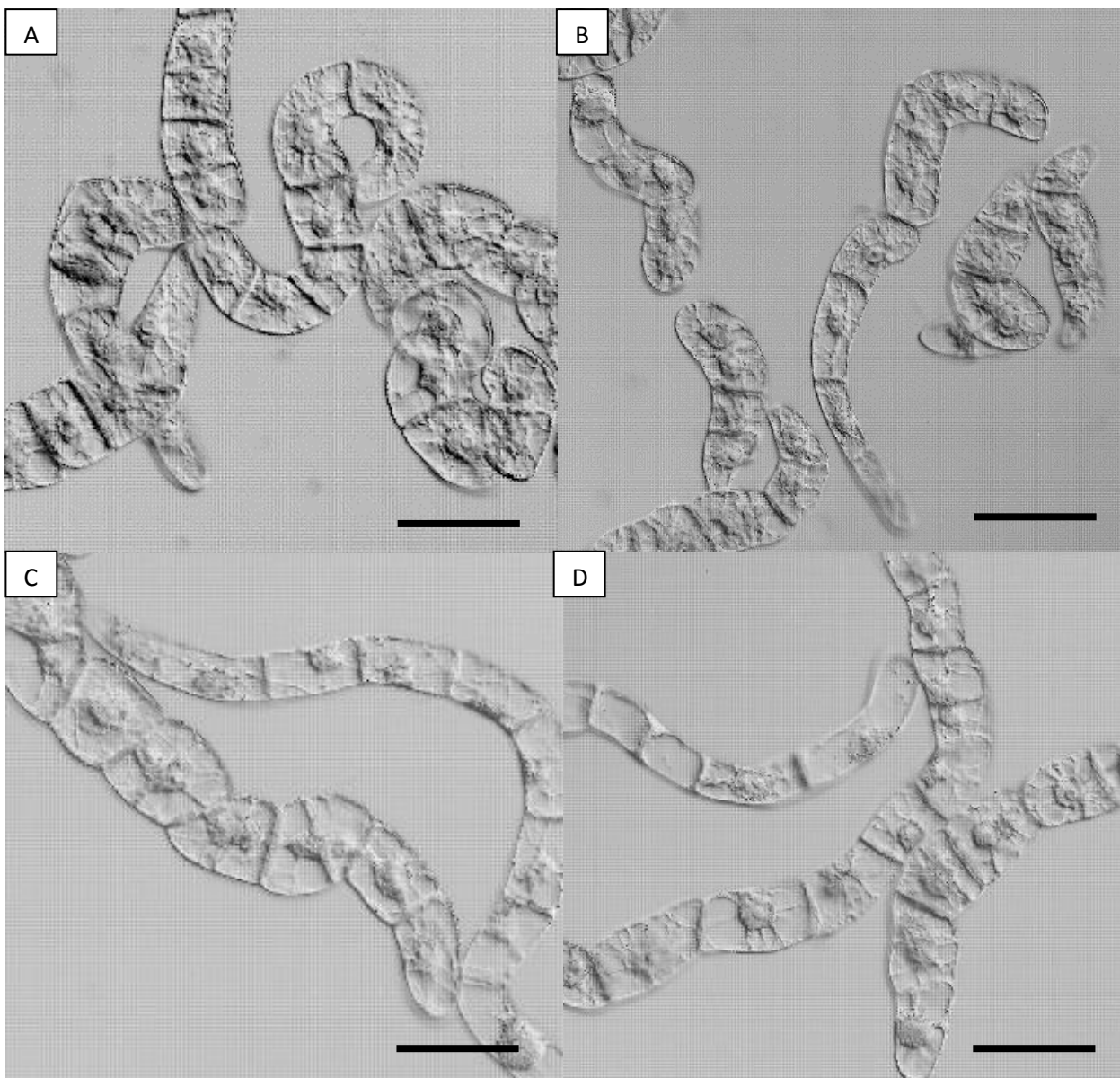


Graf 13 Relativní hladiny transkriptu ARPC2A 3denních suspenzí kultivovaných v tekutém médiu s DMSO/EST. Hladiny transkriptu ARPC1 vztaženy na interní standard a poté na průměr hladin transkriptu u WT linie pěstované na DMSO a EST.

Vzorky byly sklizeny z třídenních suspenzí, DMSO/estradiol přidány k suspenzím v čase 0. Linie 11 se potvrdila jako nejlépe umlčující na cca 10% vůči WT, částečně umlčená je i na DMSO, ve srovnání s DMSO variantou umlčuje přidáním indukce cca čtyřnásobně. Tato linie byla tedy spolu s linií 9 Golgi vybrána pro další práci.

#### 4.2.4. Sledování fenotypu *ARPC2A* – mikroskopie vybraných linií

Pro sledování fenotypu byla vybrána linie Golgi 9, fenotyp byl sledován na suspenzích s indukcí a bez indukce v porovnání s WT G také v suspenzích DMSO/estradiol (viz Obr. 12). Byl použit mikroskop Olympus BX51 s kamerou Apogee U4000. Žádné zjevné změny oproti WT ale nebyly zjištěny, proto byla analyzována hladina proteinu *ARPC2* u vybraných linií při a bez přidání indukce umlčování.

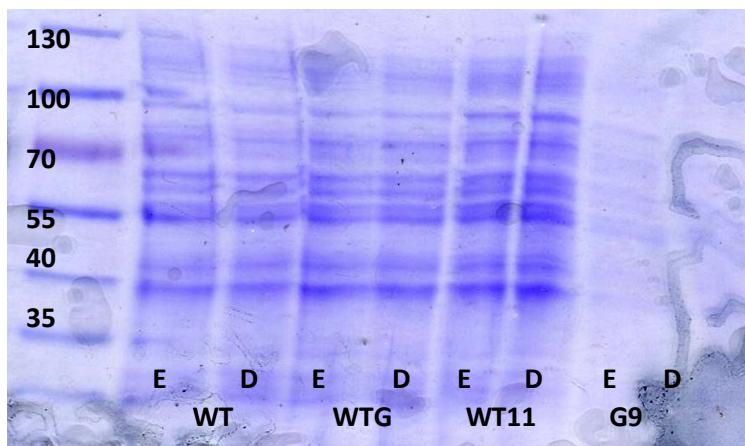


Obr. 12 BY-2 suspenze sledovány čtyři dny po aplikaci DMSO/estradiol, fázový kontrast DIC, (A) WT G s DMSO, (B) WT G s estradiolem, (C) G 9 s DMSO, (D) G 9 s estradiolem, měřítko 100 µm.

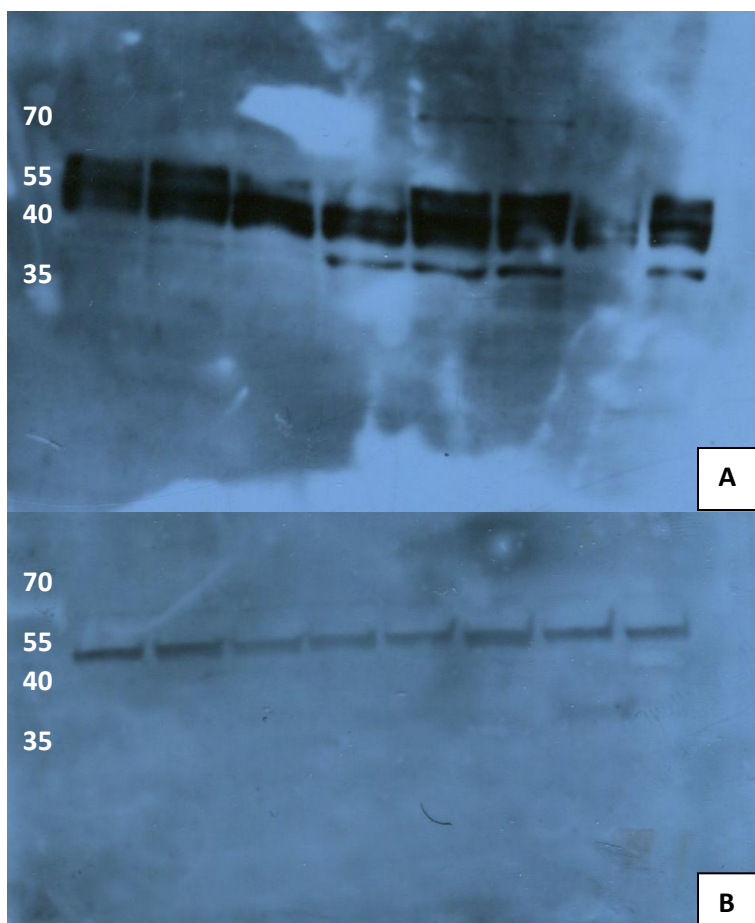
#### 4.2.5. Stanovení proteinu ARPC2A – imunolokalizace na Western blotu

Pro stanovení hladiny proteinu ARPC2A byly použity dvě nejlépe umlčující linie ve formě suspenzních kultur (získané z analýzy hladiny transkriptu pomocí semiq-RT-PCR), linie Golgi 9 a linie WT 11. Jako kontroly byly proto použity linie WT G (linie se značeným Golgiho komplexem bez vneseného konstruktů *IR-C2*) a linie WT (bez jakéhokoli vneseného konstruktů). Vzorky byly sklizeny ze šestidenních suspenzí, estradiol/DMSO přidávan v čase 0, v den pasáže inokula do nové Erlenmeyerovy baňky.

Proteiny ARP snadno degradují (dr. Schwarzerová, ústní sdělení), izolované proteiny byly proto po izolaci rovnou nanášeny na gel, nebyly zamražovány. Na základě doporučení dr. Schwarzerové nebyla ani prováděna denaturace při 99°C v termobločku pro účinné navázání SDS před nanášením na gel, obvyklá v běžně užívaném protokolu. Jako protilátky byly použity: primární protilátka - králičí ARPC2A (ředěna 1:2000), sekundární protilátka – kozí protilátka proti králičí konjugovaná s křenovou peroxidázou (ředěna 1:1000). Výsledky jsou na Obr. 13 a Obr. 14.



Obr. 13 Polyakrylamidový gel obarvený Coomassie blue. Barvení coomassie umožňuje porovnat koncentrace vzorků. Popisky v obrázku – D-DMSO, E-estradiol, čísla označují velikost proužků v kDa. Poslední dva vzorky jsou slabší kvůli špatnému technickému provedení (na gel nanášeno méně vzorku).



Obr. 14 Vizualizace proteinu ARPC2A s navázanou protilátkou, pomocí ECL na rentgenovém filmu. Vzorky byly nanесeny v obou případech v pořadí – WT E, WT D, WT G E, WT G D, WT 11 E, WT 11 D, WT G 9 E, WT G 9 D. Na obr. (A) byly proteiny před nanесením denaturovány při 99°C, u (B) pak denaturace před nanесením na gel nebyla dle doporučení provedena, izolace proteinů probíhala také precizněji. Čísла naznačují velikost proužků v kDa podle markeru.

Na obou filmech je však vidět pouze nespecifický produkt – velikost okolo 55 kDa, ARPC2A má mít velikost cca 34 kDa. Protože nebyla zjištěna hladina proteinu ARPC2 zůstává vliv RNAi na hladinu ARPC2A a funkci komplexu u BY-2 nejistý.

## 5. Diskuse

### 5.1. Indukované umlčování a jeho využití

Cílem této práce bylo využití RNAi ke studiu funkce ARP2/3 v rostlinných buňkách. Práce se věnuje umlčování dvou podjednotek ARP2/3 komplexu na dvou modelových organismech. Umlčování genové exprese pomocí malých RNA je jev, který byl poprvé popsán právě u rostlin, konkrétně u petúnie, byť v té době nebylo zapojení malých RNA v procesu umlčování ještě objeveno (Napoli et al., 1990). Objasnění principu RNAi pak bylo popsáno v pracích Fire et al., 1998 a Jones et al., 1999 a byla za něj udělena i Nobelova cena. Důsledky indukovaného umlčování jsou rozdílné od důsledků inzerční mutace či konstitutivního umlčování, kdy jsou rostliny přizpůsobeny ztrátě genu již od počátku svého vývoje. U indukovaného umlčení je možnost sledovat změny při náhlém snížení exprese studovaného genu v již vzniklém organismu v různých fázích jeho vývoje. Rozdíl je také v tom, že při RNAi je exprese genu pouze snížena (různou měrou), funkce genu může tedy být částečně zachována, což může komplikovat interpretaci výsledků, ale může být i výhodou. Výhoda RNAi je tedy i v tom, že ji lze využít pro studium funkce esenciálního genu, jehož knock-out mutace je letální. Příkladem je studium funkce ARP2/3 komplexu na linii myších neuroblastomových buněk, konkrétně byla umlčena ARPC2 podjednotka a došlo tak ke snížení obsahu F-aktinu (Korobova a Svitkina, 2008). Umlčování lze navozovat různými způsoby, v této diplomové práci byl pro umlčení obou podjednotek využit konstrukt s invertovanou repeticí a vloženým intronem, které navozují RNAi efektivněji než jiné typy konstruktů. Vložený intron (respektive jeho sestřih) totiž zřejmě pomáhá při tvorbě dvouvláknové struktury RNA (Smith et al., 2000).

Jako inducibilní systém byl pro tuto práci použit XVE systém, který má vysokou účinnost odpovědi na indukci  $\beta$ -estradiolem a tento induktor nemá žádný pozorovaný fyziologický vliv na rostliny (Zuo et al., 2000). Indukované umlčování s XVE systémem umožňuje unikátní možnost porovnání stejné rostliny za normálních podmínek (přidání DMSO), kdy je rostlina stejná jako WT, s podmínkami, které vyvolají umlčení exprese – přidání estradiolu. Toto bylo využito například v práci Yang et al., 2014 při studiu stresu endoplazmatického retikula při hromadění špatně sbalených proteinů u *Arabidopsis*. Existují i další inducibilní systémy použitelné u rostlin - GVG systém, který je indukovaný dexamethasonem, což je glukokortikoid, který umožňuje snadné pronikání do rostlinných buněk, v této práci nebyly zjištěny žádné fyziologické změny rostlin při použití tohoto systému (Aoyama a Chua, 1997). V pozdější práci na *Lotus japonicus* se ale ukázalo, že tento systém po aktivaci ovlivňuje dělení buněk v pericyklu a prodlužování buněk

ve stonku (Andersen et al., 2003). Dalším je systém AlcR, který je indukovaný ethanolem (Caddick et al., 1998), jeho nevýhodou je ale toxicita ethanolu pro rostlinu při vysoké koncentraci a to, že je ethanol produkován i rostlinou samou při anaerobních podmínkách (Roslan et al., 2001).

## 5.2. Studium snížení exprese ARPC1 podjednotky u *Arabidopsis thaliana*.

Rostliny *Arabidopsis thaliana* byly vybrány jako modelový organismus z několika důvodů – jde o zavedený model na zdejších pracovišti a je to běžně používaný model při studiu funkce rostlinných genů. Pro umlčování byla vybrána podjednotka ARPC1, neboť není známý fenotyp při ztrátě této podjednotky, která je kódována dvěma tandemově uspořádanými paralogy (dle databáze NCBI). Z důvodů silné genové vazby mezi těmito paralogy není vytvoření dvojitého mutantu v ARPC1 podjednotce snadné, proto bylo v této práci využito metody RNAi. Mutanti v ostatních podjednotkách jsou dostupní. U všech se objevuje fenotyp poškozených trichomů (Mathur, 2005). Aby bylo možné pozorovat fenotyp poškození trichomů na listech RNAi transformantů, je nutné přidat estradiol (indukovat umlčování) ještě před vytvořením těchto orgánů. Poškozené trichomy u mutantů v ARP2/3 komplexu jsou nejlépe viditelné na prvních pravých listech (Schwarzerová, ústní sdělení). Dalším běžně pozorovaným fenotypem mutantů v podjednotkách ARP2/3 komplexu u *Arabidopsis* jsou méně výrazné loby pokožkových buněk. Buňky pokožky jsou typicky laločnaté, pro směrovaný růst lobů je zde nutný aktin, který má u mutantů narušenou nukleaci, nedochází tedy k tvorbě tak výrazných laloků u buněk s nefunkčním ARP2/3 komplexem (Le et al., 2003; El-Assal et al., 2004). Tento projev byl ale pozorován na děložních listech, pro pozorování podobného fenotypu u RNAi transformantů by tedy bylo nutné indukovat umlčování před vývojem těchto listů (v semeni), což je technicky obtížně proveditelné. Naopak subcelulární změny závislé na aktinu – fúze vakuol, pohyblivost ER a Golgi (Mathur et al., 2003a; Boevink et al., 1998) a možná i některé další neznámé by bylo možné pozorovat i po indukci umlčování v buňkách již vytvořených orgánů.

Metoda RNAi je u *Arabidopsis* běžně používaná. Bylo potvrzeno, že je umlčení pomocí malých dvouvláknových RNA na *Arabidopsis* možné a vložený umlčující konstrukt je přenášen do dalších generací, kde umlčení přetrvává (Chuang a Meyerowitz, 2000). Byl tedy připraven umlčující konstrukt *IR-C1*, s invertovanou repeticí a vloženým intronem uprostřed – *IR-C1*. Detekci změn na buněčné úrovni lze usnadnit využitím markerových linií, tedy linií které již obsahují vnesený konstrukt pro reportérový gen (GFP, mCherry) navázaný na určitou buněčnou strukturu.

Transformovány byly tedy nejen WT rostliny, ale i rostliny s již vloženým konstruktem pro vizualizaci buněčných struktur. Byly použity linie s označeným fimbrinem, pro sledování změn přímo v uspořádání aktinového cytoskeletu (Sheahan et al., 2004), linie se značenými mikrotubuly pro zjištění možné interakce ARP2/3 s mikrotubulovým cytoskeletem, jak bylo zjištěno u ARPC2 (Havelková et al., 2015). Dále byla použita linie se značenými peroxisómy, jež byla vybrána pro pozorovanou interakci ARP2/3 podjednotek s těmito organelami, na jejichž povrchu tvoří tzv. arpozómy (v rámci diplomové práce Martínek, 2015) a endoplazmatickým retikulem, které ke svému pohybu a pro transport vezikul využívá aktinový cytoskelet (Kachar a Reese, 1988), lze tedy předpokládat zpomalení tohoto transportu při narušené nukleaci aktinu.

Původní plán vyselektovat umlčující rostliny přímo podle fenotypu distorted trichomů byl neúspěšný, proto byl nahrazen molekulární metodou – semikvantitativní RT-PCR, která sleduje hladinu transkriptu ARPC1. Výsledky jsou zobrazeny v Grafu 1., kdy byly porovnávány rostliny T2 generace s indukcí umlčení a bez indukce, vše bylo vztaženo na WT. Přesto, že byla provedena analýza na několika liniích, nebyla nalezena žádná, která by umlčovala na dostatečně nízkou hladinu transkriptu. To, že taková linie nebyla nalezena, mohlo mít více příčin - malé množství analyzovaných rostlin, špatná účinnost vneseného konstruktu například vlivem vnesení tohoto konstruktu na „nevýhodné“ místo na chromozómu, tzv. poziční efekt (Zuo et al., 2000). U linií s nejvíce sníženou hladinou ARPC1 – FIM6 a ER5, kde byla ARPC1 umlčena na cca 50% oproti WT byl pro jistotu znovu sledován fenotyp trichomů při klíčení na indukčním médiu s estradiolem. Na Obr. 10 je vidět výsledek zdokumentovaných trichomů na prvních listech, kde nebyly nalezeny žádné poškozené trichomy. Může to být zapříčiněno tím, že snížení *ARPC1* transkriptu na polovinu nemá významný vliv na hladinu proteinu a tudíž žádný vliv na funkci ARP2/3 komplexu. Na úrovni proteinu se může kompenzovat snížená hladina mRNA díky prodloužené stabilitě či translaci ze zbylé mRNA může být upregulována, tak aby nedošlo k výraznému snížení proteinu. Celková míra korelace mezi hladinou proteinu a hladinou transkriptu je odhadována jen okolo 40 % (dle Vogel a Marcotte, 2012). Bohužel zatím není dostupná protilátka pro ARPC1, aby bylo možné sledovat přímo hladinu ARPC1 při indukcí umlčení. Ani snížení hladiny celého komplexu na polovinu by však nemuselo mít na trichomy žádný vliv. Právě kvůli nízké míře umlčení nebyly rostliny dále analyzovány. Pro získání dostatečně silně umlčujících rostlin by zřejmě bylo potřeba selektovat hned od počátku nejen pomocí selekčního antibiotika ale i s indukcí estradiolem z většího množství transformovaných linií a zkusit najít vhodné linie fenotypovým screeningem na předpokládaný fenotyp distorted trichomů.



### 5.3. Studium snížení exprese ARPC2A podjednotky u buněčné linie BY-2

Tabáková buněčná linie BY-2 byla vybrána jako modelový organismus, protože ve výzkumu ARP2/3 komplexu chybí rostlinný cytologický model. Tento model je výhodný díky vysoké homogenitě a relativně rychlému růstu (Nagata et al., 1992), je zvládnuta i jeho relativně snadná transformace. Podjednotka ARPC2 pak byla vybrána z toho důvodu, že se jedná o podjednotku, která sestavuje a stabilizuje celý komplex a její umlčení by tak mohlo mít výrazný fenotyp (Robinson et al., 2001) a zároveň je k dispozici protilátka proti tabákovému proteinu. Metoda RNAi zde byla použita kvůli nedostupnosti inzerčních mutantů u BY-2 buněk, navíc indukované umlčení dává možnost porovnání linie při snížení ARPC2 se stejnou linií bez indukce umlčení, jak bylo zmíněno výše. Nově se objevující možnosti, jak vytvořit mutanty u BY-2 buněk je využití systému CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeat)/Cas9 (CRISPR-associated), která vytváří pomocí gRNA cílené zlomy, které vedou ke vzniku lokalizovaných mutací (Jinek et al., 2013; Mercx et al., 2016). Výhoda tohoto systému je to, že jde o cílenou mutagenézi. Inaktivace určitého genu je ale u amfidiploidního genomu tabáku poměrně komplikovaná. V práci od Mercx et al., 2016, kde byl mutován předem vnesený gen mCherry, se prokázalo, že je CRISPR/Cas9 použitelný i u buněčné linie BY-2. Komplikovaná je ale selekce a analýza transformantů zvláště za situace, kdy nelze jednoduše vizuálně selektovat jako v případě reportérového genu pro mCherry.

Pro umlčení ARPC2 pomocí RNAi byl v této práci použit konstrukt *IR-C2*, opět s invertovanou repeticí. Tento konstrukt byl transformován do WT linie a do linií se značenými buněčnými strukturami podobně jako u *Arabidopsis*, bylo nutné vybrat pouze ty linie, které mají v konstruktu pro vizualizaci vložené jiné než selekční antibiotikum pro *IR-C2*. Jako takové byly vybrány linie se značeným Golgi, linie se značenými vakuolami a linie se značeným fimbrinem. Linie se značenými vakuolami byla vybrána, protože mutanti podjednotek u *Arabidopsis* vykazují často poruchy při fúzi vakuol (Mathur et al., 2003a), bylo by tedy možné tento jev pozorovat přímo na tomto cytologickém modelu. Golgi je dynamická struktura využívající pro pohyb v buňce aktinový cytoskelet, navíc i přenos váčků z a do Golgi je řízen aktinem (Boevink et al., 1998), narušení nukleace by tedy mohlo způsobit například zpomalení těchto pohybů v buňce. Linie se značeným fimbrinem pak byla vybrána pro pozorování změn přímo na aktinových filamentech.

Po počátečních ne příliš úspěšných transformacích dle standardně používaného Protokolu 1, byl vyzkoušen zkrácený Protokol 2. V tomto protokolu byl podpořen růst kalusů přidáním čerstvé netransformované suspenze jako vyživovací vrstvy podobně jako v práci dle Nocarová a Fischer 2009, kde je tato „feeder layer“ využita pro klonování transformovaných buněk BY-2. Tyto buňky jsou poté selekcí vyřazeny. Při použití optimalizovaného postupu se podařilo vyselektovat okolo padesáti kalusů ze všech čtyř variant. V dalším kroku bylo nutné analyzovat, jak moc je ARPC2 podjednotka umlčená u jednotlivých linií, a vybrat klony, kde bude ARPC2 co nejvíce snížena. Nejprve byla sledována hladina ARPC2 na transkripční úrovni pomocí metody semiq-RT-PCR. Protože byla dostupná protilátka proti ARPC2 u tabákových buněk, nabízela se možnost sledovat i umlčení přímo na proteinové úrovni.

### 5.3.1. *Linie se značenými vakuolami*

U této linie bylo pozorované umlčení nejlepší ze všech linií, z jedenácti analyzovaných vzorků bylo devět vzorků kalusů pěstovaných na estradiolu umlčeno na hladinu nižší než 25% oproti WT VAC (viz Graf. 2). Při doděláním analýzy těchto kalusů na kontrolním médiu s DMSO a po převedení linií do formy suspenzních kultur bylo po analýze transkriptu zjištěno, že dva vzorky (ze tří analyzovaných) jsou zřejmě samovolně umlčené, tj. snižují hladinu transkriptu ARPC2 nezávisle na přidání indukce - tedy dochází k transkripci umlčujícího konstruktů, aniž by byl přidán estradiol. Samovolná aktivace XVE systému byla pozorována i v dalších pracích (Vlot et al., 2008; Kang et al., 2009), v tomto případě se ale asi spíše jednalo o spontánní transkripci T-DNA u buněk BY-2, která s XVE systémem nijak nesouvisí, jak podrobně popisuje kolega Čermák (Čermák a Fischer – připravený manuskript).

### 5.3.2. *Linie se značeným fimbrinem*

Fimbrin je aktin vazebný protein, který se vyskytuje i u rostlin a pomáhá svazování aktinových filament (Kovar et al., 2000). Jeho fúzí s fluorescenčními proteiny může tak být snadno pozorován aktinový cytoskelet (využito například v práci od Wang, et al., 2004). U linie se značeným aktinovým cytoskeletem se po analyzování prvních deseti vzorků neukázala žádná linie jako úspěšně umlčená (Graf 5), proto byla analýza transkriptu provedena na dalších deseti vzorcích (Graf 6). I přesto nebyla nalezena účinně umlčující linie, pouze tři linie vykazovaly hladinu ARPC2 okolo 50% oproti WT FIM. Může to být zapříčiněno tím, že BY-2 FIM linie již obsahovala jeden konstrukt, který byl cílený na mikrofilamenta. V práci dle Dyachok et al., 2014 byl vytvořen konstrukt pro obarvení aktinu mCherry a GFP, u kterého byl později v bakalářské práci studenta tohoto týmu (M. Möttus, 2015) pozorován negativní efekt právě pro variantu

značenou mCherry. Docházelo zde ke svazkování F-aktinových vláken, které bránilo detailnějšímu pozorování. Právě možný dvojitý negativní vliv na aktinový cytoskelet – svazkování mikrofilament a inaktivace ARP2/3 - mohl být pro růst buněk limitující a v konkurenci ostatních buněk nebyly schopné dorůst v dostatečně velký kalus a proto nebyly možná dobře umlčující kalusy ani vybrány k analýze.

### 5.3.3. Analýza hladiny proteinu ARPC2 vybraných linií

Analýzy hladiny proteinu byla provedena na dvou vybraných liniích – Golgi 9 a WT 11. Byla zvolena metoda imunodetekce na western blotu s následnou vizualizací pomocí ECL systému. Proteiny byly izolovány dle upraveného protokolu (viz kap. 3.7.1.) vhodného pro izolaci ARP proteinů. V prvních pokusech probíhala izolace proteinů za přidání jen minima dusíku do vychlazených porcelánových misek, byla také prováděna denaturace při 99° v termobločku před nanesením proteinů na gel. Důsledkem toho bylo na vyvolaném filmu několik silných pruhů o velikosti kolem 55kDa, což je výrazně více než je velikost proteinu ARPC2 (34 kDa). Zjevně se tedy jednalo o silný nespecifický signál. Z těchto důvodů bylo nutné experiment zopakovat a vylepšit. Protože izolace proteinů musí být prováděna za co nejnižší teploty a s přidanými inhibitory proteáz (Liu et al., 2014), byly v dalším experimentu misky vymrazeny dusíkem a dusík byl při homogenizaci přiléván do misek za tvorby „sněhové pěny“ ze suspenzí buněk. Pro snížení možnosti degradace byl ke komerčnímu koktejlu inhibitorů proteáz přidán navíc PMSF, který může ve vodných roztocích relativně rychle degradovat (James, 1978). Byla použita i nová sterilní primární protilátka pro vyloučení nespecifity způsobené možnou kontaminací této protilátky použité v předchozím experimentu. Díky popsáným změnám byl detekován na blotu pouze jeden dominantní pruh, ale opět o velikost cca 55 kDa (Obr. 14), oproti očekávané migraci na pozici okolo 35 kDa (Havelková et al., 2015; Schwarzerová ústní sdělení). Jednalo se tedy zřejmě opět pouze o nespecifický produkt. Získání produktu o vyšší velikosti než je cílený protein může být teoreticky způsobeno jeho terciální strukturou nebo spojením s dalšími proteiny, to lze odstranit opakovanou denaturací před nanesením na gel (Liu et al., 2014), což je dle sdělení dr. Schwarzerové při detekci ARP proteinů nepřijatelné, neboť dochází k jejich degradaci. Pokud však byl 55kDa protein detekovaný na blotech nějak odvozený od ARPC2 podjednotky, chybějící rozdíly mezi vzorky pocházejícími z ošetření estradiolem a DMSO by ukazovaly, že jsou buňky BY-2 schopné na proteinové úrovni kompenzovat i poměrně značné snížení hladiny transkriptu tohoto proteinu. Pokud by tomu tak bylo, bylo by ale obtížné vysvětlit, proč nebyly v případě fimbrinové linie nalezeny žádně silněji umlčující kalusy.

## 6. Závěr

Cílem této práce bylo studium podjednotek ARP2/3 komplexu na dvou rostlinných modelových organismech pomocí inducibilního umlčování podjednotek pomocí RNAi.

Prvním cílem bylo studium ARPC1 podjednotky na rostlině *Arabidopsis thaliana*. Byl připraven umlčující konstrukt *IR-C1* pro indukcí umlčení genu ARPC1. Tímto konstruktem byly poté transformovány rostliny WT a rostliny s již vneseným konstruktem pro obarvení buněčných struktur. Tyto rostliny byly vyselektovány až do T2 generace. U vybraných linií byla v T2 generaci analyzována hladina transkriptu ARPC1 po indukci umlčení. Nebyla však nalezena účinně umlčující linie. U linie se sníženou hladinou transkriptu ARPC1 na cca 50% nebyl pozorován fenotyp poškozených trichomů, který je typický pro mutanty v podjednotkách ARP2/3 komplexu. Důvodem ale může být právě to, že 50% umlčení není dostatečné pro snížení hladiny proteinu ARPC1.

Druhým cílem bylo studium ARPC2 na cytologickém modelu tabákových buněk BY-2. Podařilo se transformovat čtyři linie BY-2 (WT, linie se značenými buněčnými strukturami – Golgi, vakuolami a fimbrinem) konstruktem *IR-C2*. K transformaci byl použit zkrácený protokol transformace, který podporoval regeneraci transformovaných kalusů přidáním netransformovaných buněk. U transformovaných linií byly provedeny analýzy hladiny transkriptu při a bez přidání estradiolu. Z této analýzy byly vybrány dvě linie, které spolehlivě umlčovaly ARPC2 na transkripční úrovni (pod cca 20% oproti WT). U těchto linií však nebyly pozorovány žádné fenotypové projevy po indukci umlčování. Vliv snížené hladiny transkriptu na množství proteinu ARPC2 u vybraných linií se bohužel nepodařilo analyzovat kvůli nespecifické interakci protilátky.

## 7. Seznam použité literatury

- Ahuja, R., Pinyol, R., Reichenbach, N., Custer, L., Klingensmith, J., Kessels, M. M., & Qualmann, B. (2007). Cordon-bleu is an actin nucleation factor and controls neuronal morphology. *Cell*, *131*(2), 337-350.
- Allwood, E. G., Anthony, R. G., Smertenko, A. P., Reichelt, S., Drobak, B. K., Doonan, J. H., Weeds, A. G. & Hussey, P. J. (2002). Regulation of the pollen-specific actin-depolymerizing factor LIADF1. *The Plant Cell*, *14*(11), 2915-2927.
- Aoyama, T., & Chua, N. H. (1997). A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *The Plant Journal*, *11*(3), 605-612.
- An, G. (1985). High efficiency transformation of cultured tobacco cells. *Plant Physiology*, *79*(2), 568-570.
- Andersen, S. U., Cvitanich, C., Hougaard, B. K., Roussis, A., Grønlund, M., Jensen, D. B., Frøkjær, L., A. & Jensen, E. Ø. (2003). The glucocorticoid-inducible GVG system causes severe growth defects in both root and shoot of the model legume *Lotus japonicus*. *Molecular Plant-microbe Interactions*, *16*(12), 1069-1076.
- Augustine, R. C., Pattavina, K. A., Tüzel, E., Vidali, L., & Bezanilla, M. (2011). Actin interacting protein1 and actin depolymerizing factor drive rapid actin dynamics in *Physcomitrella patens*. *The Plant Cell*, *23*(10), 3696-3710.
- Baluška, F., Salaj, J., Mathur, J., Braun, M., Jasper, F., Šamaj, J., Chua, N., Barlow, P., W. & Volkmann, D. (2000). Root hair formation: F-actin-dependent tip growth is initiated by local assembly of profilin-supported F-actin meshworks accumulated within expansin-enriched bulges. *Developmental Biology*, *227*(2), 618-632.
- Basu, D., Le, J., El-Essal, S. E. D., Huang, S., Zhang, C., Mallery, E. L., & Szymanski, D. B. (2005). DISTORTED3/SCAR2 is a putative *Arabidopsis* WAVE complex subunit that activates the Arp2/3 complex and is required for epidermal morphogenesis. *The Plant Cell*, *17*(2), 502-524.
- Basu, D., Le, J., Zakharova, T., Mallery, E. L., & Szymanski, D. B. (2008). A SPIKE1 signaling complex controls actin-dependent cell morphogenesis through the heteromeric WAVE and ARP2/3 complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(10), 4044-4049.
- Basu, S., Kustanovich, I., & Lamprecht, R. (2016). Arp2/3 and VASP are essential for fear memory formation in lateral amygdala. *eNeuro*, *3*(6), ENEURO-0302.
- Bear, J. E., Rawls, J. F., & Saxe, C. L. (1998). SCAR, a WASP-related protein, isolated as a suppressor of receptor defects in late *Dictyostelium* development. *The Journal of Cell Biology*, *142*(5), 1325-1335.
- Bertling, E., Hotulainen, P., Mattila, P. K., Matilainen, T., Salminen, M., & Lappalainen, P. (2004). Cyclase-associated protein 1 (CAP1) promotes cofilin-induced actin dynamics in mammalian nonmuscle cells. *Molecular Biology of the Cell*, *15*(5), 2324-2334.
- Blanchoin, L., & Staiger, C. J. (2010). Plant formins: diverse isoforms and unique molecular mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, *1803*(2), 201-206.
- Boevink, P., Oparka, K., Cruz, S. S., Martin, B., Betteridge, A., & Hawes, C. (1998). Stacks on tracks: the plant Golgi apparatus traffics on an actin/ER network. *The Plant Journal*, *15*(3), 441-447.
- Bosch, M., Le, K. H. D., Bugyi, B., Correia, J. J., Renault, L., & Carlier, M. F. (2007). Analysis of the function of Spire in actin assembly and its synergy with formin and profilin. *Molecular Cell*, *28*(4), 555-568.
- Brembu, T., Winge, P., Seem, M., & Bones, A. M. (2004). NAPP and PIRP encode subunits of a putative wave regulatory protein complex involved in plant cell morphogenesis. *The Plant Cell*, *16*(9), 2335-2349.
- Burke, T. A., Christensen, J. R., Barone, E., Suarez, C., Sirotkin, V., & Kovar, D. R. (2014). Homeostatic actin cytoskeleton networks are regulated by assembly factor competition for monomers. *Current Biology*, *24*(5), 579-585.
- Caddick, M. X., Greenland, A. J., Krause, K. P., Qu, N., Riddell, K. V., Salter, M. G., Schuch, W., Sonnewald, U. & Tomsett, A. B. (1998). An ethanol inducible gene switch for plants used to manipulate carbon metabolism. *Nature Biotechnology*, *16*(2), 177-180.
- Cai, L., Makhov, A. M., Schafer, D. A., & Bear, J. E. (2008). Coronin 1B antagonizes cortactin and remodels Arp2/3-containing actin branches in lamellipodia. *Cell*, *134*(5), 828-842.
- Caplen, N. J., Fleenor, J., Fire, A., & Morgan, R. A. (2000). dsRNA-mediated gene silencing in cultured *Drosophila* cells: a tissue culture model for the analysis of RNA interference. *Gene*, *252*(1), 95-105.
- Carlsson, L., Nyström, L. E., Sundkvist, I., Markey, F., & Lindberg, U. (1977). Actin polymerizability is influenced by profilin, a low molecular weight protein in non-muscle cells. *Journal of Molecular Biology*, *115*(3), 465-483.

- Chuang, C. F., & Meyerowitz, E. M. (2000). Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(9), 4985-4990.
- Clough, S. J., & Bent, A. F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, *16*(6), 735-743.
- Cooper, J. A. (1987). Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *The Journal of Cell Biology*, *105*(4), 1473-1478.
- Conley, C. A., Fritz-Six, K. L., Almenar-Queralt, A., & Fowler, V. M. (2001). Leiomodins: larger members of the tropomodulin (Tmod) gene family. *Genomics*, *73*(2), 127-139.
- Cvrčková, F., Novotný, M., Pícková, D., & Žárský, V. (2004). Formin homology 2 domains occur in multiple contexts in angiosperms. *BMC Genomics*, *5*(1), 44.
- Dang, I., Gorelik, R., Sousa-Blin, C., Derivery, E., Guérin, C., Linkner, J., M. Nemethova, J. G. Dumortier, F. A. Giger, T. A. Chipysheva, V. D. Ermilova, S. Vacher, V. Campanacci, I. Herrada, A. Planson, S. Fetics, V. Henriot, V. David, K. Oguievetskaia, G. Lakisic, F. Pierre, A. Steffen, A. Boyreau, N. Peyriéras, K. Rottner, S. Zinn-Justin, J. Cherfils, I. Bièche, A. Y. Alexandrova, N. B. David, J. Victor Small, J. Faix, L. Blanchoin & Ermilova, V. D. (2013). Inhibitory signalling to the Arp2/3 complex steers cell migration. *Nature*, *503*(7475), 281-284.
- Dayel, M. J., Holleran, E. A., & Mullins, R. D. (2001). Arp2/3 complex requires hydrolyzable ATP for nucleation of new actin filaments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(26), 14871-14876.
- Deblaere, R., Bytebier, B., De Greve, H., Deboeck, F., Schell, J., Van Montagu, M., & Leemans, J. (1985). Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Research*, *13*(13), 4777-4788.
- Deeks, M. J., Kaloriti, D., Davies, B., Malhó, R., & Hussey, P. J. (2004). *Arabidopsis* NAP1 is essential for Arp2/3-dependent trichome morphogenesis. *Current Biology*, *14*(15), 1410-1414.
- Deeks, M. J., Rodrigues, C., Dimmock, S., Ketelaar, T., Maciver, S. K., Malhó, R., & Hussey, P. J. (2007). *Arabidopsis* CAP1—a key regulator of actin organisation and development. *Journal of Cell Science*, *120*(15), 2609-2618.
- Derivery, E., & Gautreau, A. (2010). Generation of branched actin networks: assembly and regulation of the N-WASP and WAVE molecular machines. *Bioessays*, *32*(2), 119-131.
- Derry, J. M., Ochs, H. D., & Francke, U. (1994). Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell*, *78*(4), 635-644.
- Dominguez, R. (2016). The WH2 domain and actin nucleation: necessary but insufficient. *Trends in Biochemical Sciences*, *41*(6), 478-490.
- Duncan, M. C., Cope, M. J. T., Goode, B. L., Wendland, B., & Drubin, D. G. (2001). Yeast Eps15-like endocytic protein, Pan1p, activates the Arp2/3 complex. *Nature Cell Biology*, *3*(7), 687-690.
- Dyachok, J., Sparks, J. A., Liao, F., Wang, Y. S., & Blancaflor, E. B. (2014). Fluorescent protein-based reporters of the actin cytoskeleton in living plant cells: Fluorophore variant, actin binding domain, and promoter considerations. *Cytoskeleton*, *71*(5), 311-327.
- El-Din El-Assal, S., Le, J., Basu, D., Mallery, E. L., & Szymanski, D. B. (2004). DISTORTED2 encodes an ARPC2 subunit of the putative *Arabidopsis* ARP2/3 complex. *The Plant Journal*, *38*(3), 526-538.
- Firat-Karalar, E. N., & Welch, M. D. (2011). New mechanisms and functions of actin nucleation. *Current Opinion in Cell Biology*, *23*(1), 4-13.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., & Kostas, S. A. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, *391*(6669), 806.
- Frank, M. J., & Smith, L. G. (2002). A small, novel protein highly conserved in plants and animals promotes the polarized growth and division of maize leaf epidermal cells. *Current Biology*, *12*(10), 849-853.
- Fukuoka, M., Miki, H., & Takenawa, T. (1997). Identification of N-WASP homologs in human and rat brain. *Gene*, *196*(1), 43-48.
- Gandhi, M., Smith, B. A., Bovellan, M., Paavilainen, V., Daugherty-Clarke, K., Gelles, J., Lappalainen, P. & Goode, B. L. (2010). GMF is a cofilin homolog that binds Arp2/3 complex to stimulate filament debranching and inhibit actin nucleation. *Current Biology*, *20*(9), 861-867.
- Gavrín, A., Jansen, V., Ivanov, S., Bisseling, T., & Fedorova, E. (2015). ARP2/3-mediated actin nucleation associated with symbiosome membrane is essential for the development of symbiosomes in infected cells of *Medicago truncatula* root nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *28*(5), 605-614.
- Goley, E. D., & Welch, M. D. (2006). The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *7*(10), 713-726.

- Harries, P. A., Pan, A., & Quatrano, R. S. (2005). Actin-related protein2/3 complex component ARPC1 is required for proper cell morphogenesis and polarized cell growth in *Physcomitrella patens*. *The Plant Cell*, *17*(8), 2327-2339.
- Havelková, L. (2010) Úloha cytoskeletu v morfogenezi rostlinných buněk. Disertační práce, Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta.
- Havelková, L., Nanda, G., Martinek, J., Bellinvia, E., Sikorová, L., Šlajcherová, K., D. Seifertová, L. Fischer, J. Fišerová, J. Petrášek & Schwarzerová, K. (2015). Arp2/3 complex subunit ARPC2 binds to microtubules. *Plant Science*, *241*, 96-108.
- Hetrick, B., Han, M. S., Helgeson, L. A., & Nolen, B. J. (2013). Small molecules CK-666 and CK-869 inhibit actin-related protein 2/3 complex by blocking an activating conformational change. *Chemistry & Biology*, *20*(5), 701-712.
- Holweg, C., & Nick, P. (2004). Arabidopsis myosin XI mutant is defective in organelle movement and polar auxin transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(28), 10488-10493.
- Hossain, M. S., Liao, J., James, E. K., Sato, S., Tabata, S., Jurkiewicz, A., Madsen, L., H., Stougaard, J., Ross, L. & Szczyglowski, K. (2012). Lotus japonicus ARPC1 is required for rhizobial infection. *Plant Physiology*, *160*(2), 917-928.
- Hussey, P. J., Ketelaar, T., & Deeks, M. J. (2006). Control of the actin cytoskeleton in plant cell growth. *Annu. Rev. Plant Biol.*, *57*, 109-125.
- Hülkamp, M., Miséra, S., & Jürgens, G. (1994). Genetic dissection of trichome cell development in Arabidopsis. *Cell*, *76*(3), 555-566.
- Chereau, D., Boczkowska, M., Skwarek-Maruszewska, A., Fujiwara, I., Hayes, D. B., Rebowski, G., Lappalainen, P., Pollard, T. D. & Dominguez, R. (2008). Leiomodin is an actin filament nucleator in muscle cells. *Science*, *320*(5873), 239-243.
- Ibarra, N., Pollitt, A., & Insall, R. H. (2005). Regulation of actin assembly by SCAR/WAVE proteins. *Biochemical Society Transactions*, *33*(6), 1243-1246.
- James, G. T. (1978). Inactivation of the protease inhibitor phenylmethylsulfonyl fluoride in buffers. *Analytical Biochemistry*, *86*(2), 574-579.
- Jiang, K., Sorefan, K., Deeks, M. J., Bevan, M. W., Hussey, P. J., & Hetherington, A. M. (2012). The ARP2/3 complex mediates guard cell actin reorganization and stomatal movement in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *24*(5), 2031-2040.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, *337*(6096), 816-821.
- Jones, L., Hamilton, A. J., Voinnet, O., Thomas, C. L., Maule, A. J., & Baulcombe, D. C. (1999). RNA-DNA interactions and DNA methylation in post-transcriptional gene silencing. *The Plant Cell*, *11*(12), 2291-2301.
- Jörgens, C. I., Grünewald, N., Hülkamp, M., & Uhrig, J. F. (2010). A role for ABIL3 in plant cell morphogenesis. *The Plant Journal*, *62*(6), 925-935.
- Kachar, B., & Reese, T. S. (1988). The mechanism of cytoplasmic streaming in characean algal cells: sliding of endoplasmic reticulum along actin filaments. *The Journal of Cell Biology*, *106*(5), 1545-1552.
- Kahr, W. H., Pluthero, F. G., Elkadri, A., Warner, N., Drobac, M., Chen, C. H., Richard, W., L., Li, L., Li, R., Thoeni, Q., C., Pan, J., Leung, G., Lara-Corrales, I., Murchie, R., Cutz, E., Laxe, R., M., Upton, J., Roifman, C., M., Yeung, R., S., M., Brumel, J., H. & Thoeni, C. (2017). Loss of the Arp2/3 complex component ARPC1B causes platelet abnormalities and predisposes to inflammatory disease. *Nature Communications*, *8* (14816), 1.
- Kandasamy, M. K., & Meagher, R. B. (1999). Actin-organelle interaction: Association with chloroplast in Arabidopsis leaf mesophyll cells. *Cytoskeleton*, *44*(2), 110-118.
- Kang, C. Y., Lian, H. L., Wang, F. F., Huang, J. R., & Yang, H. Q. (2009). Cryptochromes, phytochromes, and COP1 regulate light-controlled stomatal development in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *21*(9), 2624-2641.
- Kelleher, J. F., Atkinson, S. J., & Pollard, T. D. (1995). Sequences, structural models, and cellular localization of the actin-related proteins Arp2 and Arp3 from Acanthamoeba. *The Journal of Cell Biology*, *131*(2), 385-397.
- Korobova, F., & Svitkina, T. (2008). Arp2/3 complex is important for filopodia formation, growth cone motility, and neuriteogenesis in neuronal cells. *Molecular Biology of the Cell*, *19*(4), 1561-1574.
- Kovar, D. R., Staiger, C. J., Weaver, E. A., & McCurdy, D. W. (2000). AtFim1 is an actin filament crosslinking protein from Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal*, *24*(5), 625-636.
- Kotchoni, S. O., Zakharova, T., Mallery, E. L., Le, J., El-Assal, S. E. D., & Szymanski, D. B. (2009). The association of the Arabidopsis actin-related protein2/3 complex with cell membranes is linked to its assembly status but not its activation. *Plant Physiology*, *151*(4), 2095-2109.
- Lauffenburger, D. A., & Horwitz, A. F. (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell*, *84*(3), 359-369.

- Li, S., Blanchoin, L., Yang, Z., & Lord, E. M. (2003). The putative Arabidopsis arp2/3 complex controls leaf cell morphogenesis. *Plant Physiology*, 132(4), 2034-2044.
- Li, L. J., Ren, F. E. I., Gao, X. Q., Wei, P. C., & Wang, X. C. (2013). The reorganization of actin filaments is required for vacuolar fusion of guard cells during stomatal opening in Arabidopsis. *Plant, Cell & Environment*, 36(2), 484-497.
- Li, X. I. N., Li, J. H., Wang, W. E. I., Chen, N. Z., Ma, T. S., Xi, Zhang X., Lin H., Bai Y., Huang S. & Chen, Y. L. (2014). ARP2/3 complex-mediated actin dynamics is required for hydrogen peroxide-induced stomatal closure in Arabidopsis. *Plant, Cell & Environment*, 37(7), 1548-1560.
- Liu, Z. Q., Mahmood, T., & Yang, P. C. (2014). Western blot: technique, theory and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 6(3), 160.
- Le, J., El-Assal, S. E. D., Basu, D., Saad, M. E., & Szymanski, D. B. (2003). Requirements for Arabidopsis ATARP2 and ATARP3 during epidermal development. *Current Biology*, 13(15), 1341-1347.
- Le, J., Mallery, E. L., Zhang, C., Brankle, S., & Szymanski, D. B. (2006). Arabidopsis BRICK1/HSPC300 is an essential WAVE-complex subunit that selectively stabilizes the Arp2/3 activator SCAR2. *Current Biology*, 16(9), 895-901.
- Luan, Q., & Nolen, B. J. (2013). Structural basis for regulation of Arp2/3 complex by GMF. *Nature Structural & Molecular Biology*, 20(9), 1062-1068.
- Linardopoulou, E. V., Parghi, S. S., Friedman, C., Osborn, G. E., Parkhurst, S. M., & Trask, B. J. (2007). Human subtelomeric WASH genes encode a new subclass of the WASP family. *PLoS Genetics*, 3(12), e237.
- Machesky, L. M., Atkinson, S. J., Ampe, C., Vandekerckhove, J., & Pollard, T. D. (1994). Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from Acanthamoeba by affinity chromatography on profilin-agarose. *The Journal of Cell Biology*, 127(1), 107-115.
- Machesky, L. M., Mullins, R. D., Higgs, H. N., Kaiser, D. A., Blanchoin, L., May, Hall, M. E. & Pollard, T. D. (1999). Scar, a WASp-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(7), 3739-3744.
- Maritzen, T., Zech, T., Schmidt, M. R., Krause, E., Machesky, L. M., & Haucke, V. (2012). Gadkin negatively regulates cell spreading and motility via sequestration of the actin-nucleating ARP2/3 complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(26), 10382-10387.
- Martínek, J. (2015) Vizualizace a analýza distribuce komplexu ARP2/3 v rostlinách. Diplomová práce, Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta.
- Mathur, J. (2005). The ARP2/3 complex: giving plant cells a leading edge. *Bioessays*, 27(4), 377-387.
- Mathur, J., Mathur, N., Kernebeck, B., & Hülskamp, M. (2003a). Mutations in actin-related proteins 2 and 3 affect cell shape development in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 15(7), 1632-1645.
- Mathur, J., Mathur, N., Kirik, V., Kernebeck, B., Srinivas, B. P., & Hülskamp, M. (2003b). Arabidopsis CROOKED encodes for the smallest subunit of the ARP2/3 complex and controls cell shape by region specific fine F-actin formation. *Development*, 130(14), 3137-3146.
- McGough, A., Pope, B., Chiu, W., & Weeds, A. (1997). Cofilin changes the twist of F-actin: implications for actin filament dynamics and cellular function. *The Journal of Cell Biology*, 138(4), 771-781.
- Mercx, S., Tollet, J., Magy, B., Navarre, C., & Boutry, M. (2016). Gene inactivation by CRISPR-Cas9 in Nicotiana tabacum BY-2 suspension cells. *Frontiers in Plant Science*, 7.
- Moriyama, K., & Yahara, I. (2002). Human CAP1 is a key factor in the recycling of cofilin and actin for rapid actin turnover. *Journal of Cell Science*, 115(8), 1591-1601.
- Mõttus, M. (2015) Development of new plant F-actin reporters by a split-tagging system. Bakalářská práce, University of Tartu, Faculty of Science and Technology.
- Murashige, Toshio, and Folke Skoog. "A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures." *Physiologia Plantarum* 15.3 (1962): 473-497.
- Nagata, Toshiyuki, Yasuyuki Nemoto, and Seiichiro Hasezawa. "Tobacco BY-2 cell line as the "HeLa" cell in the cell biology of higher plants." *International Review of Cytology* 132 (1992): 1-30.
- Napoli, C., Lemieux, C., & Jorgensen, R. (1990). Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *The Plant Cell*, 2(4), 279-289.



NBCI databáze - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

- Nelson, B. K., Cai, X., & Nebenführ, A. (2007). A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in Arabidopsis and other plants. *The Plant Journal*, *51*(6), 1126-1136.
- Nielsen, O., Egel, R., & Hagan, I. M. (1998). FH3, a domain found in formins, targets the fission yeast formin Fus1 to the projection tip during conjugation. *The Journal of Cell Biology*, *141*(5), 1217-1228.
- Nishida, E. (1985). Opposite effects of cofilin and profilin from porcine brain on rate of exchange of actin-bound adenosine 5'-triphosphate. *Biochemistry*, *24*(5), 1160-1164.
- Nocarova, E., & Fischer, L. (2009). Cloning of transgenic tobacco BY-2 cells; an efficient method to analyse and reduce high natural heterogeneity of transgene expression. *BMC Plant Biology*, *9*(1), 44.
- Northrop, J., Weber, A., Mooseker, M. S., Franzini-Armstrong, C., Bishop, M. F., Dubyak, G. R., Tucker M. & Walsh, T. P. (1986). Different calcium dependence of the capping and cutting activities of villin. *Journal of Biological Chemistry*, *261*(20), 9274-9281.
- Okada, K., Bartolini, F., Deaconescu, A. M., Moseley, J. B., Dogic, Z., Grigorieff, N., & Goode, B. L. (2010). Adenomatous polyposis coli protein nucleates actin assembly and synergizes with the formin mDia1. *The Journal of Cell Biology*, *189*(7), 1087-1096.
- Palmieri, M., & Kiss, J. Z. (2005). Disruption of the F-actin cytoskeleton limits statolith movement in Arabidopsis hypocotyls. *Journal of Experimental Botany*, *56*(419), 2539-2550.
- Pan, F., Egile, C., Lipkin, T., & Li, R. (2004). ARPC1/Arc40 mediates the interaction of the actin-related protein 2 and 3 complex with Wiskott-Aldrich syndrome protein family activators. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(52), 54629-54636.
- Paunola, E., Mattila, P. K., & Lappalainen, P. (2002). WH2 domain: a small, versatile adapter for actin monomers. *FEBS Letters*, *513*(1), 92-97.
- Peng, X., Yan, T., & Sun, M. (2017). The WASP-Arp2/3 complex signal cascade is involved in actin-dependent sperm nuclei migration during double fertilization in tobacco and maize. *Scientific Reports*, *7*(43161).
- Perroud, P. F., & Quatrano, R. S. (2006). The role of ARPC4 in tip growth and alignment of the polar axis in filaments of *Physcomitrella patens*. *Cytoskeleton*, *63*(3), 162-171.
- Pollard, T. D., & Borisy, G. G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*, *112*(4), 453-465.
- Qi, T., Wang, J., Sun, Q., Day, B., Guo, J., & Ma, Q. (2017). TaARPC3, Contributes to Wheat Resistance against the Stripe Rust Fungus. *Frontiers in Plant Science*, *8*, 1245.
- Ramachandran, S., Christensen, H. E., Ishimaru, Y., Dong, C. H., Chao-Ming, W., Cleary, A. L., & Chua, N. H. (2000). Profilin plays a role in cell elongation, cell shape maintenance, and flowering in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *124*(4), 1637-1647.
- Rauhala, H. E., Teppo, S., NIEMELÄ, S., & Kallioniemi, A. (2013). Silencing of the ARP2/3 complex disturbs pancreatic cancer cell migration. *Anticancer Research*, *33*(1), 45-52.
- Rayment, I., Holden, H. M., Whittaker, M., Yohn, C. B., Lorenz, M., Holmes, K. C., & Milligan, R. A. (1993). Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science*, *261*, 58-58.
- Reddy, A. S., & Day, I. S. (2001). Analysis of the myosins encoded in the recently completed Arabidopsis thaliana genome sequence. *Genome Biology*, *2*(7), research0024-1.
- Reboulet, J. C., Kumar, P., & Kiss, J. Z. (2010). DIS1 and DIS2 play a role in tropisms in Arabidopsis thaliana. *Environmental and Experimental Botany*, *67*(3), 474-478.
- Robinson, R. C., Turbedsky, K., Kaiser, D. A., Marchand, J. B., Higgs, H. N., Choe, S., & Pollard, T. D. (2001). Crystal structure of Arp2/3 complex. *Science*, *294*(5547), 1679-1684.
- Rocca, D. L., Martin, S., Jenkins, E. L., & Hanley, J. G. (2008). Inhibition of Arp2/3-mediated actin polymerization by PICK1 regulates neuronal morphology and AMPA receptor endocytosis. *Nature Cell Biology*, *10*(3), 259-271.
- Rohatgi, R., Ma, L., Miki, H., Lopez, M., Kirchhausen, T., Takenawa, T., & Kirschner, M. W. (1999). The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell*, *97*(2), 221-231.
- Romero, S., Le Clainche, C., Didry, D., Egile, C., Pantaloni, D., & Carlier, M. F. (2004). Formin is a processive motor that requires profilin to accelerate actin assembly and associated ATP hydrolysis. *Cell*, *119*(3), 419-429.
- Roslan, H. A., Salter, M. G., Wood, C. D., White, M. R., Croft, K. P., Robson, F., Coupland, G., Doonan, J., Laufs, P., Tomsett, A., B. & Caddick, M. X. (2001). Characterization of the ethanol-inducible alc gene-expression system in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal*, *28*(2), 225-235.

- Sampathkumar, A., Lindeboom, J. J., Debolt, S., Gutierrez, R., Ehrhardt, D. W., Ketelaar, T., & Persson, S. (2011). Live cell imaging reveals structural associations between the actin and microtubule cytoskeleton in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 23(6), 2302-2313.
- Sheahan, M. B., Staiger, C. J., Rose, R. J., & McCurdy, D. W. (2004). A green fluorescent protein fusion to actin-binding domain 2 of Arabidopsis fimbrin highlights new features of a dynamic actin cytoskeleton in live plant cells. *Plant Physiology*, 136(4), 3968-3978.
- Smith, N. A., Singh, S. P., Ming-Bo, W., Stoutjesdijk, P. A., Green, A. G., & Waterhouse, P. M. (2000). Gene expression: total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature*, 407(6802), 319.
- Staiger, C. J., & Blanchoin, L. (2006). Actin dynamics: old friends with new stories. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(6), 554-562.
- Szymanski, D. B. (2005). Breaking the WAVE complex: the point of Arabidopsis trichomes. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(1), 103-112.
- Ueda, J., Miyamoto, K., Uheda, E., & Oka, M. (2011). Auxin transport and a graviresponse in plants: Relevance to ABC proteins. *Biological Sciences in Space*, 25(2\_4), 69-75.
- Valenta, R., Ferreira, F., Grote, M., Swoboda, I., Vrtala, S., Duchêne, M., Deviller, P., Meagher, R., B., McKinney E., & Heberle-Bors, E. (1993). Identification of profilin as an actin-binding protein in higher plants. *Journal of Biological Chemistry*, 268(30), 22777-22781.
- Veltman, D. M., & Insall, R. H. (2010). WASP family proteins: their evolution and its physiological implications. *Molecular Biology of the Cell*, 21(16), 2880-2893.
- Vidali, L., McKenna, S. T., & Hepler, P. K. (2001). Actin polymerization is essential for pollen tube growth. *Molecular Biology of the Cell*, 12(8), 2534-2545.
- Vlot, A. C., Liu, P. P., Cameron, R. K., Park, S. W., Yang, Y., Kumar, D., Zhou, F., Padukkavidana, T., Gustafsson, C., Pichersky, E. & Klessig, D. F. (2008). Identification of likely orthologs of tobacco salicylic acid-binding protein 2 and their role in systemic acquired resistance in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal*, 56(3), 445-456.
- Vogel, C., & Marcotte, E. M. (2012). Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature Reviews. Genetics*, 13(4), 227.
- Wang, P. S., Chou, F. S., Ramachandran, S., Xia, S., Chen, H. Y., Guo, F., Suraneni, P., Maher, B., J. & Li, R. (2016a). Crucial roles of the Arp2/3 complex during mammalian corticogenesis. *Development*, 143(15), 2741-2752.
- Wang, P., Richardson, C., Hawes, C., & Hussey, P. J. (2016b). Arabidopsis NAP1 regulates the formation of autophagosomes. *Current Biology*, 26(15), 2060-2069.
- Wang, Y. S., Motes, C. M., Mohamalawari, D. R., & Blancaflor, E. B. (2004). Green fluorescent protein fusions to Arabidopsis fimbrin 1 for spatio-temporal imaging of F-actin dynamics in roots. *Cytoskeleton*, 59(2), 79-93.
- Weaver, A. M., Karginov, A. V., Kinley, A. W., Weed, S. A., Li, Y., Parsons, J. T., & Cooper, J. A. (2001). Cortactin promotes and stabilizes Arp2/3-induced actin filament network formation. *Current Biology*, 11(5), 370-374.
- White, J. L., & Kaper, J. M. (1989). A simple method for detection of viral satellite RNAs in small plant tissue samples. *Journal of Virological Methods*, 23(2), 83-93.
- Winter, D., Lechler, T., & Li, R. (1999). Activation of the yeast Arp2/3 complex by Bee1p, a WASP-family protein. *Current Biology*, 9(9), 501-505.
- Yarar, D., To, W., Abo, A., & Welch, M. D. (1999). The Wiskott-Aldrich syndrome protein directs actin-based motility by stimulating actin nucleation with the Arp2/3 complex. *Current Biology*, 9(10), 555-561.
- Yanagisawa, M., Zhang, C., & Szymanski, D. B. (2013). ARP2/3-dependent growth in the plant kingdom: SCARs for life. *Frontiers in Plant Science*, 4 (166).
- Yang, Z. T., Wang, M. J., Sun, L., Lu, S. J., Bi, D. L., Sun, L., Song, Z., Zhang, S., Zhou, S. & Liu, J. X. (2014). The membrane-associated transcription factor NAC089 controls ER-stress-induced programmed cell death in plants. *PLoS Genetics*, 10(3), e1004243.
- Yarmola, E. G., Somasundaram, T., Boring, T. A., Spector, I., & Bubba, M. R. (2000). Actin-latrunculin A structure and function differential modulation of actin-binding protein function by latrunculin A. *Journal of Biological Chemistry*, 275(36), 28120-28127.
- Zhao, Y., Pan, Z., Zhang, Y., Qu, X., Zhang, Y., Yang, Y., Jiang, X., Huang, S., Yuan, M., Schumaker, K., S. & Guo, Y. (2013). The actin-related Protein2/3 complex regulates mitochondrial-associated calcium signaling during salt stress in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 25(11), 4544-4559.
- Zhao, X., Yang, Z., Qian, M., & Zhu, X. (2001). Interactions among subunits of human Arp2/3 complex: p20-Arc as the hub. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 280(2), 513-517.

- Zhang, X., Dyachok, J., Krishnakumar, S., Smith, L. G., & Oppenheimer, D. G. (2005). IRREGULAR TRICHOME BRANCH1 in Arabidopsis encodes a plant homolog of the actin-related protein2/3 complex activator Scar/WAVE that regulates actin and microtubule organization. *The Plant Cell*, *17*(8), 2314-2326.
- Zhang, C., Mallery, E., Reagan, S., Boyko, V. P., Kotchoni, S. O., & Szymanski, D. B. (2013). The endoplasmic reticulum is a reservoir for WAVE/SCAR regulatory complex signaling in the Arabidopsis leaf. *Plant Physiology*, *162*(2), 689-706.
- Zhang, Y., Xiao, Y., Du, F., Cao, L., Dong, H., & Ren, H. (2011). Arabidopsis VILLIN4 is involved in root hair growth through regulating actin organization in a Ca<sup>2+</sup>-dependent manner. *New Phytologist*, *190*(3), 667-682.
- Zou, J. J., Zheng, Z. Y., Xue, S., Li, H. H., Wang, Y. R., & Le, J. (2016). The role of Arabidopsis Actin-Related Protein 3 in amyloplast sedimentation and polar auxin transport in root gravitropism. *Journal of Experimental Botany*, *67*(18), 5325-5337.
- Zuchero, J. B., Coutts, A. S., Quinlan, M. E., La Thangue, N. B., & Mullins, R. D. (2009). p53-cofactor JMY is a multifunctional actin nucleation factor. *Nature Cell Biology*, *11*(4), 451-459.
- Zuo, Jianru, Qi-Wen Niu, and Nam-Hai Chua. "An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants." *The Plant Journal* 24.2 (2000): 265-273.