

**Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze**

Katedra experimentální biologie rostlin



**Pokročilé metody vizualizace endocytózy a exocytózy**

**na plazmatické membráně rostlinné buňky**

bakalářská práce

Jitka Ortmannová

školitel: Mgr. Matyáš Fendrych

konzultant: Mgr. Ivan Kulich

Praha 2011

Poděkování za trpělivost, cenné rady a pomoc při zpracování práce patří Mgr. Matyáši Fendrychovi, jako vedoucímu práce a Mgr. Ivanu Kulichovi, jako konzultantovi práce.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, s použitím citované literatury, cennými radami vedoucího práce Mgr. Matyáše Fendrycha a souhlasím s jejím zveřejněním.

V Praze dne 9.5.2011

Jitka Ortmannová

<b>1. ÚVOD.....</b>	<b>6</b>
<b>2. ENDOCYTÓZA .....</b>	<b>6</b>
2.1. Plazmatická membrána a její domény.....	8
2.2. Endocytóza dle mechanismu .....	10
2.2.1. Clathrinová endocytóza.....	10
2.2.2. Endocytóza fluidní fáze .....	12
2.2.3. Fagocytóza .....	12
2.3. Role v rostlinném těle.....	13
<b>3. EXOCYTÓZA .....</b>	<b>14</b>
3.1. Kotvení váčků (vesicle tethering).....	15
3.2.1. Exocyst u rostlin .....	17
3.3. SNARE komplex a fúze membrán .....	19
<b>4. POKROČILÉ METODY VIZUALIZACE ŽIVÝCH BUNĚK .....</b>	<b>20</b>
4.1. Fluorescenční Mikroskopie .....	23
4.2. Konfokální mikroskopie.....	24
4.3. Vybrané techniky zlepšující rozlišení epifluorescenčního i konfokálního mikroskopu .....	25
4.3.1. Dekonvoluce .....	25
4.3.2. SDM (Nipkow disc microscopy).....	26
4.3.3. $4\pi$ mikroskopie a multifotonová .....	28
4.3.4. TIRFM (total internal reflection microscopy).....	29
4.4. Techniky překračující difrakční limit.....	32
4.4.1. STED.....	32
4.4.2. PALM a STORM .....	34
4.4.4. SIM .....	35
4.4.5. AFM (Atomic force microscopy).....	37
<b>5. ZÁVĚR.....</b>	<b>38</b>
<b>6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>39</b>

## **Abstrakt**

Váčkový transport se účastní realizace vývojového programu rostlinných buněk. Schopnost zacílit váčky do konkrétních míst plazmatické membrány je klíčová pro polarizaci buňky a růst a vývoj rostliny. Endocytóza recykluje komponenty membrány i buněčných stěn a podílí se na ustavení polarity buněk. K rozšíření dosavadních znalostí o membránovém transportu, je třeba pozorovat chování jeho komponent s vysokým rozlišením v živých buňkách neporušených organismů a v reálném čase. Metody, které toto umožní, spadají především do oboru světelné mikroskopie a nanoskopie a často překračují tzv. difrakční limit (200 nm). Vybrané nanoskopické techniky jako jsou PALM, STORM, SIM, STED, nabízejí vícebarevné vizualizace i 3D rekonstrukce proteinových komplexů či membránových klastrů. U rostlin zatím příliš uplatněny nebyly, ale nebyly popsány zásadní překážky pro jejich použití.

**Klíčová slova:** clathrin, difrakční limit, endocytóza, exocytóza, exocyst, fluorofor, mikroskopie, rozlišení, rostlinná buňka

## **Abstract**

Endocytosis and exocytosis participate in developmental program of plants. The ability to target exocytic vesicles to particular domains of plasma membrane is crucial for polarization, growth and development. Plasma membrane are recycled via various mechanisms of endocytosis which participates also in establishing plant cell polarity. To extend our knowledge of membrane transport it is essential to observe the activity of its components with high resolution in living cells of intact organisms in real time. Such methods belong mainly into the field of light microscopy and nanoscopy exceeding often diffraction limit (200 nm). Nanoscopic techniques like PALM, STORM, SIM, STED, offer multicoloured visualization of fluorophores and high resolution 3D reconstruction of cellular component. These methods have been used only sporadically in the field of plant biology but there should be no serious obstacles for their employment.

**The key words:** clathrin, diffraction limit, endocytosis, exocytosis, exocyst, fluorophore, plant cell, microscopy, resolution

## Seznam použitých zkratek

AP adaptorový protein  
*At Arabidopsis thaliana*  
BS buněčná stěna  
CHC clathrin heavy chain  
CLC clathrin light chain  
CLSM konfokální laserový skenovací mikroskop  
CM konfokální mikroskop  
DRM detergent resistance membrane  
DRP dynamin related protein  
GA golgiho aparát  
GTP guanine nucleotid triphosphate  
ER endoplasmatické retikulum  
FM fluorescenční mikroskop  
MTC multitering complex  
NA numerická apertura  
PA-FP fotoaktivace schopný fluorescentní protein  
PALM (photoactivated localization microscopy)  
PM plazmatická membrána  
PSF point spread function  
SDM spinning disc mikroskop  
SIM simultaneous illumination microscopy  
STED stimulated emission depletion  
STORM stochastic reconstruction microscopy  
TEM transmisní elektronový mikroskop  
TIRFM total internal reflection microscopy  
TGN trans golgi network  
VAEM variable angle epifluorescence microscopy  
 $\lambda$  vlnová délka

## 1. Úvod

Endocytóza i exocytóza jsou membránové transporty konzervované v celé eukaryotické říši a jejich molekulární podstata je do značné míry odhalována díky detailnímu výzkumu modelu kvasinkových a savčích buněk. Na základě evoluční vzdálenosti i mnoha studií je patrné, že rostliny se v mnoha mechanismech i funkcích membránového transportu liší. A i když molekulární biologie, buněčná fyziologie, bioinformatika, statistika, atd. přináší mnoho podstatných dat, pro porozumění chování a dynamiky jednotlivých molekul, membránových domén či organel, je ale nezbytné umět pozorovat buněčné procesy přímo v živých organismech. Obecnou disciplínou vizualizace struktur lidskému oku nerozlišitelných je mikroskopie a právě její pokročilé metody umožňují dnes překročit difrakční limit a zabývat tzv. nanoskopii, tedy pozorováním na úrovni desítek nanometrů rozlišení i v živých organismech.

Cílem práce bylo seznámit se s novými metodami pozorování živých buněk rostlin a buněčných procesů, jakými jsou endocytóza a exocytóza. Oblast popisu se zaměřuje na události transportu bezprostředně spojené s plazmatickou membránou, jejíž vlastnosti jsou zmíněny v kapitole o endocytóze. Nejprve jsou tedy velmi obecně uvedeny molekulární mechanismy tvorby endocytických váčků, kde je více rozvedena clathrinová endocytóza s ohledem na poměr dosažených znalostí v tomto směru, a splývání exocytických váčků s plazmatickou membránou, kde je rozvedena část týkající exocystu, uzavazovacího proteinového komplexu, vzhledem k budoucímu zaměření diplomové práce. Z důvodu rozsahu práce byl vynechán vliv cytosketu a buněčné signalizace, nebo jsou zmíněny jen okrajově. V druhé polovině práce jsou představeny obecné principy světelné mikroskopie, jako metody vizualizace neporušených živých buněk, její vybrané techniky široce využívané i nové metody, čekající na své uplatnění u rostlinných buněk.

## 2. Endocytóza

Každá buňka je živým systémem schopným vyměňovat se svým okolím, jak látky, tak energii. Je vymezena semipermeabilní plazmatickou membránou (PM), která je tvořena specifickou fosfolipidovou dvojvrstvou, přes níž samovolně prochází hydrofobní molekuly (CO<sub>2</sub>, steroidy). Malé nenabitě hydrofilní molekuly jako voda a glycerol mohou také difundovat volně, ale nabitě molekuly, ionty a makromolekuly vyžadují specifický transport. Transport iontů a malých nabitých molekul, jako jsou aminokyseliny a sacharidy, zajišťují membránové proteiny. Jedná se obecně o 3 typy membránových proteinů: pumpy, kanály a

přenašeče, vytvářející gradienty molekul na PM a diferencující prostředí intracelulární od extracelulárního. Regulovaný vstup makromolekul, větších částic či většího množství molekul zajišťuje, pro eukaryota charakteristický a evolučně konzervovaný, mechanismus endocytózy.

**CHARAKTERISTIKA** Endocytóza slouží eukaryotům k příjmu živin a signálů, recyklaci membránových komponent, udržení homeostáze, sekreci extracelulární matrix, obraně před patogeny i regulaci vývoje. Živočišné buňky využívají obecně několika způsobů transportu makromolekul do buňky, dle mechanismu to jsou: fagocytóza, macropinocytóza, clathrinem zprostředkovaná a clathrinově nezávislá endocytóza. Sama o sobě závisí pak na konkrétním složení a dynamice plazmatické membrány, dynamice cytoskeletu, vnitřních i vnějších signálech, metabolismu, životní fázi a stavu buňky (Murphy et al. 2005).

**SITUACE U ROSTLIN** Buňky vyšších rostlin mají za sebou vlastní evoluční vývoj spojený s životní strategií přisedlého fotosyntetizujícího organismu. Rostlinné genomy během něho prošly řadou změn, následkem kterých u nich došlo k diverzifikaci funkcí jednotlivých genů i celých genových rodin (např. Vernoud et al. 2003, Sanderfoot 2007, Chong et al. 2010). Proto i proteiny účastníci se endocytózy či exocytózy mohou mít specifické lokalizace, funkce, nebo mohou chybět. Některé jsou naopak unikátní pro rostliny, stejně jako mechanismy, kterých se účastní (Geldner et al. 2003, Richter et al. 2007). Přesto častým způsobem studia rostlinných genů, proteinů je porovnání s jejich protějšky u lépe prozkoumaných buněk opisthokont. Rostlinné buňky syntetizují vně plazmatické membrány jedinečný typ extracelulární matrix, polysacharidovo-proteinovou buněčnou stěnu (BS), která je jejich „živou“ a dynamickou součástí. Složení BS buňka reguluje mimo jiné endocytózou i exocytózou (Sandhu et al. 2009). BS slouží zároveň jako mechanická opora i nástroj regulace růstu a diferenciaci. Stanovení velikosti, tvaru a následně i celých orgánů vymezují rovina buněčného dělení stejně jako míra buněčné expanze. Během buněčného růstu, tedy zvětšování protoplastu, klade pevná BS odpor. Mezi protoplastem a BS vzniká turgorový tlak (Sandhu et al. 2009). Turgor byl pokládán za hlavní energetickou bariéru pro rostlinnou endocytózu, které nebyl přikládán velký význam v membránovém transportu rostlin (Cram 1980). Tento názor byl pomalu ale jistě vyvrácen studii internalizace proteinů (Grebe et al. 2003, Geldner et al. 2003, Meckel et al. 2004, Dhonushe et al. 2007). Mechanismus fagocytózy byl sledován u protoplastů (Ueda et al. 1978, Verma 1992) a v souvislosti se symbiózou s bakteriemi (Son et al. 2003), byla popsána clathrinová endocytóza (Holstein 2002, Dhonushe et al. 2007) a endocytóza fluidní (kapalně) fáze (Baluška et al. 2004). Důležitost endocytózy byla potvrzena i ve vysoce turgescenčních svěřacích buňkách průduchů, kde se podařilo ukázat konstitutivní endocytózu draslíkového kanálu KAT1 (Meckel et al. 2004).

Transport látek do buněk je u rostlin minimálně stejně komplexním procesem jako u živočichů, co se týče mechanismu i kompartmentace intracelulárních drah (Oneli et al. 2008).

**BLÝSKÁ SE NA LEPŠÍ ČASY?** Studium endomembránového systému a jeho cest, endocytózy a exocytózy je velmi širokým tématem, které je zkoumáno pomocí genetických a biochemických analýz, jimiž jsou určovány proteiny nezbytné pro jeho fungování a regulace. K tomu aby bylo možné ho lépe pochopit i interpretovat, je ale zapotřebí studia živých buněk přímo v těle rostlin a studovat dynamiku jeho komponent a nejlépe jejich komunikaci. S příchodem nových technik vizualizace dynamiky buněčného obsahu (Sparkes et al. 2011), novým značením proteinů (Bolte et al. 2004, Meckel et al. 2004, Huang et al. 2010) a použitím starých inhibitorů (Geldner et al. 2001), lze transportní procesy a interakce jednotlivých proteinů sledovat in vivo (Fujimoto et al. 2008, Konopka and Bednarek 2008b). Je však otázkou zdali se použitím transgenních rostlin a mutantů neztrácí přirozená fyziologická odpověď rostliny na dané podněty. Navíc většina studií pracuje s několika málo rostlinnými druhy jako je *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Physcomitrella patens*, a proto otázka obecnosti transportních mechanismů je daleko od svého zodpovězení.

## **2.1. Plazmatická membrána a její domény**

Je komunikační zónou cytoplasmy s okolím buňky, na svém povrchu vystavuje receptory pro příjem signálů a je spojena s cytoskeletem uvnitř cytosolu i s BS vně cytosolu. Plazmatická membrána nevzniká de novo, ale z přítomných membrán v buňce. Je to vysoce dynamická struktura a pro život buňky je nezbytná její neustálá recyklace (Boutté et al. 2006, Dhonukshe et al. 2007). Růst PM i obměna ve složení jsou zajišťované mimo jiné endocytózou a exocytózou. Aktuální složení PM má zpětně vliv na oba z transportů. Regulace složení membrány je esenciální pro polarizaci, růst i morfogenezi buněk. Složení membrány ovlivňuje receptorem zprostředkovanou endocytózu (Horn et al. 1989) díky níž je buňka regulována procesy na vyšších úrovních (fytohormony, miRNA) a pomocí nichž sama reguluje svou citlivost na vnější podněty.

**LIPIDOVÉ DOMÉNY** Membrána vykazuje heterogenitu, její složky mají schopnost sdružovat se a vytvářet domény různých vlastností podstatných pro řízený transport ven i dovnitř buňky (Gutierrez et al. 2010).

**CHARAKTERISTIKA** Regulaci transportních procesů a polarizaci buněk pravděpodobně usnadňují detergent rezistentní domény DRM (izolovaná frakce nerozpuštěných membrán po ošetření detergentem) či lipidové rafty. Jedná se o oblasti membrán (v rozmezí 50 až 200 nm)



s větší mocností a nižší fluiditou bohaté na steroly, sfingolipidy a specifické proteiny (Simons and Ikonen 1997). Ovšem fakt, že molekula není přítomna v DRM frakci, ještě neznamená, že není součástí lipidového raftu v jeho nativní podobě. Zásadní poznatky může přinést výzkum složení a dynamiky membrán živých buněk. Rafty mohou fungovat jako podnože pro specifické proteiny, může jich tedy existovat několik druhů. Ty se mohou účastnit konkrétních funkcí membrány, např. selekce dopravovaných molekul do sousedních buněk, nebo polarizovaného růstu (Mongrand et. al 2010).

**STRUKTURA** Izolované DRM obsahují především lipidy a steroly, z proteinů GPI kotvené proteiny, protein kinasy, receptory spřažené s G proteiny, proto je pravděpodobná jejich funkce v příjmu signálů (Peskan et al. 2001). Pro rostlinné DRM je typické širší spektrum sterolů, jako stigmasterol, sitostreol, 24 - methylcholesterol, cholesterol i specifické sfingolipidy (Laloi et al. 2007). Sterolové složení PM se významně podílí na kompozici celých lipidových domén a má vliv na řadu signalizačních i biosyntetických drah (Souter et al. 2002). Grebe a kolektiv ukázali závislost endocytózy sterolů z PM na funkčním aktinovém cytoskeletu. Podpořil tím hypotézu recyklace PM proteinů endocytózou zprostředkovanou lipidovými rafty, pro kterou se sbírají důkazy dodnes (Grebe et al. 2003). U živočichů lipidové rafty a jejich komponenty usnadňují signalizační i transportní procesy, především přes vazbu na protein caveolin, díky němuž dochází k invaginaci membrán (Nabi and Le 2003).

**FUNKCE** Jejich základní funkcí je sdružovat vybrané proteiny do lipidových domén a usnadňovat jejich interakce, tvořit centra polarizace a signalizace (Simons and Ikonen 1997), tedy i centra transportu a recyklace. U rostlin je distribuce lipidů a sterolů podstatná pro polarizaci povrchových proteinů, jako je přenašeč auxinu PIN2. A jelikož je PIN2 dopravován do PM exocytózou a polarizován pomocí endocytózy, raftová dynamika je součástí regulace membránového transportu (Dhonukshe et al. 2008, Men et al. 2008). Složení a distribuce lipidových raftů může mít vliv nejen při signalizaci buněk, prvotní odpovědi na patogena, buněčnou polaritu či endocytózu (Mongrand et al. 2010), ale i na mezibuněčnou komunikaci pomocí plazmodesmat, typ rostlinných mezibuněčných spojů (Thomas et al. 2008). Navíc distribuce sterolů spolu s clathrinovou endocytózou ovlivňuje rozmístění KNOLLE proteinu (viz kapitola SNARE komplex a fúze membrán) v rovině buněčného dělení, lipidové rafty tedy mohou být zapojeny v cytokinezi (Boutté and Grebe 2009). Složení membrány má vliv na rostlinnou endocytózu i exocytózu. Ovšem není jasné, jestli jde opravdu o vliv složení specifických membránových domén, jakými jsou lipidové rafty. K lepšímu pochopení dynamiky membránových domén a polarizace membrány může pomoci sledování

jednotlivých molekul a domén, tedy metodami o rozlišení desítek nanometrů jako je STED, SIM, STORM, PALM (Gutierrez et al. 2010).

**TEORIE RECYKLAČNÍCH DOMÉN** Změna tvaru buněk dle vývojového plánu souvisí bezprostředně s cílenou sekrecí proteinových, lipidových i sacharidových komponent na povrch buněk. Tzv. aktivní kortikální domény (ACDs), by mohla být místa PM spojená s aktivní exocytózou doprovázenou recyklací a tak zodpovědná za polaritu buněk (Žárský et al. 2009). Na existenci takových domén u rostlin ukazuje více studií (Boutté et al. 2006, Dhonukshe et al. 2008, Men et al. 2008, Van Damme et al. 2011). Teoreticky by mohlo jít o domény specializované, např. přítomností jednotlivých Rab GTPáz a proteinového komplexu exocyst. ACDs mimo jiné poukazují na význam spolupráce endocytózy s exocytózou při formování polarity buněk (Žárský and Potocký 2010).

## **2.2. Endocytóza dle mechanismu**

U rostlin byla popsána clathrinová i na clathrinu nezávislá endocytóza, jako je endocytóza fluidní fáze či fagocytóza. A jelikož byly u rostlin popsány lipidové rafty, je pravděpodobná i jejich účast, jako platform pro proteiny usnadňující endocytózu i exocytózu a polarizovanou sekreci (Murphy et al. 2005, Boutté and Grebe 2009).

### **2.2.1. Clathrinová endocytóza**

Mechanismus clathrinové endocytózy zahrnuje tvorbu obalených váčků o velikosti kolem 70 - 90 nm, ty jsou menší než u živočichů pravděpodobně důsledkem působení turgorového tlaku (Holstein 2002, Barth and Holstein 2004, Meckel et al. 2004). Zdá se, že jde o majoritní proces internalizace membrán, makromolekul, proteinů u rostlin (Dhonukshe et al. 2007, Dhonukshe et al. 2008), stejně jako je tomu u živočichů, kde byly clathrinové struktury pozorovány pomocí TEM již v 60 letech 20. století (Kanaseki and Kadota 1969).

Clathrin je protein, který skládá obal kolem internalizované membrány, až vytvoří váček připravený k oddělení (Pearse 1976, Crowther and Pearse 1981). Ke skládání clathrinu dochází na specifických místech membrány s dostatkem proteinů potřebných k tvorbě váčků, vytváří se tzv. clathrinové klastry. Clathrinová základní strukturální jednotka triskelion je složena ze třech těžkých řetězců clathrininu ( $M_r \sim 180\text{kDa}$ ), ty doplňují tři lehké řetězce ( $M_r \sim 30\text{kDa}$ ), (Fotin et al. 2006). Triskeliony interagují spolu navzájem a s periferními adaptorovými proteiny (AP) za tvorby obalu kolem váčku. AP spolu s příslušnými proteiny vybírají substrát váčku, účastní se ale i formování a oddělení váčku (Robinson and Bonifacino

2001, Holstein 2002). AP jsou monomerní nebo skládají heterotetramerický komplex v místě internalizace membrány. AP komplex většinou interaguje s GTPázou a membránovými fosfatidylinosity (PtdInsP), (Doherty and McMahon 2009). Malé GTP vazebné proteiny z rodiny Ras, jejichž členy jsou Arf, Rho, Rab, Ran, Ras GTPázy, se obecně podílí na transportu váčků a jeho regulacích v celém endomembránovém systému. Fungují jako molekulární spínače aktivující své efektorové proteiny. Samy jsou aktivní ve stavu vazby s GTP, v němž setrvávají, dokud nedojde k zapnutí jejich hydrolytické funkce proteiny z rodiny GAP (GTPázy aktivující proteiny). Aktivní stav je přepínán proteiny rodiny GEF (guanosin nucleotid exchange faktor), (Molendijk et al. 2004). Na tvorbě clathrinových váčků se podílí rodina Arf GTPáz (Nielsen et al. 2008). ArfB rekrutují clathrin přes AP na PM, Arf1 na membránu TGN, proto je jejich aktivita podstatná nejen pro děje endocytické nýbrž i exocytické (Matheson et al. 2008). Rodina velkých GTPáz dynaminů se účastní excize váčku. Dynaminy skládají šroubovici kolem krčku váčku a mechanicky ho zaškrcují, při tom využívají změny konformace v závislosti vazby GTP/GDP (Marks et al. 2001). Po oddělení váčku dojde k jeho odpláštění. Zprvu se myslelo, že k rozpadu obalu dochází po uštípnutí váčku. Dnes se ale debatuje o funkci obalových proteinů v interakci s uzavíracími komplexy (Bröcker et al. 2010).

ROSTLINY A CLATHRIN Pro přítomnost clathrinové mašinerie v rostlinných buňkách hovoří mnoho studií (Emons and Traas 1986, Blackbourn and Jackson 1996, Barth and Holstein 2004, Dhonukshe et al. 2007, Oneli et al. 2008). Účast clathrinu (CHC) na recyklaci membrán popsali Blackbourn a Jackson (Blackbourn and Jackson 1996). Vernoud a kolektiv identifikovali Arf GTPázy i Arf GEF a Arf GAP pro GTPázy v *Arabidopsis thaliana* (Vernoud et al. 2003). Zapojení komplexů AP v clathrinové endocytóze i monomerních AP ukazuje jejich popis učiněný na modelu At, kde monomerní At-AP180 a At- $\alpha$ C-Ad, podjednotka komplexu AP2, vykazovali interakce s clathrinem i PM (Barth and Holstein 2004). Dhonkshe a kolektiv naproti tomu ukázali, že AP jsou sice potřebné pro clathrinovou endocytózu (PIN proteinů), ovšem nikoliv nezbytné (Dhonukshe et al. 2007). Rostlinné DRP (dynamin related protein) jsou příbuzné savčích dynaminů, ale více diverzifikované. V membránovém transportu hrají roli DRP1A-E a DRP2A-B (Hong et al. 2003, Kang et al. 2003, Bednarek and Backues 2010). Konkrétně komplex DRP1A s DRP2B zdá se řídit uvolnění clathrinového váčku i jeho maturaci na donorové membráně (Fujimoto et al. 2008). DRP1C vykazuje interakci s CLC (Konopka and Bednarek 2008a, Konopka et al. 2008). Vývoj širokého spektra DRP ukazuje na existenci několika různých clathrinových drah endocytózy u rostlin, nebo na membránový transport nezávislý na clathrinu. Pozorování

živých buněk s patřičně značenými proteiny clathrinové endocytózy ukázalo, že je majoritním transportem proteinů z rodiny PIN, proto se podílí na auxinem ustavené polaritě (Dhonukshe et al. 2007, Dhonukshe 2008). Významně se projevuje v recyklaci membrán (Oneli et al. 2008) i v cytokinezi, při lokalizaci cytokineticky specifických proteinů a při splývání buněčné přepážky s definovanými úseky mateřské PM (Boutté et al. 2009, Van Damme et al. 2011).

### **2.2.2. Endocytóza fluidní fáze**

Během tohoto typu endocytózy dochází k internalizaci extracelulární tekutiny a jejího nescifického obsahu do váčků velikosti menšího fagosomu (jednotky  $\mu\text{m}$ ). Fluorescenční značení barvou LY (lucifer yellow), která neprochází přes membránu, ale váže se k ní, umožnilo pozorovat endocytózu fluidní fáze v plazmodesmatech buněk přechodové zóny kořenového vrcholu kukuřice (Baluška et al. 2004). Ukázalo se, že jde o endocytózu závislou na aktinu a myosinu (myosin VIII) a naopak nezávislou na cytoskeletu mikrotubulovém. Polymerizace a pohyb aktinových filament jsou důležité při pučení váčku i pohybu endosomů, mimo jiné je znám jeho význam pro recyklaci stavebních komponent buněčné stěny (Baluška et al. 2002). Autoři diskutují, že síla myosinových motorů napojených na aktinová filamenta interagující s membránou by mohla být hybnou silou pro endocytózu fluidní fáze, která je v buňkách kořene důležitým transportem asimilátů. Internalizace kapalných živin (sacharóza) z roztoku byla ukázána i na modelu buněčné kultury javoru jasanolistého, kde mimo transport sacharidů přes membránové přenašeče probíhala i jejich endocytická doprava (Etxeberria et al. 2005).

Práce studující clathrinovou endocytózu sice ukazují její majoritní zastoupení, jako mechanismu internalizace u rostlinných buněk, dokládají zároveň existenci na clathrinu nezávislých procesech, které mohou být zdrojem např. specifického transportu či bypassem clathrinové endocytózy (Dhonukshe et al. 2007, Dhonukshe et al. 2008, Onelli et al. 2008).

### **2.2.3. Fagocytóza**

Jde o speciální mechanismus umožňující buňkám pohlcení větší potravy (od 200 nm po několik  $\mu\text{m}$ ), internalizaci symbionta (bakterie) či cesta pro vstup patogena (viry, bakterie, houby). Nejprve dochází k rozpoznání povrchových epitopů buňky a cizorodé částice, následuje dynamická přestavba aktinového cytoskeletu a exocytóza membrán, aby mohla být celá partikule obalena membránou a jako endosom (fagosom) internalizována do cytosolu.

Má - li mít fagocytóza efekt výživy, musí ještě dojít k fúzi fagosomu s vakuolou (lyzomy u živočišných buněk), kdy je obsah natráven na živiny použitelné pro metabolismus buňky (Šamaj et al 2004). Rostlinné protoplasty (buňky zbavené buněčné stěny) jsou schopné požití latexovou kuličku i jiný protoplast, ač se to zdá být velké sousto a inkorporují je do své vakuoly (Ueda et al. 1978). Dokáže však buňka pojmout tak velká tělesa i přes buněčnou stěnu?

Rostliny si ve svém životě pomáhají mutualistickými symbiózami s řadou organismů. Názornou ukázkou fagocytózy jako vstupu symbionta do rostliny, je příklad čeledi fabaceae s bakterií *Rhizobium*, která vstupuje přes rhizodermis kořene a cestu si usnadňuje produkcí vlastních celuláz (Verma 1992). Pro fungující fagocytózu je esenciální malá GTPáza sRab7, homologická ke kvasinkové Rab7, zajišťuje fúzi endocytických váčků s fagosomem. Díky ní je povrch fagosomu změněn do podoby symbiosomu. Jinak by byla *Rhizobia* strávena jako potrava, úspěšná symbióza je tady závislá na fungujícím transportu hostitelské buňky (Son et al. 2003).

Je možné, že bakterie nejsou fagocytovány rostlinou jen za účelem symbiotických či naopak patogenních pohnutek. Může si jimi rostlina zpestřovat svůj fototrofní program? Internalizace bakterií běžně do buněk rostlin nevstupujících, jako je *Escherichia coli*, byla popsána u kořenových buněk rajčete a *At*. Mechanismus autoři jen nastínili: buňky rostlin naruší svou buněčnou stěnu enzymy, zároveň na svůj povrch přimknou shluky bakterií v obalu podobného složení celulózové stěně a internalizují do cytosolu, což potvrdili snímky z TEM. Bakterie neopustili buňky kůry kořene a po několika dnech zmizely (Paungfoo-Lonhienne et al. 2010). Zatím se ale spíše jedná o úsměvnou představu. Nebylo totiž určeno, jestli enzymy narušující BS jsou původem z rostliny či bakterie. Rostliny jsou autotrofními organismy, jejichž buňky nepotřebují organickou výživu, na druhou stranu ji ale umí využít (masožravé rostliny, výživná media). V buněčné endocytóze má rostlinná fagocytóza minoritní zastoupení.

### 2.3. Role v rostlinném těle

Endocytóza je v rostlinných tělech a buňkách potřebná k internalizaci a recyklaci membrán, membránových proteinů, lipidů a sterolů (Men et al. 2008, Geldner et al. 2001), k příjmu extracelulárních tekutin (Baluška et al. 2004) i fagocytóze či úspěšné symbióze (Son

et al. 2003). Rostliny jsou schopné endocytovat komponenty svých buněčných stěn, jako pektiny, a modulovat tak jejich vlastnosti (Baluška et al. 2002).

Endocytóza není jen dějem končícím internalizací membrány. Samotné vytvoření váčku je regulovaným procesem a určuje osud váčku. Je součástí endomembránového systému, jeho dopravních drah a komunikací, zahrnující buněčné kompartmenty zodpovědné za syntézu proteinů (endoplazmatické retikulum ER), jejich maturaci a úpravu (Golgiho aparát - od cis po trans), degradaci buněčných komponent (vakuoly) a třídění (endosomální komplex), (Jürgens and Geldner 2002, Žárský et al. 2009). Do buňky vstupují makromolekuly endocytózou a ven exocytózou, souhra obou transportů a jejich lokalizovaná polarizace umožňuje asymetrický růst a vývoj, nezbytný pro morfogenezi rostlinného těla, což je spojeno s transportem fytohormonů (jako je auxin) (Geldner and Jürgens 2006, Hwang and Robinson 2009). Pozoruhodné, nikoliv překvapivé, je zjištění, že endosomální dráhy jsou si napříč eukaryoty podobnější v rané fázi mezi ER a GA, zatímco v post GA k PM je mnoho specifík (Vernoud et al. 2003, Sanderfoot 2007).

### **3. Exocytóza**

**CHARAKTERISTIKA** Opačným dějem k endocytóze je exocytóza. Při ní jsou makromolekuly, jako solubilní náklad váčků, transportovány ven z buňky anebo, jako transmembránové komponenty spolu s lipidy, internalizovány do cílové membrány. Je tak zajišťován membránový obrat, ustaveno složení PM, dosahováno diferenciaci, růstu a vývoje. Exocytické váčky jsou, po odštěpení z membrány donorového kompartmentu, dopraveny, uvázány a následně spojeny s cílovou membránou. Donorem váčků určených pro export do plazmatické membrány bývá Golgiho aparát, hlavně jeho částečně nezávislý kompartment TGN (trans-Golgi network), nebo časné endosomy a MVB (multivesicular body), spolupracující na recyklaci membrán a proteinů. Roli více mateřských kompartmentů, podporuje i existence více druhů exocytických váčků, lišících se ve velikosti, tvaru i obsahu (Žárský et al. 2009).

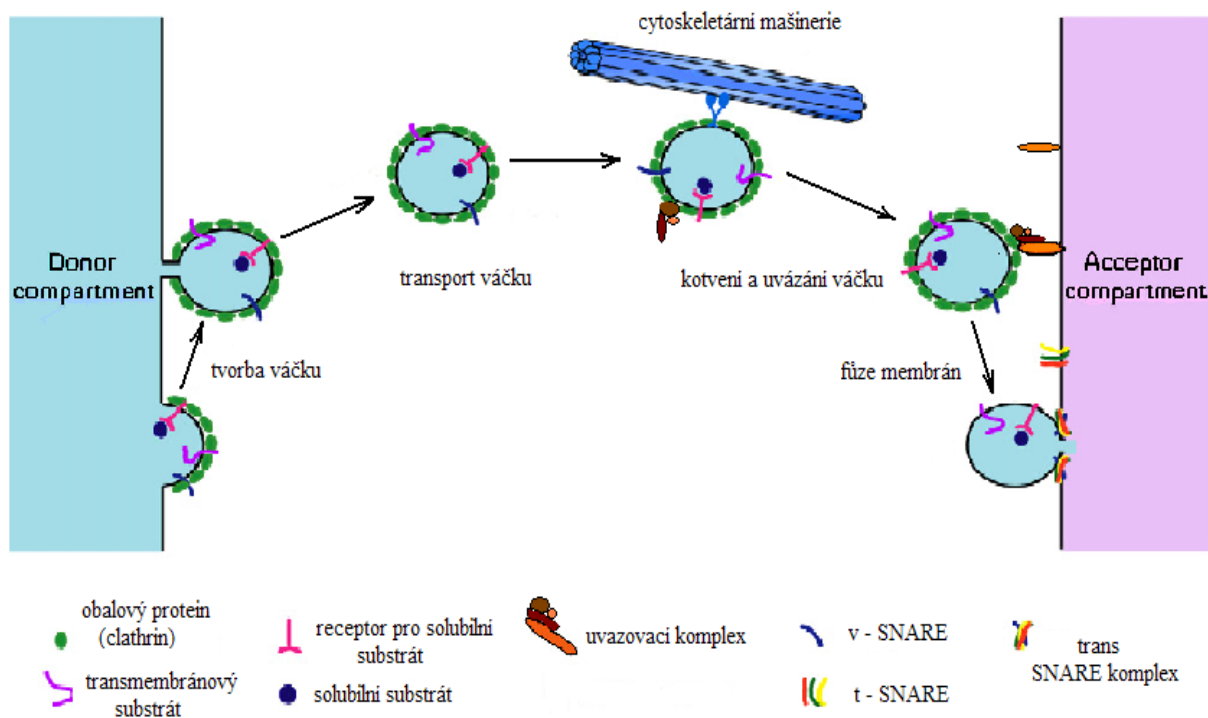
**MECHANISMUS** Pro splývání membrán je důležité složení cílové membrány i membrány váčku. Jsou přinášeny důkazy o významu specifických domén plazmatické membrány, sloužících jako místa vysoké exocytózy a recyklace (Orlando and Guo 2009, Žárský et al. 2009). Tvorbu váčku, jak je řečeno výše, doprovází specifické složení membrány, výběr nákladu vazbou adaptorových proteinů, jejich zakřivení za pomoci obalových proteinů regulované Arf GTPázami (viz kapitola clathrinová endocytóza). Uvolněné váčky pak musí

překonat určitou vzdálenost k cílové membráně, většinou za pomoci cytoskeletu. Spojení obou membrán je koordinovaným procesem interakcí mezi uvazovacími komplexy, regulačními Ras GTPásami a SNARE komplexy (Orlando and Guo 2009).

**FUNKCE** Během růstu musí buňka zvětšit nejen svůj objem (syntéza, příjem živin endocytózou), ale i povrch. Buňky rostlin k zvětšování PM musí představovat i buněčnou stěnu, která vymezuje jejich tvar (Sandhu et al. 2009). Souhra endomembránového systému, sekrece i recyklace potom definuje buněčný růst a vývoj. Regulace a polarizace sekrece umožňuje dělicím a rostoucím buňkám, v závislosti na svých sousedech a signálech zvětšit, realizovat svou morfogenezi či diferenciaci. Mutanti v genech kódujících proteiny účastníci se exocytózy vykazují často defekty v dělení buněk, polaritě, buněčné stěně, růstu a morfogenezi tkání i orgánů (Žárský et al. 2009). Rostlinné buňky se na rozdíl od ostatních eukaryot dělí směrem od středu k obvodu, neboli centrifugálně. Exocytóza je esenciálním transportem stavebních komponent nově vznikající buněčné přepážky při cytokinezi. Splývání exocytických váčků v ekvatoriální rovině přináší materiál pro vznikající plazmatické membrány.

### **3.1. Kotvení váčků (vesicle tethering)**

Anglický název vesicle tethering, je asi výstižnější pro mechanismus ukotvení exocytického váčku k membráně. V bodě dotyku ještě nedochází ke splynutí lipidových dvojrstev, pouze k jejich kontaktu přes „kotevní lana“ tzv. tethers, uvazovací komplexy obvykle složené z několika proteinových podjednotek. Váček se tvoří za regulace malých GTP vazebných proteinů, ty během cesty váčku k cílovému kompartmentu interagují s podjednotkami konkrétního kotevního komplexu. Po nasměrování váčku na cíl dojde k interakci podjednotek na váčku i na cílové membráně (viz Obr. 1). Komplex se skládá, stabilizuje membrány a připravuje fúzi zprostředkovanou SNARE proteiny (Cai et al. 2007). U opisthokont bylo popsáno a pozorováno více druhů kotevních proteinů, více podjednotkové komplexy, tzv. multisubunit tethering complexes (MTC) jsou složeny ze 3-10 podjednotek.



**Obr. 1:** Cesta sekretorického váčku z donorového kompartmentu k akceptorovému. Váček se vytváří na donorové membráně za spolupráce obalových proteinů, jako je clathrin, nese substrát podél cytoskeletárních drah. Na váčku dochází ke skládání uvazovacího komplexu, který kotví váček k membráně a usnadňuje poslední krok sekrece, fúzi membrán. Převzato z Cai et al. (2007).

MTC jsou diverzifikované a víceúčelové, jejich složení se liší, a jednotlivé podjednotky mohou zastávat specifické funkce u konkrétních organismů (Cai et al. 2007). Až na výjimky pro ně platí, že svými vazebnými motivy váží Rab GTPázy a SNARE proteiny (Bröcker et al. 2010). Regulované kotvení váčku tak plynule přechází ve fúzi s cílovou membránou.

Exocytické váčky uvazuje MTC exocyst, poprvé objevený u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (TerBush et al. 1996). Exocyst je heterooligomerní komplex, skládající se z 8 podjednotek Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec 15, Exo70 a Exo84 (Ter Bush et al. 1996, Guo et al. 1999a). U kvasinek je lokalizován v místech vysoké sekrece (pučení a odštěpení dceřiných buněk). Narušení jeho funkce působí hromadění váčků uvnitř buňky a poruchy polarity (TerBush et al. 1996). Typicky vstupuje do interakce s malými GTPázami skupiny Rab (viz kapitola clathrinová endocytóza), podstatnými pro vazbu váčků z TGN k PM (Guo et al. 1999b). Rab GTPázy jsou obecně zapojeny v buněčné membránové dopravě, kdy cyklují mezi cytoplazmou ve stavu vázaného GDP a membránou s navázaným GTP. Jejich koloběh udržují GEF a GAP proteiny, navíc v solubilní formě je stabilizují GDI (GDP dissociation inhibitor). Tyto proteiny pak můžou specificky ovládat aktivitu G proteinu v čase i prostoru a mají proto vliv na specifickou membránového transportu (Nielsen et al. 2008). Rab GTPázy jsou drženy v PM lipidickou kotvou, která je na protein kovalentně vázána Rab



geranylgeranyl transferázami (Hála et al. 2010). Aktivní Rab GTPáza Sec4 u kvasinek iniciuje skládání exocystu a jeho vazbu k membránově vázaným podjednotkám Sec3, Exo70 (Guo et al. 1999b, Grote et al. 2000). Exo 70 interaguje přímo s membránovými fosfolipidy, konkrétně fosfoinositolem PI(4,5)P<sub>2</sub>, Exo70 i Sec3 pravděpodobně spolupracují a jsou obě nezbytné pro cílení váčků prostřednictvím exocystu (He et al. 2007). Exocyst je zároveň efektoem Rho GTPáz, řídící polarizovanou sekreci (Zhang et al. 2001, Lavy et al. 2007, Orlando et al. 2011) a organizaci aktinového cytoskeletu. Skládání oktamerického komplexu vede k rozpoznání specifické membránové domény a plynule pokračuje fúzí zprostředkovanou SNARE proteiny (Boyd et al. 2004).

Exocyst přispívá k cílení váčků do míst aktivní exocytózy tzv. ACDs, které kontrolují specifický export molekul z buňek (Žárský et al. 2009) a pravděpodobně i fúzi membrán váčku a PM.

### 3.2.1. Exocyst u rostlin

U rostlin jsou přítomny geny všech podjednotek exocystu definovaných u kvasinek a savců (Eliáš et al. 2003), ovšem u některých z nich se během evoluce vyvinulo více forem. Například u modelového organismu *At* byly analýzou genomu určeny dva paralogy pro *SEC3*, *SEC5*, *SEC15* a tři paralogy pro *EXO84* (Eliáš et al. 2003). V průběhu evoluce suchozemských a zejména krytosemenných rostlin se projevuje trend rozrůstající se genové rodiny *EXO70*, čítající u *At* 23 paralogů či u rýže *Oryza sativa* dokonce 39 paralogů (Synek et al. 2006). Tak rozsáhlá multiplikace značí zisk nových regulačních funkcí, pro jejichž mechanismus je pravděpodobně klíčová *EXO70* jako koordinátora interakcí s PM a Rop GTPázami (Chong et al. 2010). Microarray analýzy mimo jiné poukazují na regulační roli *AtEXO70*, kdy se za různých podmínek dynamicky měnila její exprese na rozdíl od slabé změny u zbylých podjednotek. Autoři proto navrhují model, v němž diferenciální exprese *EXO70* genů řídí rostlinný exocyst (Chong et al. 2010). Synek a kol. navrhli dvě hypotézy pro bohatou skupinu *EXO70* u rostlin. První navrhuje, že jen část ze skupiny *EXO70* funguje jako součást celého komplexu a ostatní isoformy mají specializované samostatné funkce. Druhá postuluje existenci více forem exocystu lišících se právě přítomnou *EXO70* podjednotkou (Synek et al. 2006). V nedávné studii byla představena lokalizace 22 ze 23 členů transgenních konstruktů *EXO70:GUS* v těle i samčím gametofytu *At*, která ukázala, že ačkoliv exprese všech *Exo70* je úzce spjata s místy vysoké exocytózy, žádná z jejich izoform není exprimována konstitutivně ve všech buněčných typech (tkáních), (Li et al. 2010).

Podpora je tedy momentálně na straně hypotézy, že rostliny mohou využívat konkrétní „varianty“ exocystu pro různé buněčné typy, tedy ke tkáňové specializaci sekrece (Hála et al. 2008, Li et al. 2010).

Vliv jednotlivých podjednotek na růst a vývoj je zkoumán především studiem fenotypu mutantů. Roli SEC8 v polarizovaném růstu a sekreci popisuje studie na modelu pylových láček (Cole et al. 2005). Synek a kol. charakterizovali mutantu *exo70A1* projevujícího defekty polarizace a růstu meristémů u sporofytické linie. Oproti divokému fenotypu mají mutanti narušený polární růst kořenových vlásků, apikální dominanci, počet buněk (méně), růst hypokotylu, narušenou schopnost kompatibilního opylení a vývoj květenství (Synek et al. 2006, Samuel et al. 2009). EXO70A se proto podílí na buněčném dělení, polarizaci a morfogenezi buněk i orgánů (Synek et al. 2006). Funkční propojení exocystu jako komplexu u rostlin ukazuje studie, kde se porovnávají fenotypy více podjednotek (Hála et al. 2008). Defekty u mutantů *exo84* působí narušení cytokineze, morfogeneze svěracích buněk i jejich dělení. Zapojení exocystu lze tedy najít i při iniciaci tvorby buněčné přepážky, tedy v místě specifické fúze mnoha sekrečních váčků a při zrání nové BS při cytokinezi, kde je třeba dopravy specifických komponent (Fendrych et al. 2010). Doklady o funkci exocystu v maturaci BS i její morfogenezi, poskytuje výzkum vývoje semenného obalu *At*. Zde je třeba polarizované sekrece pektinových molekul pro tvorbu extracelulárního slizového obalu kolem semene. Mutanti *sec8* a *exo70A1* projevují jeho významně narušenou tvorbu (Kulich et al. 2010). Data získaná z mutantů přinášejí očekávané výsledky o zapojení exocystu v asymetrickém růstu buněk a polarizované sekreci, tedy při cytokinezi, buněčné polaritě, formování buněčné stěny, morfogenezi tkání a orgánů i buněčné obraně před patogeny (Pečenková et al. 2011).

Regulátory rostlinného exocystu a jejich vliv jsou studovány dle předloh kvasinkových a savčích drah. Z rodiny Ras GTPáz identifikovaných u kvasinek i savců nalzáme u *At* skupinu Rab, Ran, Arf a Rho příbuznou, ale pro rostliny specifickou Rop (Vernoud et al. 2003). Rop GTPázy jsou zapojeny v polarizovaném růstu organizací dynamiky aktinu, vrcholového  $Ca^{2+}$  gradientu a membránovém transportu (Ridley 2006). Jedním z identifikovaných efektorů pro Rop1 je ICR1 protein (interactor of constitutive active Rops) interagující i s podjednotkou Sec3. Spojení Rop s exocystem zprostředkovávají právě Icr proteiny (Lavy et al. 2007). Ukazuje se, že exocytóza spojená s Rop - ICR1 je potřebná pro dopravu PIN proteinů do specifických míst PM a účastní se proto polarizace auxinového toku. Navíc jeho buněčná lokalizace a exprese reaguje na stabilní auxinové maximum v okolních buňkách a odpovídá pozitivní zpětnou vazbou na jeho koncentraci. V reakci na auxin Rop-

ICR1 modulují polaritu exocytózy PIN pravděpodobně přes interakci s AtSec3 (Hazak et al. 2010).

### 3.3. SNARE komplex a fúze membrán

SNARE (soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor) proteiny změnou konformace (tzv. zippering) vytváří SNARE komplex, čímž k sobě mechanicky přiblíží dvě membrány navzdory jejich stejnému náboji (Lin and Scheller 1997). Samovolným skládáním komplexu, dochází k membránové fúzi (Sollner et al. 1993).

SNARE rodinu tvoří samostatné proteiny Qa, Qb, Qc (charakteristická pozice glutaminu v sekvenci) a R (arginin ve specifické pozici), (Fasshauer et al. 1998). Obecněji v-SNARE (od vesicular) inkorporovaný ve váčku dokáže rozeznat t-SNARE (od target) v cílové membráně (t-SNARE od target). SNARE jsou charakteristické tzv. SNARE motivem (coiled coil SNARE motif), který umožňuje při dostatečné blízké vzdálenosti jejich samovolné skládání (Lin and Scheller 1997). Sollner a kol. postulovali hypotézu, že vytvořený SNARE komplex řídí specifickou membránovou fúzi, což nasvědčuje i jejich genetická různorodost (Sollner et al. 1993), existují však doklady, že tomu tak není (Hunt et al. 1994, Scales et al. 2000). Například skutečnost, že v - SNARE se po spojení membrán ocitají spolu s t-SNARE na shodné membráně. V- SNARE musí být potom recyklovány a jsou přítomny jak na váčcích anterográdních tak retrográdních. Dále fakt, že jejich narušení nepoškozuje mechanismus kotvení, který logicky předchází SNARE interakci (Hunt et al. 1994). Pozorování SNARE skládání komplexů in vitro ukázalo, že strukturní motivy jsou si tak podobné, že interaguje téměř každý typ SNARE s každým. Ovšem stejná studie ověřovala jejich párování i v buněčných systémech, kde se interakce razantně zpřesnily (Scales et al. 2000). SNARE tedy přispívají k specifčnosti membránové fúze, hlavní slovo mají pravděpodobně jiné proteiny regulující výběr jednotlivého SNARE do specifické membránové domény.

Jak pomáhají uzavazovací komplexy skládání SNARE komplexu? Většina znalostí o funkci SNARE proteinů byly získána studiem umělých membrán in vitro, o jejich nativních interakcích se tak ví stále málo. Teoreticky přiblíží jednotlivé SNARE do vhodné vzdálenosti k samoorganizované fúzi, nebo přímo váží SNARE proteiny, např. MTC komplex DSL1 váže pro ER specifické SNARE a urychluje skládání jejich komplexu při splývání membrán (Ren et al. 2009). Exocyst váže proteiny rodiny SEC1 (proteiny vážící se na plně sestavené SNARE komplexy), tato interakce by mohla spojovat exocyst se SNARE (Wiederkehr et al. 2004).

Přímou interakci s t-SNARESec9 (R-SNARE) proteinem vykazuje podjednotka exocystu Sec6 (Sivaram et al. 2005).

Vyšší rostliny mají poměrně konsistentní homologické sady SNARE genů (Sanderfoot 2007). SNARE jsou potřeba v každém kroku membránového transportu. Pro PM rostlin bylo popsáno 18 SNARE proteinů. Z toho je usuzováno na existenci membránových domén různých funkcí (Uemura et al. 2004). Dopravě do konkrétních membránových domén se účastní bohatá skupina PM Qa-SNARE zastoupená SYP1 rodinou, která je různě exprimovaná v odlišných buněčných typech (Enami et al. 2010). KNOLLE/Syp111 protein byl určen jako cytokineticky specifický SNARE zodpovědný za fúzi váčků. Protein KNOLLE je lokalizován během časné telofáze do centra roviny dělení, s rostoucí přepážkou putuje jeho signál k okrajům a v metafázi mizí. Mutanti projevují jasné defekty ve fúzi váčků v cytokinezi (Lauber et al. 1997). Dále SYP121/AtPEN1 je zapojen v sekreci KAT1 regulujícího iontovou homeostázi buněk (Tyrrell et al. 2007) a spolu se SYP122 se podílí na specifické sekreci v obraně před patogeny (Assaad et al. 2004).

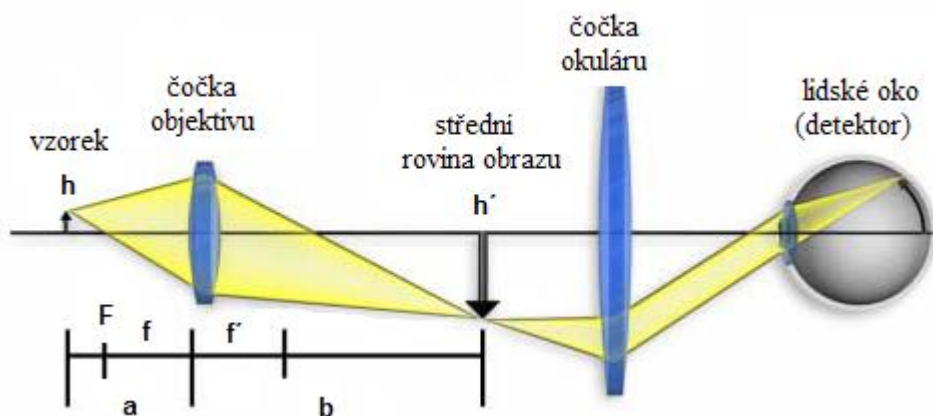
#### **4. Pokročilé metody vizualizace živých buněk**

Jeden ze základních přístupů biologického výzkumu je pozorování. Buňky jsou základními jednotkami organismů a i pro pochopení jejich chování a fungování je nezbytné umět je pozorovat. Velikost jednojaderných eukaryotických buněk se pohybuje v desítkách mikrometrů, některé jsou patrné i lidskému oku. Pro rozlišení jejich komponent (jádro, vakuola, chloroplasty) stačí i světelný mikroskop s rozlišením 2 desetiny mikrometru (200 nm), (www.olympus.com). Jsou-li cílem výzkumu struktury jako endocytické váčky (50 - 500 nm), (Oneli et al. 2008), membránové domény (20 - 200 nm), (Mongrand et al. 2010), proteinové komplexy či jednotlivé proteiny (i jednotky nanometrů), je třeba překročit rozlišení světelného mikroskopu a zároveň uchovat schopnost pozorování živých buněk. Aby bylo možné představit nové techniky dosahující takového rozlišení, nejprve jsou uvedeny charakteristiky světelné mikroskopie obecně.

Vědecká disciplína, která se zabývá pozorováním a měřením objektů za pomoci různé zvětšovací techniky se nazývá mikroskopie. Za zakladatele tohoto oboru se považuje holandský učenec Antoni van Leeuwenhoek, jenž zkonstruoval roku 1674 optické zařízení s 275 násobným zvětšením (oproti lidskému oku), tedy mikroskop, ten měl řadu optických vad. Vývoj se rozběhl směrem k jejich odstranění. Významných pokroků v tomto směru dosáhla firma Carl Zeiss a její konstruktér a fyzik Ernst Abbe (1840-1905). Ten na konci 19.

století vysvětlil princip mikroskopického zobrazování a navrhl apochromatický objektiv, odstraňující optické vady. Ukázal, že kvalitu detailů zobrazení neurčuje zvětšení mikroskopu, ale hodnota jeho numerické apertury ( $NA$ ), ([www.microscopyu.com](http://www.microscopyu.com)). Hlavní vlastností mikroskopu je rozlišovací schopnost ( $d$ ). Nejvyšších úspěchů v jejím zlepšování dosáhla zatím transmisní elektronová mikroskopie (TEM), až na setiny nanometrů (atomární rozlišení) v ose  $xy$ . Skenovací elektronová mikroskopie (SEM) dosáhla obdobných kvalit v rozlišení povrchů, po ose  $z$ . Zásadní omezení elektronové mikroskopie pro práci s biologickými vzorky je práce *ex vivo* a náročná příprava vzorků. Vysoké rozlišovací možnosti přináší dnes i mikroskopy zkonstruované pro sledování živých organismů (Davidson and Abramowitz 2002, Wu et al. 2008, Huang et al. 2010).

Klasický světelný mikroskop je tvořen soustavou objektivu a okuláru. Kondensator usměrňuje zdroj záření na pozorovaný objekt (viz Obr. 2). Nejdůležitější částí je objektiv, soustava čoček s velmi krátkou ohniskovou vzdáleností vytvářející skutečný, zvětšený a stranově převrácený obraz. Předmět má být umístěn těsně před ohniskem objektivu, tedy mezi ohnisko a dvojnásobnou ohniskovou vzdálenost. Objektivem vytvořený obraz lze pozorovat okulárem jako neskutečný, zvětšený a převrácený. Celkové zvětšení je dáno součinem zvětšení objektivu a okuláru, zaznamenané citlivým detektorem (Davidson and Abramowitz 2002).

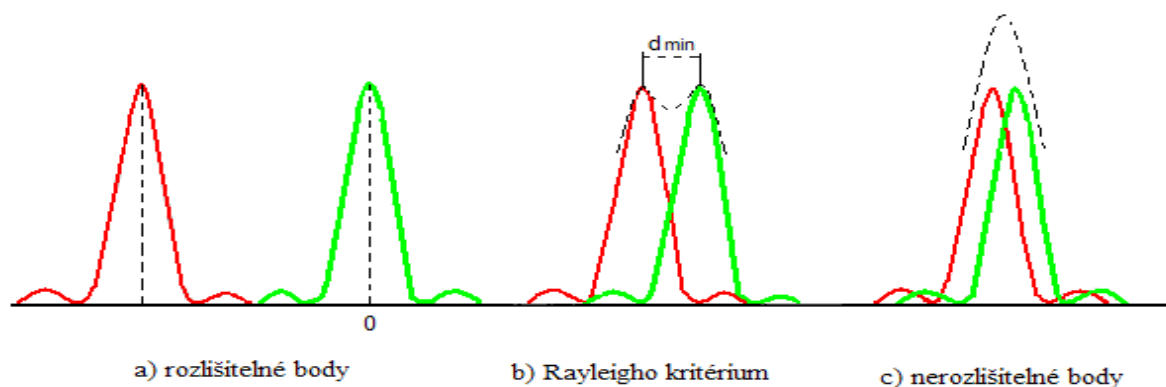


**Obr.2:** Optické schéma světelného mikroskopu. Obraz vzorku  $h$  se promítá přes čočku objektivu jako skutečný zvětšený a převrácený  $h'$  ve střední rovině

obrazu. Čočka okuláru zvyšuje zvětšení a promítá obraz  $h'$  na detektor (sítnice lidského oka). Vzorek je umístěn od objektivu v předmětové vzdálenosti ( $a$ ) a jeho obraz je promítán v obrazové vzdálenosti ( $b$ ). Ohnisková vzdálenost ( $f$ ) v předmětovém prostoru, ( $f'$ ) ohnisková vzdálenost obrazového prostoru, ( $F$ ) ohnisko. Převzato z Davidson and Abramowitz (2002).

Rozlišovací schopnost ( $d$ ) je definována jako vzdálenost dvou sousedních bodů, které lze daným zařízením rozeznat jako oddělené. Velikost nejmenších pozorovatelných detailů

(Rayliegho kritérium) určuje rovnice Abbe-Rayliegho  $d = 1,22 \frac{\lambda}{2NA}$ , kde  $NA$  je numerická apertura použitého objektivu a  $\lambda$  je vlnová délka použitého záření. Vztah pro numerickou aperturu  $NA = n \sin \alpha$ , kde  $n$  je index lomu a  $\alpha$  úhel, pod kterým vstupuje difraktované záření do objektivu, určuje úhel, pod kterým vstupuje světlo do objektivu (Wu et al. 2008). Čím je  $NA$  vyšší, tím větší je zorný úhel a jas, naopak nižší kontrast. Jelikož je  $NA$  závislá na indexu lomu prostředí (mezi objektivem a krycím sklíčkem), dá se zvyšovat použitím imersních olejů ( $n_{\text{vzduchu}} = 1,003$  oproti  $n_{\text{cedrový olej}} = 1,515$ ), (www.microscopyu.com). Pro posouzení možností daného objektivu v kombinaci s použitým zdrojem záření se stanovuje tzv. mezní rozlišitelná vzdálenost  $d_{\text{min}}$ . Při použití světla o nejkratší vlnové délce (UV 390nm), je světelná mikroskopie omezena difrakcí (rozptyl světla na vzorku) na  $d_{\text{min}} = 200$  nm (viz Obr. 3), (Wu et al. 2008, Combs 2010, Toomore and Bewersdorf 2010).



**Obr. 3:** Zobrazení Rayleigho kritéria. Obrázek popisuje difrakční obraz dvou bodů, kdy a) jednotlivé body jsou rozlišitelné, 0 představuje nultý difrakční řád, b) ukazuje minimální rozlišovací vzdálenost  $d_{\text{min}}$  daného zobrazovacího systému, při ní je ještě možné od sebe body odlišit a c) dochází k překryvu signálu, pod difrakčním limitem.

Podstatnou vlastností pro pozorování je hloubka ostrosti  $Z$  na straně vzorku, což je vzdálenost mezi mezními rovinami, v nichž se předmět jeví jako ostrý. Vzhledem k ohniskové vzdálenosti použitého objektivu a vlnové délce světla je pozorování vzorku značně limitováno jeho tloušťkou (Wu et al. 2008).

Protože parametry objektivu nám nezaručí, že cíleného rozlišení dosáhneme, je třeba pracovat s kontrastem obrazu. In vivo pozorování běžně průhledných buněčných struktur usnadnila technika fázového kontrastu, diferenciální interferenční či Hofmanův kontrast (Davidson and Abramowitz 2002). Interakcí vlnění se vzorkem je několik typů, např. difrakce, lom, absorpce, fluorescence. Jak se uplatní na celkovém obrazu, závisí na konstrukci mikroskopu, použitém zdroji záření i značení. Jak bude daná struktura vypadat v získaném

obrazu je ovlivněno použitou technikou a to musíme zohlednit při interpretaci našich pozorování (Plášek and Reischig 1995).

#### **4.1. Fluorescenční Mikroskopie**

Fluorescenční mikroskopie je nejrozšířenější metodou pozorování živých buněk díky své neinvazivní technice značení vzorků a vysokému časovému rozlišení. Je však zásadně limitována difrakcí světla - tzv. difrakční limit (200nm) a poměrem získaného signálu ku nespecifické fluorescenční pozadí rovin ležících mimo ohnisko, což snižuje dosažitelné rozlišení a limituje hloubku ostrosti (Stelzer 1998).

Fluorescenční mikroskop využívá schopnosti molekul absorbovat světelné záření o určité  $\lambda$  a následně ho emitovat o delší  $\lambda$ . Vlnění tak vykazuje tzv. Stokesův posun, který odlišuje přijaté záření od vydaného. Záření vyvolávající světelnou emisi fluoroforu (molekula schopná fluoresce) se nazývá excitační. Posun ve vlnové délce excitačního a vyzářeného emisního záření pozorujeme jako změnu barvy (posun ve světelném spektru), (Wolf 2007). Existuje mnoho specifických fluoroforů emitujících záření o konkrétních vlnových délkách, které jsou vhodné ke značení specifických buněčných struktur (GFP řada, Alexa řada), (Fernandez-Suarez and Ting 2008). Vhodný fluorofor určují jeho parametry jako je životnost fluorescence, extinkční koeficient (čím vyšší tím je vyšší pravděpodobnost emise), kvantový výtěžek (poměr mezi absorbcí a emisí) a průměrná svítivost. Po určitém čase aktivity fluoroforu dojde k jeho zhasínání (vyblednutí), každá jeho molekula je totiž schopna emise jen určitého počtu fotonů. Dojde proto k nevratné ztrátě schopnosti fluorescence. Problém nastává v odstranění fluorescenčního pozadí tzv. šumu, který zhoršuje celkové rozlišení. To lze vylepšit metodou dekonvoluce obrazu nebo technikou strukturovaného osvětlení (Combs 2010, Lippincott-Schwartz and Patterson 2009).

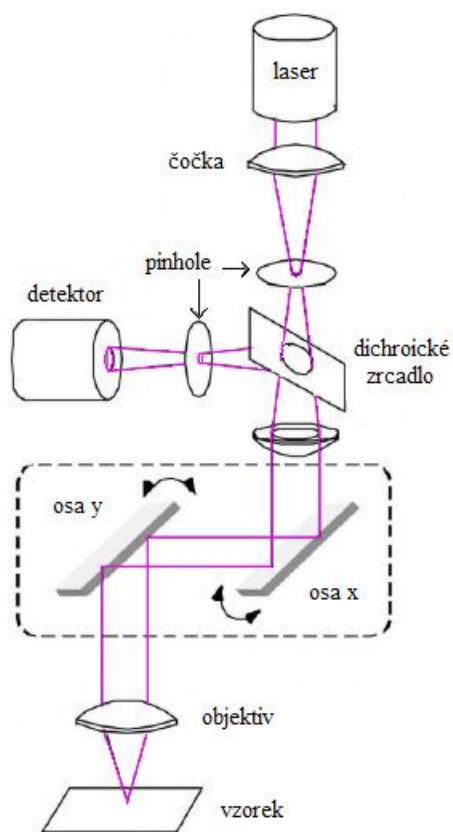
Mikroskop musí separovat excitační záření od emisního, aby bylo vůbec možné pozorovat emisi fluoroforu nepřezářenou excitačním světlem a vybírat požadované  $\lambda$  pro excitaci. Epifluorescenční mikroskop nemá vlastní kondenzor, obě záření prochází objektivem. Světlo vyvíjené lampou (laserem, led diodou) prochází excitačním filtrem, který vybírá požadovanou  $\lambda$ , odráží se od dichroického zrcadla (odráží maximum excitovaného záření) a přes objektiv dopadá na vzorek. Pouze emitované záření prochází dichroickým zrcadlem (propouští maximum emitovaného) a přes bariérový filtr, který nepropouští nežádoucí  $\lambda$  emise, do detektoru (př. vysokocitlivé CCD kamery). Pro efektivitu mikroskopu je důležitá konfigurace filtrů separují světlo od UV po IČ záření a dostatečně jasný zdroj

světla po maximální emisi fluoroforů, jako xenonové výbojky a výkonné argon - kryptonové lasery. Mocným nástrojem v mikroskopii je digitalizace snímání obrazu pod počítačovou kontrolou (Stelzer 1998, <http://www.microscopyu.com>).

## 4.2. Konfokální mikroskopie

Fluorescence využívá i konfokální laserový skenovací mikroskop CLSM s rozlišovací schopností zhruba 180 nm laterálně ( $xy$ ) a 700nm ( $z$ ) axiálně. V porovnání s epifluorescenční mikroskopii má vyšší hloubku ostrosti (kolem 100  $\mu\text{m}$ ) a kontrast, ale nižší rychlost snímání a vyšší pořizovací cenu (Combs 2010).

Vysokého rozlišení dosahuje omezením obrazu zdroje záření na jeho nultý difrakční řád úzkou clonou (tzv. pinhole) a potlačením záření ze zdrojů, které se nenachází v ohnisku konfokální clonou (viz Obr. 4).



**Obr. 4:** Optické schéma konfokálního mikroskopu.

*Laserový paprsek prochází první pinhole, dichroické zrcadlo a osvětluje jeden konkrétní bod, jehož emise prochází přes skenovací zařízení a druhou konfokální pinhole do detektoru. Nakano (2002)*

Detektorem je zaznamenána poloha bodu v rovině i v čase a intenzita jeho emise, řádkováním je pak složen výsledný obraz. Mikroskop je chopen pohybu roviny ohniska po ose  $z$ , tak zaznamenává jednotlivé optické řezy s určitým axiálním rozlišením (kolem. Složením jednotlivých řezů lze rekonstruovat trojrozměrný obraz vzorku (Semwogerere and Weeks 2005, Iouné 2006).

Konfokální skenovací mikroskop byl patentován roku 1957 Marvinem Minským (Minsky 1988). Realizaci jeho myšlenky ovšem chyběla kvalitní světelná a počítačová technologie. Komerční výroba se plně rozeběhla až začátkem 80. let 20. století. Konstrukčně je využíváno dvou typů CLSM. U prvního typu CLSM je pohybováno vzorkem a celá optická soustava zůstává statická. Druhý typ CLSM (tandemová) využívá pohyblivého dichroického zrcadla měnícího polohu paprsku k rastrování vzorku, který zůstává v klidu. V prvním případě je dosahováno většího rozlišení, ale vzorek je skenován pomaleji a dochází k rozkolísání vzorku (vhodná především pro studium pevných materiálů). U biologických



vzorků může způsobit nepřesné měření a na pohybujícím se vzorku nelze provádět mikromanipulace. Rozvoje v biologii proto zaznamenala CLSM se stacionárním vzorkem dosahující rychlosti jedné optické sekce za sekundu, i taková rychlost však nestačí pro sledování fyziologických procesů buněk. Hlavním omezením CLSM pro pozorování in vivo je nedostatečná rychlost snímání vzorku a poškození preparátu intenzivním osvětlením (Ioué 2006).

Díky vysokému rozlišení, schopnosti pozorovat vzorky in vivo, optickému řezání a 3D zobrazení se stal konfokální mikroskop rozšířeným nástrojem pro vizualizaci buněčných struktur a dějů, jako je endocytóza a exocytóza (Zonia and Munnik 2008), nebo lokalizace proteinů jako jsou SYP1 (Enami et al. 2009). Pro pozorování in vivo je oproti epifluorescenčnímu mikroskopu CLSM pomalý. Podobně jeho rozlišovací schopnost je omezena difrakčním limitem, vlnovou délkou použitého záření a *NA* objektivu.

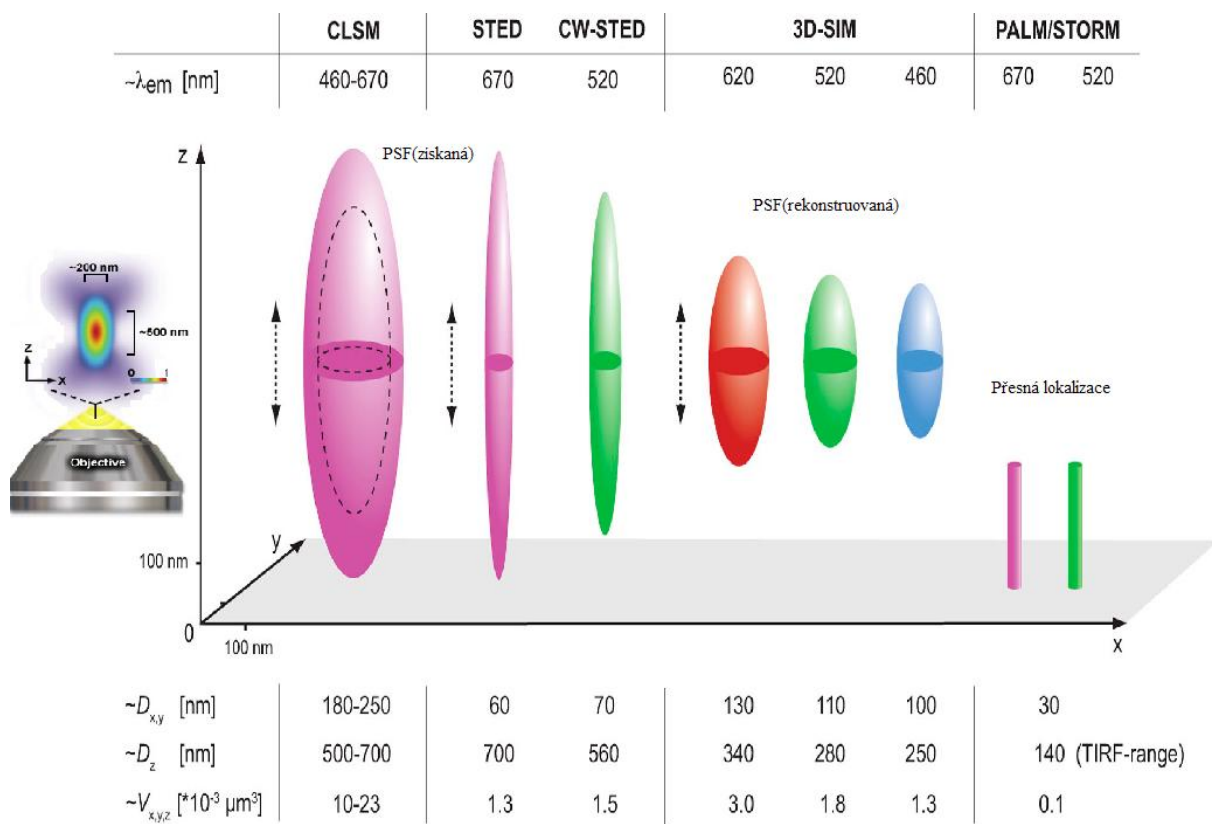
### **4.3. Vybrané techniky zlepšující rozlišení epifluorescenčního i konfokálního mikroskopu**

V poslední době se objevilo několik přístupů jdoucích za hranice rozlišení světelné mikroskopie směrem laterálním podél osy *xy* i axiálním podél osy *z* vhodných pro konfokální i klasickou fluorescenční mikroskopii. Obecně se vylepšení týkají technických parametrů konstrukce mikroskopu, specifických vlastností použitých fluoroforů a analýzy výsledného obrazu. Běžně se využívá dekonvoluce a multifotonové mikroskopie, TIRFM,  $4\pi$  mikroskopie, SDM konfokální mikroskopie, nedávno přibyly techniky jako SIM, SSIM, STED, PALM, STORM.

#### **4.3.1. Dekonvoluce**

Každý bod vzorku v předmětové rovině interaguje se světelnou vlnou záření. Vlnění prošlé vzorkem (emise) nese informaci o jeho podobě, prochází objektivem (ideálně) a dopadá na rovinu (detektor). Funkce PSF (point spread function) popisuje parametry světelného objemu vyjádřené tímto bodem. V ideálním případě by měl mít světelný objem získaný v obrazové rovině podobu bodu, většinou má tvar podobný přesýpacím hodinám (viz Obr. 5). Výsledný obraz je složen z jednotlivých PSF tzv. konvolucí (Schermelleh et al. 2010). Čím je PSF bodů větší, tím rozmazanější získáme obraz. Dekonvoluce (rekonstrukce obrazu) vylepšuje rozlišení výsledného obrazu s pomocí počítačových algoritmů, vzhledem k rychlému vývoji počítačové techniky se tak stává významným doplňkem světelných

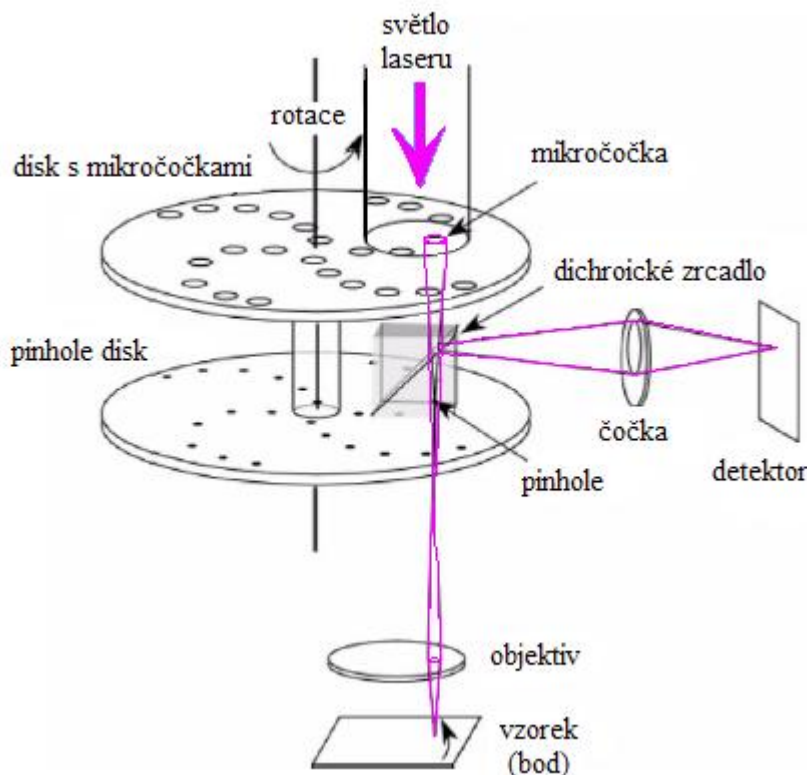
mikroskopů. Snaží se zvýšit kontrast získaného obrazu a snížit signál pozadí, výsledkem má být lepší přiblížení získaného obrazu skutečnému. Výpočetní algoritmy srovnávají odhad obrazu bodu se zaznamenaným a aproximují je. Dekonvoluce je závislá na použitém algoritmu, s různými programy můžeme snadno získat i různé obrazy, což vnáší do pozorování artefakty (Shaw 2005). Rekonstrukcí obrazu u epifluorescenčního mikroskopu, lze dosáhnout kontrastu podobného konfokálnímu mikroskopu. V případě, že vzorek poskytuje silný signál a je příliš silný, ale dekonvoluce produkuje artefakty (Swedlow et al. 2001). Protože ani u CM není PSF ideálně symetrická, využívá se dekonvoluce k získání většího rozlišení i zde (Iouné 2006).



**Obr. 5:** Srovnání 3D PSF, představující světelné objemy emisního maxima, a jejich parametrů zleva CLSM, STED, CW-STED, 3D-SIM, PALM (růžová) a STORM (zelená). Parametry od shora  $\lambda_{em}$  (vlnová délka emitovaného záření),  $D_{xy}$  (laterální rozlišení),  $D_z$  (axiální rozlišení),  $V_{xyz}$  (rozlišený objem). Všechny parametry jsou ovlivnitelné nastavením mikroskopu. Převzato z Schermelleh et al. (2010).

#### 4.3.2. SDM (Nipkow disc microscopy)

SDM (spinning disc microscopy) poskytuje technické vylepšení CM, které posunulo rychlost snímání jednotlivých řezů z řádu sekund na milisekundy. Zvýšení rychlosti dosahuje větším počtem detekovaných bodů ve stejném čase. V konstrukci SDM jde za sebou zdroj světla, čočka a první clona (klasické uspořádání CLSM). Čočka je u SDM nahrazena diskem s mnoha mikročočkami a pod ním je tzv. Nipkowův disk se sadou mikroclon (viz Obr. 6). Oba disky můžou rotovat rychlostí až 5000 otáček za minutu a pořizovat i 1000 snímků za sekundu. Během pořizování snímku nedochází k posunům světelné osy, výsledný obraz je skutečný a zaznamenaný v reálném čase. Nezbytností je vysoce citlivý detektor (CCD kamera) potřebný k optimalizaci multiplikovaného signálu. SDM umožňuje práci s nižší intenzitou laserů, což oproti CLSM významně snižuje světelné poškození vzorku (Nakano 2002).



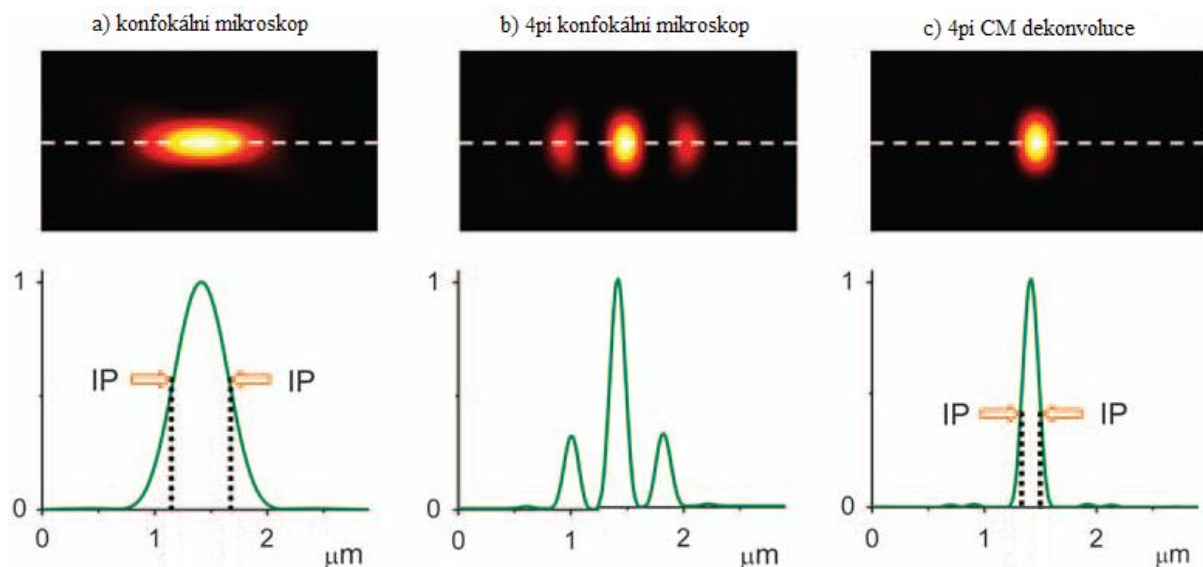
**Obr.6:** Schéma Nipkowova disku u SDM konfokálního mikroskopu. Disk s mikročočkami i Nipkowův disk rotují stejnou rychlostí. Světlo laseru dopadá na plochu disku, prochází přes dichroické zrcadlo a dopadá na mnoho bodů vzorku ve stejném čase. Emise vzorku je snímána citlivým detektorem. Převzato z Nakano (2002).

Pro membránový transport a pohyb proteinů v buňce je nezbytné vysoké časové i prostorové rozlišení a práce s živými buňkami či organismy. SDM tyto kritéria dobře splňuje s rozlišením 190nm (xy) a snímáním až 1000 snímků za sekundu. Pro buněčnou fyziologii se běžně používá rychlost skenování 30 řezů za sekundu, kterou lze sledovat trajektorie proteinů, lokalizace v buňce, rychlost jejich pohybu a chování. Axiální rozlišení (600nm) se nemění, pokud není využito dekonvoluce (Iouné 2006).

Pomocí SDM lze sledovat lokalizace transgenních proteinů uvnitř buněk, orgánů i celé rostliny. Například studie membránové lokalizace flotilinů, proteinů lipidových raftů a neclathrinové endocytózy během symbiózy *Medicago* s bakteriemi *Sinorhizobium* (Haney and Long 2010). Pomocí SDM je možné pozorovat asociaci celulóza syntázových komplexů na PM s kortikálními mikrotubuly i za různých podmínek (Paradez et al. 2006). Pořizovat lze i 3D záběry, s mnohem lepším rozlišením než u klasické CLSM.

#### 4.3.3. $4\pi$ mikroskopie a multifotonová

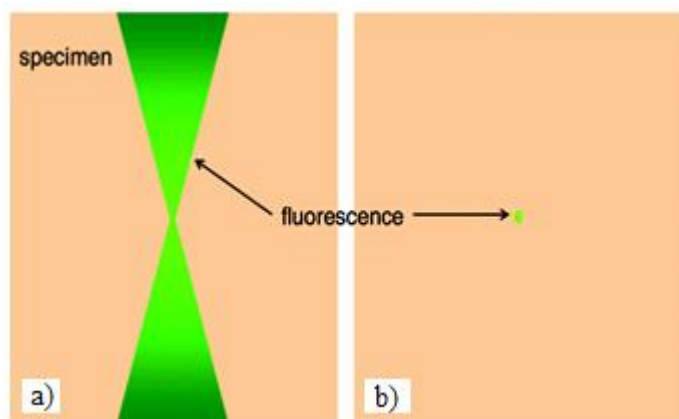
Metody vylepšující axiální rozlišení především CM, stejných principů může však využít i FM (fluorescenční mikroskopie).  $4\pi$  mikroskopie zdvojnásobila hodnotu  $NA$ , použitím dvou identických (každý objektiv je originál) objektivů posazených do opozice. Světelné zdroje dopadají na vzorek proti sobě a jejich paprsky spolu interferují. Výsledkem je zmenšení pozorovaného světelného objemu (PSF) pro každá bod. Světelný objem je u klasického CLSM v axiální ose delší než v laterální, i rozlišení dvou bodů je proto nižší v axiální ose z (Hell et al. 1997).



**Obr. 7:** Ukázka PSF simulovaného obrazu bodu pro a) konfokální mikroskopii, b)  $4\pi$  mikroskopii CM, c) PSF po dekonvoluci obrazu z  $4\pi$  mikroskopie. Převzato z Perinetti (2009).

$4\pi$  CLSM umožní protilehlým osvětlením zmenšení po ose z světelného objemu a jeho zakulacení (viz Obr. 7). Technika může být použita na fixované vzorky v prostředí o vyšším indexu lomu, než má vzduch (glycerol, imerze), kdy dosahuje axiálního rozlišení i 100 nm (Nagorni and Hell 1998). Ale pozorovat můžeme i živé organismy ve vodním prostředí, pomocí multifotonové excitace CLSM i dekonvoluce, za dosaženého axiálního rozlišení 190

nm . Oproti klasickému CLSM, který rozlišuje body vzdálené kolem 700 - 500 nm na axiální ose, poskytuje  $4\pi$  mikroskopie vylepšení především pro trojrozměrné pořizování obrazu, například mikrotubulárních fibril nebo membrán bakterie *E. coli* (Bahlmann et al. 2001). Díky jejímu použití in vivo a počítačovému zpracování obrazu, lze získat 3D obrazy s axiálním rozlišením blízkým 100 nm a pozorovat např. mitochondriální síť za měnících se podmínek prostředí in vivo (Dlasková et al. 2010).



*Obr. 8: Popisuje emisi fluoroforu a) pro jednofotonovou excitaci je silná emise v pase světelného signálu, ale na periferiích zůstává, b) ukazuje světelný objem pouze v centru zaměřené roviny. Převzato z Semwogerere and Weeks (2005).*

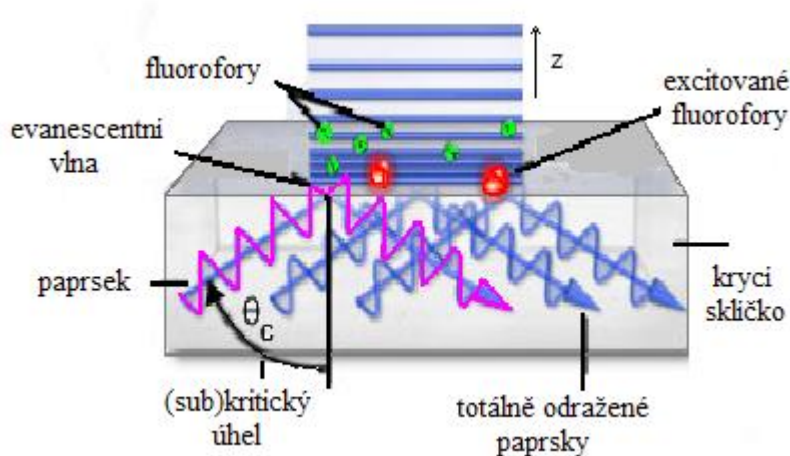
Multifotonová mikroskopie, tedy TPFM (two photon fluorescence microscopy) MPFM (multiphoton fluorescence microscopy) využívá fyzikální vlastnosti fluorescence, kdy s určitou pravděpodobností může být fluorofor excitován více fotony (absorbovány najednou) o nižší intenzitě, jako jedním fotonem o vysoké intenzitě (velmi zjednodušeně). Pravděpodobnost excitace je úměrná druhé mocnině intenzity použitého záření, proto je třeba pulsního opakovaného osvitů, aby se pravděpodobnost excitace přítomných fluoroforů zvýšila. Excitován je pouze malý objem fluoroforu (Obr. 8), což značně zmenšuje rozměr světelné emise a zlepšuje rozlišení klasické FM (Higdon et al. 1999). Výhodou je možnost pozorování tlustších vzorků (stovky  $\mu\text{m}$ ), nižší intenzita osvitů vzorku a tedy snížení nespecifické fluorescence, oproti běžnému fluorescenčnímu mikroskopu (Semwogerere and Weeks 2005). Lze tak pozorovat děje na buněčné úrovni např. v stigmatických papírách blizny během opylení (Cheung et al. 2010), a to přímo na neporušené rostlině a v reálném čase.

#### **4.3.4. TIRFM (total internal reflection microscopy)**

Rozlišení fluorescenčního mikroskopu omezuje difrakční limit, ovšem toho nedosahuje kvůli překryvu signálu fluoroforů v ohnisku z pozadí vzorku. TIRFM je metoda klasické fluorescenční mikroskopie, která umí odstranit tento emisní šum (Axelrod 1981). Využívá tzv. evanescentní vlny k prosvícení pouze tenké vrstvy vzorku do 400 nm (dle  $\lambda$

světla). Jakákoliv molekula mimo tuto oblast nemůže být excitována, a proto zůstává pozadí tmavé. Dosáhnout může TIRFM (při  $\lambda = 390$  nm) maximálního rozlišení 200 nm, tedy difrakčního limitu (Axelrod 2001). Metoda spojuje výhody fluorescenční mikroskopie, jako pozorování v širokém poli, vysoké časové rozlišení snímání v řádech ms a použití živých vzorků, s nízkou intenzitou osvětlení vzorku (delší doba pozorování a nízké poškození) a lepším kontrastem.

Evanescenční vlna (elektromagnetické pole) vzniká, dopadá-li světlo procházející z prostředí opticky hustšího (index lomu  $n_{\text{sklo}}$  je přibližně 1,5) do prostředí opticky řidšího (index lomu  $n_{\text{voda}}$  je přibližně 1,3) nad kritickým úhlem. Úhel lomu závisí na úhlu dopadu a poměru indexů prostředí. Kritický úhel dopadu vyvolá totální vnitřní odraz záření a vznik pomíjivé (evanescentní) vlny, schopné se šířit na stranu vzorku (viz Obr. 9). Frekvence evanescentní vlny je stejná jako dopadajícího světla, ale její intenzita se exponenciálně snižuje s rostoucí vzdáleností od místa vzniku (rozhraní prostředí), po ose  $z$ . Dále je TIRFM ovlivněna a zároveň omezena  $\lambda$  použitého světla, úhlem dopadu světla, použitými fluorofory a indexy lomu obou prostředí (Axelrod 2001, Toomre and Bewersdorf 2010).



jehož intenzita klesá se vzdáleností od rozhraní ve směru  $z$ . Převzato [www.microscopyu.com](http://www.microscopyu.com).

**Obr. 9:** Schéma totálního vnitřního odrazu světla v TIRFM. Světlo u TIRFM prochází klasicky objektivem, imersním olejem a dopadá na krycí sklíčko, na kterém leží preparát v kapce vody. Světlo dopadá na rozhraní sklo, vzorek (voda) nad kritickým úhlem. Záření šířící se na stranu vzorku má podobu pomíjivého vlnění,

Během pozorování živých buněk v úzké rovině dochází k migraci fluorofory značených proteinů tak jak přicházejí a odcházejí od PM. Zaznamenávání těchto fluktuací kymografy lze pak rekonstruovat dráhy jejich pohybu. Díky nastavitelnému úhlu dopadu laserového paprsku lze přecházet od pozorování v TIRFM režimu ke klasickému epifluorescenčnímu zobrazení. Může proto využít porovnání s nižším rozlišením, kontrastů v tmavém poli i fázového posunu (Axelrod 2001). TIRFM je technikou světelné mikroskopie,



s níž je možné zkoumat dynamiku membránových proteinů, membránových domén, tvorbu clathrinových váčků i fúzi sekretorických. TIRFM byla pozorována membránová dynamika clathrinových váčků u živočišných buněk, s vysokým časovým rozlišením optických snímků i pomocí vícebarevného značení (Taylor et al. 2011). Nebo jednotlivé membránové fúze zprostředkované SNARE proteiny a následné promíchání lipidového obsahu membrán, ovšem nikoliv in vivo (Fix et al. 2004), což je výzva pro budoucí použití TIRFM. TIRFM lze navíc spojovat s dalšími metodami, např. spojení se SIM k pozorování in vivo s rozlišením 100 nm i vysokou rychlostí snímání (Kner et al. 2009). Nevýhodou je omezení indexy lomu prostředí, velikostí pozorovaných vzorků a omezení na zobrazení povrchových struktur. Je důležité, aby vzorek těsně přiléhal ke sklíčku, často jsou proto buňky přilepovány glycerolem atp., takové zacházení může organismy stresovat.

Buněčná stěna rostlin vyniká tloušťkou kolem 200 - 800 nm, takže cytoplazmatická membrána ani cytoplazma rostlinných buněk by neměla být dosažitelná použitím TIRFM (Sparkes et al. 2011). VAEM (variable angle epifluorescence microscopy) je metoda nedávno zavedená, která umožnila pozorovat mělkou vrstvu cytoplazmy i PM rostlinných buněk a přitom využívá TIRFM objektivu u fluorescenčního mikroskopu (Konopka and Bednarek 2008b). Při VAEM byl nastaven paprsek pro TIRFM pod kritický úhel, světlo tedy do vzorku procházelo (Obr. 6), nicméně signál pozadí se rapidně snížil, oproti klasickému FM, a prosvícena byl jen úzká vrstva cytoplazmy. Pozorovány pomocí VAEM byly struktury, jako clathrinový obal váčků na PM, DRP1, i dynamika organel, jako je kortikální ER, peroxisomy, TGN, mitochondrie, na nepoškozených semenáčcích *At*. VAEM umožnila pozorovat s rozlišením 200 nm a v řádu ms buňky kořenových vlásků, hypokotyl, trichomy, kořenovou čepičku (Konopka et al. 2008, Konopka and Bednarek 2008ab). Jiná studie použila lehce odlišné nastavení na TIRFM mikroskopu, pro pozorování dynamiky DRP1 a DRP2 proteinů v porovnání s dynamikou CLC u epidermálních buněk kořene *At* (Fujimoto et al. 2010). TIRFM/VAEM byl aplikován k vizualizaci PM i na epidermálních buňkách listu *At* (Sparkes et al. 2011). Možné je, že jelikož je metoda závislá na indexu lomu prostředí, funguje BS a ležící na skle jako koherentní prostředí a k lomu pak dochází až na rozhraní BS/cytoplazma (Sparkes et al. 2011). V budoucnu by mohly být metody TIRFM/VAEM využity u rostlin např. pro sledování dynamiky ACDs, membránových raftů, komplexu exocyst za různých podmínek.

#### 4.4. Techniky překračující difrakční limit

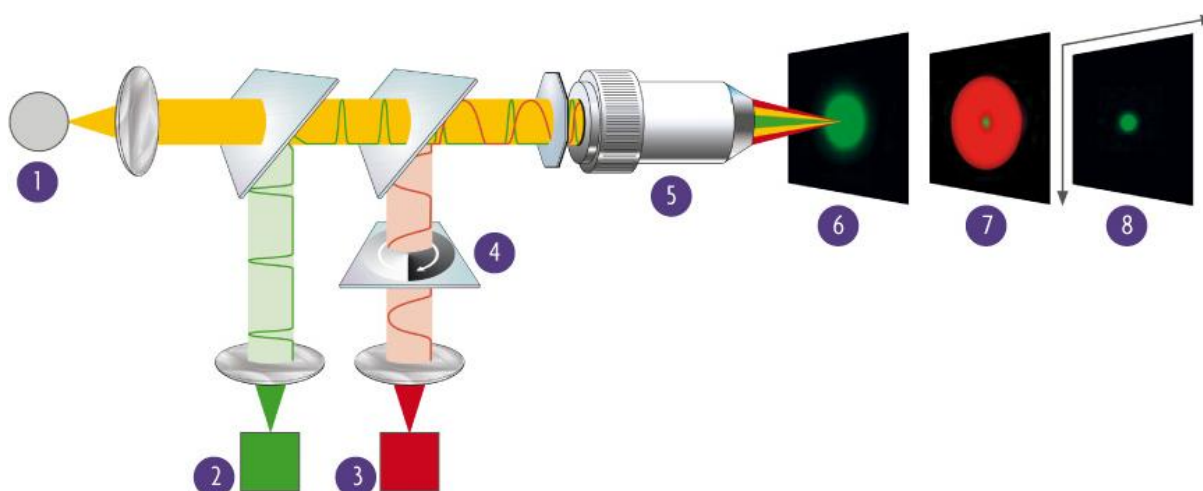
Techniky SIM, STED a multifotonová mikroskopie jsou založeny na nelineárních světelných paprscích dosahujících vysokých intenzit. PALM a STORM jsou založeny na vlastnostech konvertovatelných fluoroforů a schopnosti detekce jednotlivých molekul. Tyto techniky tak dosáhly jednotek nanometrů rozlišení u pevných struktur a desítek nanometrů u biologických vzorků.

##### 4.4.1. STED

Metoda STED (stimulated emission depletion) fluorescenční mikroskopie úzkého zorného pole (CM), která první výrazně překročila Abbého difrakční limit. Využívá fyzikálních a chemických vlastností fluoroforů k jejich manipulaci (Hell and Wichmann 1994, Monreón and Hell 2009).

Řízeným zhasením neboli vyčerpáním fluorescence můžou být sousedící fluorofory citlivěji rozeznány a zvyšuje se rozlišovací schopnost mikroskopu. STED redukuje signál každé molekuly dalším paprskem, pomocí něž může „ořezat“ emisní signál jednotlivých fluoroforů. Rozlišení je tak zvýšeno technicky, konfigurací mikroskopu, nikoliv analýzou obrazu či dekonvolucí. První pulsní laser excituje fluorofor. Silný laserový zdroj druhého tzv. superkontinuálního pulzního STED paprsku (o vysoké  $\lambda$ ), uvádí fluorofory do stavu nasycení a následně k vynucené emisi a jejich vyčerpání. STED paprsek je nastaven tak, aby v momentě, kdy jsou molekuly fluoroforu excitovány, byly zhaseny do základního stavu (viz Obr. 10). Měřitelnou slabou emisí, potom jeví jen střed fluoroforu (nultý difrakční řád), zatímco zbytek signálu je vyčerpán. Velikost takového zúženého regionu schopného emise je přímo úměrná  $\lambda$  paprsku, nepřímo úměrná  $NA$  objektivu a intenzitě světla potřebné k vypnutí fluorescence molekuly (Monreón and Hell 2009). Poloha a intenzita každého vyčerpaného bodu jsou zaznamenány detektorem a jako u klasického CLSM je proskanován celý vzorek tvorbou optických řezů (<http://www.microscopyu.com>). Rozlišení mikroskopu je zlepšováno především schopností fluoroforů přecházet mezi základním a excitovaným stavem. Výběr fluoroforů, jejich životnost, stabilita, výkon, tvoří proto podstatné kritérium a omezení STED mikroskopie. V praxi je dosahováno rozlišovací schopnosti, v laterálním směru, 20 nm u organických barviv a 40 nm u fluorescenčních fúzních proteinů (Huang et al. 2010).





**Obr. 10:** Optické schéma nastavení STED mikroskopie. První laser o vyšší intenzitě (2) excituje fluorofory v ohniskové rovině vzorku podobně jako klasický CLSM. Pulsy excitačního paprsku jsou doprovázeny dvojicí, tvořenou fázovou deskou (4), kolmo polarizovaných pulsů STED paprsku o nižší intenzitě (3). Tento formát záření donutí excitovaný fluorofor (6) k vyčerpání, tedy deexcitaci, ještě před vyzářením jakákoliv emise. Vzhledem k tomu, že toto STED osvětlení je „duté“ (7), pouze centrum molekuly si zachovává schopnost fluorescence. Výsledkem je úzký bod (8), jímž je skenován vzorek, za dosažení rozlišení pod difrakčním limitem. Převzato z (<http://www.activemotif.com>).

Metoda Compact STED přináší desetkrát větší rozlišení i podél axiální osy (oproti CSM) díky technické úpravě. Ke STED paprsku, který nemůže být polarizován, přidává druhý polarizovaný parsek spolu s fázovými deskami pro získání subdifrakčního rozlišení a trojrozměrné nanoskopie. Získaná rozlišovací schopnost je kolem 40 nm laterální a 135 nm axiální osy. Dosáhla tím zmenšení světelného objemu PSF funkce. Společně s použitím dekonvoluce může konfokální compact STED mikroskopie vytvořit 3D obraz např. jednotlivých mikrotubulů (Wildanger et al. 2009). Nevýhodou je určitě použitá intenzita laseru poškozující biologické vzorky a pomalá rychlost snímání detektorem, obzvláště u vícebarevných preparátů, ta snižuje časové rozlišení, které je u živých vzorků stěžejní. STED se díky svému prostorovému rozlišení hodí k pozorování membrán, membránových raftů a jejich složení (Sahl et al. 2010). Využitím laserů s kontinuálním vlněním pro STED se zvyšuje časové rozlišení vhodné ke sledování dynamiky značených proteinů (Monreón et al. 2010, Wildanger et al. 2009). STED nastavení CLSM bylo použito i pro pozorování in vivo synapsí nervových buněk, s rozlišením kolem 70 nm, dynamiky exocytózy a recyklace membrán (Opazo et al. 2010). Použití STED u rostlin by nemělo být nijak technicky limitováno, snad jen tím, že se jedná o velmi drahou záležitost.

#### 4.4.2. PALM a STORM

PALM (photoactivated localization microscopy) je metoda fluorescenční mikroskopie dosahující vysokého rozlišení na úrovni molekul pomocí vlastností specifických fluoroforů. Konkrétně je potřeba fluoroforů schopných fotoaktivace PA-FP (photoactivable fluorescence protein), ty v závislosti na  $\lambda$  excitačního záření emitují mnoho fotonů (vysoký výnos) a se změnou  $\lambda$  mění stav své emise (vypínají se nebo mění barvu). Konvertovatelné fluorofory je navíc možné přepínat mezi aktivním a neaktivním stavem (on/off) světlem o konkrétní vlnové délce, takové fluorofory jsou vhodné k časové kontrole emise (Lippincott-Schwartz and Patterson 2009).

Během PALM je určená plocha vzorku osvětlena zářením o nízké intenzitě a konkrétní  $\lambda$ , což vyvolá emisi jen u zlomku přítomných fluoroforů. Signál aktivovaných nepřekrývajících se center emise zaznamenává detektor. Celý cyklus se opakuje, vždy přibude určité procento nově lokalizovaných bodů, až dosáhne záznam dostatečné hustoty, že citlivá kamera spolu s počítačovým softwarem umožní zobrazení celého obrazu. Tak je zabráněno překryvu signálů a PALM mikroskopie je schopna od sebe odlišit sousední molekuly s rozlišením pod 20 nm (Betzig et al. 2006, Hess et al. 2006, Huang et al. 2010). Omezení jsou zřejmá, především rychlost snímání 1 obrazu i 60 s a vlastnosti použitých fluoroforů. Ty musí poskytovat vysoké emise, aby mohly být detekovatelné jako jednotlivé body. Neměly by podléhat spontánní aktivaci a naopak by měly být citlivé ke konkrétní  $\lambda$  zdroje záření. Existuje mnoho vhodných organických barev, rozhodnutí mezi barvou a fúzním proteinem pak závisí na daném experimentu (Lippincott-Schwartz and Patterson 2009). Organické barvy poskytující vyšší emise jsou z tohoto pohledu vhodnější (Manley et al. 2008). PALM může kombinovat více fluoroforů, např. nedávná studie použila pro PALM pozorování PAmCherry emitující červené záření značený transferinový receptor a PAGFP emitující zelené záření značený lehký řetězec clathrinu (Subach et al. 2009, Subach et al. 2010). Tzv. dvou fotonová PALM může s využitím CLSM pozorovat vzájemnou dynamiku dvou molekul s rozlišením desítek nanometrů, např. klastrování transferinového receptoru a clathrinu na PM in vivo. Nebo pomocí TIRF a PALM sledovat dráhu jedné molekuly (Subach et al. 2009), je třeba ale nezapomínat na fakt, že axiální rozlišení se nijak nezlepšilo. Distribuce virových proteinů na PM značených PA-FP živých buněk byla pozorována dvou fotonovou sptPALM (single particle tracking PALM) metodou, kdy je sledována difuze molekuly v řádech ms (Manley et al. 2008). Není důvodu, proč by nemohla být PALM, použita pro sledování rostlinných buněk, snad jen dostupnost optického vybavení a PA-FP.

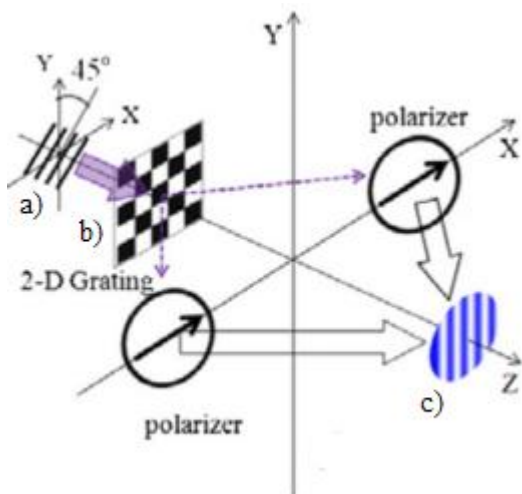
STORM (stochastic reconstruction microscopy) je metoda poskytující vysoké rozlišení pod difrakčním limitem, která podobně jako PALM spoléhá na vlastnosti fluoroforů. Lze využít pro epifluorescenční mikroskop i TIRFM, obecně pro mikroskopii širokého zorného pole (CLSM snímá jeden bod), (Rust et al. 2006). STORM zaměštnává reverzibilně konvertovatelné fluorofory, jako je Cy5, Cy7, Cy3, Alexa 647 (páry aktivátor/reportér), (Lippincott-Schwartz and Patterson 2009). Využívá stochastického osvětlení pro aktivaci podskupiny molekul PA-FP v rámci konkrétního regionu vzorku. Molekuly musí poskytovat vysoké emise při nízkém osvětlení, nesmí být aktivované všechny najednou, ale jen určitý zlomek a po zhasnutí by měly zůstat vypnuté. Opět je pořizování záznamu cyklické. Během cyklů náhodné aktivace je zaznamenána poloha jednotlivých fluoroforů a celkovou rekonstrukcí počítačem je dosaženo výsledného obrazu vysokého rozlišení. Snímaná oblast je pulsně osvětlena laserem různých vlnových délek, zlomek aktivovaných fluoroforů je lokalizován detektorem a zhasnut. Tímto způsobem se snižuje pravděpodobnost překrytí signálů molekul. Proces je opakován, dokud nemá detektor dostatečné množství informace (molekulární hustota) k rekonstrukci obrazu z dané oblasti (Rust et al. 2006). 3D STORM vylepšuje rozlišení jednoho fluoroforu i podél axiální osy. Celkové rozlišení dosahuje 30 nm laterálně a 60 nm axiálně oproti CM a MPFM 500 nm, nebo 100 nm  $4\pi$  mikroskopie, podobá se STED 50 nm. S pomocí 3D STORM metody je možné zobrazit strukturu in vivo např. tvar a distribuci clathrinových váčků (150 nm) tvořících se na PM (Huang et al. 2008, Toomre and Bowersdorf 2010).

STORM i PALM využívají přepínatelných fluoroforů z jejich excitovaného stavu do základního stavu (pokud možno bez zbytkové emise), poměr kinetiky on/off stavů je kritickým parametrem určujícím molekulární hustotu. Schopnost rozeznat množství fluoroforů vedle sebe určuje rozlišení techniky. Např. chtějí-li dosáhnout 20 nm rozlišení na ploše  $1\mu\text{m}^2$ , musí být schopné rozeznat 600 fluoroforů v jedné řadě. Při takto vysokých hustotách fluoroforů je proto velmi nežádoucí jejich samovolná aktivace či zbytková emise (<http://www.microscopyu.com>, Schermelleh et al. 2010).

#### **4.4.4. SIM**

Metoda SIM (simultaneous illumination microscopy) světelné mikroskopie širokého pole (úzká, bodová CM), která dosahuje rozlišení kolem 100 nm a překračuje tedy difrakční limit i pro klasickou FM (Gustafsson et al. 2005). Do cesty excitačnímu světlu je dána

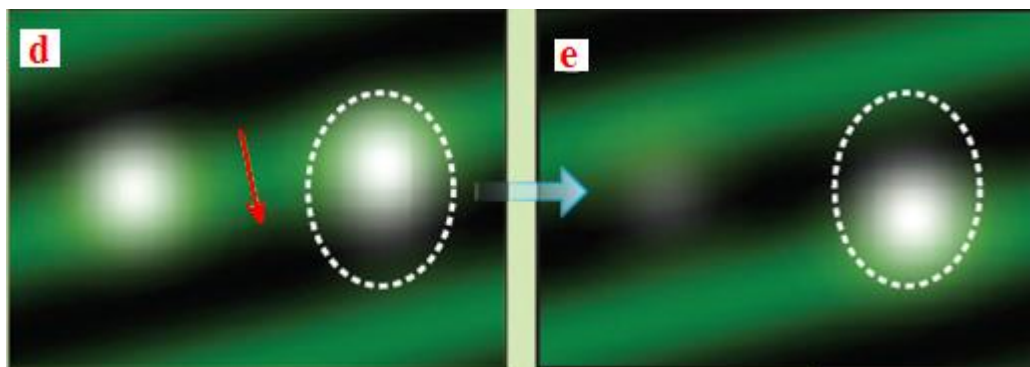
pohyblivá difrakční mřížka produkující strukturované osvětlení, více světelných paprsků, dávající vzorovaný obraz (Obr. 11). Strukturované (pruhované) světlo dopadá na vzorek a pohybuje se po něm v rovině  $xy$  (rovnoměrně i rotují), pohybem světelného vzoru dochází k rozlišitelným změnám signálu fluorescence molekul, které mohou být zaznamenány v čase a prostoru citlivým detektorem (Obr. 12). Tyto informace pomohou ve zviditelnění jemných detailů obrazu každého fluoroforu, které jsou zpracovány analýzou obrazu pomocí výpočetní techniky. Je-li známá frekvence osvětlení, může se získat informace o struktuře objektu. Výsledkem je komplexní obraz s rozlišením 100 nm ve směru  $xy$  (Gustafsson et al. 2005, Ahn et al. 2010). Vylepšení rozlišení zajišťuje konstrukce mikroskopu, nikoliv vlastnosti fluoroforů, proto SIM může využívat běžných fluoroforů vhodných pro klasickou FM, oproti ní je ale velmi pomalá a přesnější při pozorování statických vzorků. 3D SIM dosahuje rozlišení 200 nm v ose  $z$ , za použití 3 interferenčních paprsků místo jednoho u 2D SIM.



**Obr. 11:** Optické schéma SIM mikroskopu. Interferenční paprsek a) prochází přes difrakční mřížku a polarizátory a vyvábí pruhovanou strukturu excitovaného světla v rovině ohniska. Převzato z Ahn (2010).

**Obr. 12:** Průběh SIM osvětlení. Šipkou je znázorněn posun pruhů strukturovaného osvětlení během časového posunu z d) k obrazu e). Dochází ke změně signálu fluorescence molekuly vzorku. Převzato z Toomre and

Bewersdorf (2010).



SIM je technika vysokého rozlišení, je levná (oproti STED), uživatelsky jednoduchá, umožňuje detekci několika barev najednou (3 i více detekovatelných  $\lambda$ ) a kvalitní 3D zobrazení, (Schermelleh et al. 2008). 3D SIM byly pozorovány například jaderné póry a jaderná lamina, s lepším rozlišením než má konfokální mikroskop, ovšem nikoliv in vivo (Schermelleh et al. 2008). Vysoké axiální rozlišení a fluorescenční barvení podporuje využití SIM při konstrukci trojrozměrných obrazů buněčných struktur. Jak ukazují Fitzgibbon a kol. na pozorování struktury plazmodesmat buněk tabáku, 3D-SIM může přispět k poznání struktury buněk a tkání i rostlinného těla. Pomáhá tak překlenout propast mezi konfokální a elektronovou mikroskopií (Fitzgibbon et al. 2010). Spojení SIM a TIRFM v jednom optickém systému přineslo pozorování mikrotubulárního cytoskeletu in vivo a s vyšší rychlostí než samotný SIM (Kner et al. 2009). Toho by se dalo využít i pro pozorování rostlinných buněk. Nicméně nízká rychlost a rychlé vysvícení fluoroforů je překážkou. SSIM (saturated structured illumination microscopy) využívá strukturovaného světla, ale narozdíl od SIM, světla o vysokých intenzitách pro dosažení saturované emise fluoroforů a rozlišení až 50 nm  $xy$ . SSIM by tak měla být omezena pouze životností fluoroforů a nikoliv použitým světlem (Gustafsson 2005). SSIM pracuje i na vyšších rychlostech pořizování řezů, nabízí možnost vysokorychlostní SSIM (Ahn et al. 2010).

#### **4.4.5. AFM (Atomic force microscopy)**

Jako zástupce metod nespádajících do světelné mikroskopie zde bude zmíněna mikroskopie atomárních sil, jelikož nabízí přístup k zobrazování povrchů buněk a jejich změn, vyvolaných např. masivní endocytózou (Hecht et al. 2011). Pracuje se záznamem konkrétních vlastností povrchů, pořizovaným miniaturním hrotem a detektorem jeho pohybu. Existuje více režimů pořizování záznamu, jako je akustický AC, scanning tunnelling (STC), kontaktní. Obecně je výhodou rychlá, snadná příprava vzorků, rychlé pořizování snímků a malé poškození vzorku při skenování. Přitom pro pevné povrchy AFM poskytuje rozlišení v jednotkách nanometrů, tedy rozlišení atomárního složení. Pro živé vzorky je nutné použít nízko-silový režim kontaktní AFM (low force mode), aby nedocházelo k mechanickému poškození povrchů buněk a pořizování artefaktů. AFM zobrazování živých buněk pak může přispět ke studiu struktury povrchu membrán, jejich dynamiky a složení (ve spojení se spektrofotometrií), (Hecht et al. 2011).

V rostlinné biologii je překážkou pro vizualizaci membrán BS, ale i ta může být předmětem studia. AFM byla dokonce i použita pro výzkum struktury BS buněk tracheárních elementů, ovšem nikoliv v nativním stavu (Lacayo et al. 2010). Pohybuje-li se AFM v nízko-silovém režimu neklesá jen rozlišení, ale i rychlost snímání. Pozorování změn na živých buňkách vyžaduje vysoké rozlišení, rychlost snímání i citlivé zacházení. Byl vyvinut tedy i vysokorychlostní režim citlivé AFM, jímž lze pozorovat např. živé bakterie a dynamiku jejich povrchu (Fantner et al. 2010).

## **5. Závěr**

Endocytóza i exocytóza jsou děje, jejichž podrobné pozorování vyžaduje zobrazení dosahujícího tzv. super rozlišení. Difrakční limit světelné mikroskopie (200nm) byl překonán především spojením vlastností použitého světla a vlastností fluoroforů tak, že moderní metody světelné mikroskopie dosahují rozlišení stovek (SIM) i desítek nanometrů (PALM, STED, STORM, AFM) při pozorování struktur i v živých buňkách. Problémy, které je nutné vyřešit do budoucna, jsou rychlost pořizování optických řezů a jejich tloušťka (z rozlišení).

## 6. Seznam použité literatury

- Ahn M, Kim T, Kim Y, Gweon D, Lee J-H. 2010.** Cross structured illumination for high speed high resolution line scanning confocal microscopy. *Measurement Science and Technology* 1.
- Assaad FF, Qiu JL, Youngs H, Ehrhardt D, Zimmerli L, Kalde M, Wanner G, Peck SC, Edwards H, Ramonell K, Somerville CR, Thordal-Christensen H. 2004.** The PEN1 syntaxin defines a novel cellular compartment upon fungal attack and is required for the timely assembly of papillae. *Molecular Biology of the Cell* 15: 5118-5129.
- Axelrod D. 1981.** Cell-Substrate contacts illuminated by total reflection fluorescence. *Journal of Cell Biology* 89: 141-145.
- Axelrod D. 2001.** Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology. *Traffic* 2: 764-774. Review.
- Bahlmann K, Jakobs S, Hell SW. 2001.** 4Pi-confocal microscopy of live cells. *Ultramicroscopy* 87: 155-164.
- Baluška F, Hlavacka A, Šamaj J, Palme K, Robinson DG, Matoh T, McCurdy DW, Menzel D, Volkmann D. 2002.** F-actin-dependent endocytosis of cell wall pectins in meristematic root cells. Insights from brefeldin A-induced compartments. *Plant Physiology* 130: 422-431.
- Baluška F, Šamaj J, Hlavacka A, Kendrick-Jones J, Volkmann D. 2004.** Actin-dependent fluid-phase endocytosis in inner cortex cells of maize root apices. *Journal of Experimental Botany*.
- Barth M, Holstein S. 2004.** Identification and functional characterization of Arabidopsis AP180, a binding partner of plant a C-adaptin. *Journal of Cell Science*.
- Bednarek SY, Backues SK. 2010.** Plant dynamin-related protein families DRP1 and DRP2 in plant development. *Biochemical Society Transactions* 38: 797-806.
- Betzig E, Patterson GH, Sougrat R, Lindwasser OW, Olenych S, Bonifacino JS, Davidson MW, Lippincott-Schwartz J, Hess HF. 2006.** Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution. *Science*.
- Blackbourn HD, Jackson AP. 1996.** Plant clathrin heavy chain: Sequence analysis and restricted localisation in growing pollen tubes. *Journal of Cell Science* 109: 777-786.
- Bolte S, Talbot C, Boutté Y, Catrice O, Read ND, Satiat-Jeunemaitre B. 2004.** FM-dyes as experimental probes for dissecting vesicle trafficking in living plant cells. *Journal of Microscopy Oxford* 214: 159-173.
- Boutté Y, Grebe M. 2009.** Cellular processes relying on sterol function in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 12: 705-713. Review.
- Boutté Y, Frescatada-Rosa M, Men S, Chow Ch-M, Ebine K, Gustavsson A, Johansson L, Ueda T, Moore I, Jürgens G, Grebe M. 2009.** *The EMBO Journal* 1-13.
- Boutté Y, Crosnier MT, Carraro N, Traas J, Satiat-Jeunemaitre B. 2006.** *Journal of Cell Science* 119: 1255-126.
- Boyd C, Hughes T, Pypaert M, Novick P. 2004.** Vesicles carry most exocyst subunits to exocytic sites marked by the remaining two subunits, Sec3p and Exo70p. *Journal of Cell Biology* 167: 889-901.
- Bröcker C, Engelbrecht-Vandre S, Ungermann C. 2010.** Multisubunit Tethering Complexes and Their Role in Membrane Fusion. *Current Biology* 20: R943-R952.
- Cai HQ, Reinisch K, Ferro-Novick S. 2007.** Coats, tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle. *Developmental*

Cell 12: 671-682.

- Cheung AY, Boavida LC, Aggarwal M, Wu HM, Feijó JA. 2010.** The pollen tube journey in the pistil and imaging the in vivo process by two-photon microscopy. *J. Expt. Bot.* 7: 1907-1915.
- Chong YT, Gidda SK, Sanford C, Parkinson J, Mullen RT, Goring DR. 2010.** Characterization of the *Arabidopsis thaliana* exocyst complex gene families by phylogenetic, expression profiling, and subcellular localization studies. *New Phytologist* 185: 401-419.
- Cole RA, Synek L, Žárský V, Fowler JE. 2005.** SEC8, a subunit of the putative *Arabidopsis* exocyst complex, facilitates pollen germination and competitive pollen tube growth. *Plant Physiology* 138: 2005-2018.
- Combs Ach. 2010.** *Fluorescence Microscopy: A Concise Guide to Current Imaging Methods.* Current Protocols in Neuroscience (www.interscience.wiley.com).
- Cram WJ. 1980.** Pinocytosis in plants. *New Phytologist* 84: 1-17.
- Crowther RA, Pearse BMF. 1981.** Assembly and Packing of Clathrin into Coats. *The Journal of Cell Biology* 91.
- Davidson MW, Abramowitz M. 2002.** Optical Microscopy. *Encyclopedia of Imaging Science and Technology.*
- Dhonukshe P, Aniento F, Hwang I, Robinson DG, Mravec J, Stierhof YD, Friml J. 2007.** Clathrin-mediated constitutive endocytosis of PIN auxin efflux carriers in *Arabidopsis*. *Current Biology* 17: 520-527.
- Dhonukshe P, Tanaka H, Goh T, Ebine K, Mahonen AP, Prasad K, Blilou I, Geldner N, Xu J, Uemura T, Chory J, Ueda T, Nakano A, Scheres B, Friml J. 2008.** Generation of cell polarity in plants links endocytosis, auxin distribution and cell fate decisions. *Nature* 456: 962-U975.
- Dlasková A, Špaček T, Santorová J, Plecita-Hlavata L, Berková Z, Saudek F, Lessard M, Bewersdorf J, Ježek P. 2010.** 4Pi microscopy reveals an impaired three-dimensional mitochondrial network of pancreatic islet beta-cells, an experimental model of type-2 diabetes. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1797: 1327-1341.
- Doherty GJ, McMahon HT. 2009.** Mechanisms of Endocytosis. *Annual Review of Biochemistry* 78: 857-902.
- Eliáš M, Drdová E, Ziak D, Bavlínka B, Hála M, Cvrčková F, Soukupová H, Žárský V. 2003.** The exocyst complex in plants. *Cell Biology International* 27: 199-201.
- Emons AMC, Traas JA. 1986.** Coated pits and coated vesicles on the plasma membrane of plant. *European Journal of Cell Biology* 41: 57-64.
- Enami K, Ichikawa M, Uemura T, Kutsuna N, Hasezawa S, Nakagawa T, Nakano A, Sato MH. 2009.** Differential Expression Control and Polarized Distribution of Plasma Membrane-Resident SYP1 SNAREs in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 50: 280-289.
- Ettxeberria B, Baroje-Fernandez E, Munoz FJ, Pozueta-Romero J. 2005.** *Plant Cell Physiol.* 46(3): 474-481
- Fasshauer D, Sutton RB, Brunger AT, Jahn R. 1998.** Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 15781-15786.
- Fantner GE, Barbero RJ, Gray DS, Belcher AM, 2010.** Kinetics of antimicrobial peptide activity measured on individual bacterial cells using high-speed atomic force microscopy. *Nature Nanotechnology* 3.
- Fendrych M, Synek L, Pečenková T, Toupalová H, Cole R, Drdová E, Nebesarová J,**



- Šedinová M, Hála M, Fowler JE, Žárský V. 2010.** The Arabidopsis Exocyst Complex Is Involved in Cytokinesis and Cell Plate Maturation. *Plant Cell* 22.
- Fernandez-Suarez M, Ting AY. 2008.** Fluorescent probes for super-resolution imaging in living cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9: 929-943. Review.
- Fitzgibbon J, Bell K, King E, Oparka K. 2010.** Super-Resolution Imaging of Plasmodesmata Using Three-Dimensional Structured Illumination Microscopy. *Plant Physiology* 153: 1453-1463.
- Fix M, Melia TJ, Jaiswal JK, Rappoport JZ, You DQ, Sollner TH, Rothman JE, Simon SM. 2004.** Imaging single membrane fusion events mediated by SNARE proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 7311-7316.
- Fotin A, Kirchhausen T, Grigorieff N, Harrison SC, Walz T, Cheng YF. 2006.** Structure determination of clathrin coats to subnanometer resolution by single particle cryo-electron microscopy. *Journal of Structural Biology* 156: 453-460.
- Fujimoto M, Arimuraa S, Uedab T, Takanashia H, Hayashia Y, Nakano A, Tsutsumi N. 2010.** Arabidopsis dynamin-related proteins DRP2B and DRP1A participate together in clathrin-coated vesicle formation during endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 6094-9.
- Fujimoto M, Arimura SI, Nakazono M, Tsutsumi N. 2008.** Arabidopsis dynamin-related protein DRP2B is co-localized with DRP1A on the leading edge of the forming cell plate. *Plant Cell Reports* 27: 1581-1586.
- Geldner N, Jürgens G. 2006.** Endocytosis in signalling and development. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 589-594.
- Geldner N, Anders N, Wolters H, Keicher J, Kornberger W, Müller P, Delbarre A, Ueda T, Nakano A, Jürgens G. 2003.** The Arabidopsis GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth. *Cell* 112: 219-230.
- Geldner N, Friml J, Stierhof YD, Jürgens G, Palme K. 2001.** Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature* 413: 425-428.
- Grebe M, Xu J, Mobius W, Ueda T, Nakano A, Geuze HJ, Rook MB, Scheres B. 2003.** Arabidopsis sterol endocytosis involves actin-mediated trafficking via ARA6-positive early endosomes. *Current Biology* 13: 1378-1387.
- Grote E, Carr CM, Novick PJ. 2000.** Ordering the final events in yeast exocytosis. *Journal of Cell Biology* 151: 439-451.
- Guo W, Grant A, Novick P. 1999a.** Exo84p is an exocyst protein essential for secretion. *Journal of Biological Chemistry* 274: 23558-23564.
- Guo W, Roth D, Walch-Solimena C, Novick P. 1999b.** The exocyst is an effector for Sec4p, targeting secretory vesicles to sites of exocytosis. *Embo Journal* 18: 1071-1080.
- Gustafsson MGL. 2005.** Nonlinear structured-illumination microscopy: Wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 13081–13086.
- Gutierrez R, Grossmann G, Frommer WB, Ehrhardt DW. 2010.** Opportunities to Explore Plant Membrane Organization with Super-Resolution Microscopy. *Plant Physiology* 154: 463-466. Review.
- Hála M, Cole R, Synek L, Drdová E, Pečenková T, Nordheim A, Lamkemeyer T, Madlung J, Hochholdinger F, Fowler JE, Žárský V. 2008.** An exocyst complex functions in plant cell growth in Arabidopsis and tobacco. *Plant Cell* 20: 1330-1345.
- Haney CH, Long SR. 2010.** Plant flotillins are required for infection by nitrogen-fixing bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 107: 1111-1116.

- Hazak O, Bloch D, Poraty L, Sternberg H, Zhang J, Yalovsky J. 2010.** A Rho Scaffold Integrates the Secretory System with Feedback Mechanisms in Regulation of Auxin Distribution. *PLoS Biol* 8(1).
- He B, Xi F, Zhang XY, Zhang J, Guo W. 2007.** Exo70 interacts with phospholipids and mediates the targeting of the exocyst to the plasma membrane. *Embo Journal* 26: 5167-5167.
- Hecht E, Usmani SM, Albrecht S, Wittekindt OH, Dietl P, Mizaikoff B, Kranz C. 2011.** Atomic force microscopy of microvillous cell surface dynamics at fixed and living alveolar type II cells. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 399: 2369-2378.
- Hell SW, Schrader M, Van der Voort HTM. 1997.** Fier-field fluorescence microscopy with three dimensional resolution in the 100-nm range. *Journal of Microscopy*.
- Hell SW, Wichmann J. 1994.** Breaking the diffraction resolution limit by STimulated-Emission-Depletion fluorescece microscopy. *Optics Letters* 19: 780-782.
- Hess ST, Girirajan TPK, Mason MD. 2006.** Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. *Biophysical Journal* 91: 4258-4272.
- Higdon PD, Torok P, Wilson T. 1999.** Imaging properties of high aperture multiphoton fluorescence scanning optical microscopes. *Journal of Microscopy-Oxford* 193: 127-141.
- Holstein SEH. 2002.** Clathrin and Plant Endocytosis. *Traffic*.
- Hong Z, Bednarek SY, Blumwald E, Hwang I, Jürgens G, Menzel D, Osteryoung KW, Raikhel NV, Shinozaki K, Tsutsumi N, Verma DPS. 2003.** A unified nomenclature for Arabidopsis dynamin-related large GTPases based on homology and possible functions. *Plant Molecular Biology* 53: 261-265.
- Horn MA, Heinstei PF, Low PS. 1989.** Receptor-Mediated endocytosis in plant cells. *Plant Cell* 1: 1003-1009.
- Huang B, Babcock H, Zhuang XW. 2010.** Breaking the Diffraction Barrier: Super-Resolution Imaging of Cells. *Cell* 143: 1047-1058.
- Huang B, Wang W, Bates M, Zhuang X. 2008.** Three-Dimensional Super-Resolution Imaging by Stochastic Optical Reconstruction Microscopy. *Science*. 810-813
- Hunt JM, Bommert K, Charlton MP, Kistner A, Habermann E, Augustine GJ, Betz H. 1994.** Post-docking roel for synaptobrevin in synaptic vesicle fusion. *Neuron* 12: 1269-1279.
- Hwang I, Robinson DG. 2009.** Transport vesicle formation in plant cells. *Current Opinion in Plant Biology* 12: 660-669.
- Inoué S. 2006.** Foundations of Confocal Scanned Imaging in Light Microscopy. *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, third edition, edited by James B. Pawley, SpringerScience Business Media.
- Jürgens G, Geldner N. 2002.** Protein secretion in plants: From the trans-Golgi network to the outer space. *Traffic* 3: 605-613.
- Kanaseki T, Kadota K. 1969.** The "Vesicle in a Basket". From the Department of Anatomy and the Department of Pharmacology, School of Medicine, Osaka University, Osaka.
- Kang BH, Busse JS, Bednarek SY. 2003.** Members of the Arabidopsis dynamin-like gene family, ADL1, are essential for plant cytokinesis and polarized cell growth. *Plant Cell* 15: 899-913.
- Kner P, Chun BB, Griffis ER, Winoto L, Gustafsson MGL. 2009.** Super resolution video microscopy of live cells by structured illumination. *Nature Methods* 6: 339-196.
- Konopka CA, Bednarek SY. 2008a.** Comparison of the dynamics and functional redundancy of the arabidopsis dynamin-related isoforms DRP1A and DRP1C during plant development. *Plant Physiology* 147: 1590-1602.
- Konopka CA, Bednarek SY. 2008b.** Variable-angle epifluorescence microscopy: a new way

- to look at protein dynamics in the plant cell cortex. *Plant Journal* 53: 186-196.
- Konopka CA, Backues SK, Bednarek SY. 2008.** Dynamics of Arabidopsis dynamin-related protein 1C and a clathrin light chain at the plasma membrane. *Plant Cell* 20: 1363-1380.
- Kulich I, Cole R, Drdová E, Cvrčková F, Soukup A, Fowler J, Žárský V. 2010.** Arabidopsis exocyst subunits SEC8 and EXO70A1 and exocyst interactor ROH1 are involved in the localized deposition of seed coat pectin. *New Phytologist* 188: 615-625.
- Lacayo CI, Malkin AJ, Holman HYN, Chen LA, Ding SY, Hwang MS, Thelen MP. 2010.** Imaging Cell Wall Architecture in Single *Zinnia elegans* Tracheary Elements. *Plant Physiology* 154: 121-133.
- Laloi M, Perret A-M, Chatre, L. 2007.** Insights into the Role of Specific Lipids in the formation and delivery of lipid microdomains to the plasma membrane of plant cell. *Plant physiology*.
- Lauber MH, Waizenegger I, Steinmann T, Schwarz H, Mayer U, Hwang I, Lukowitz W, Jürgens G. 1997.** The Arabidopsis KNOLLE protein is a cytokinesis-specific syntaxin. *Journal of Cell Biology* 139: 1485-1493.
- Lavy M, Bloch D, Hazak O, Gutman I, Poraty L, Sorek N, Sternberg H, Yalovsky S. 2007.** A novel ROP/RAC effector links cell polarity, root-meristem maintenance, and vesicle trafficking. *Current Biology* 17: 947-952.
- Li SP, Van Os GMA, Ren SC, Yu DL, Ketelaar T, Emons AMC, Liu CM. 2010.** Expression and Functional Analyses of EXO70 Genes in Arabidopsis Implicate Their Roles in Regulating Cell Type-Specific Exocytosis. *Plant Physiology* 154: 1819-1830.
- Lin RC, Scheller RH. 1997.** Structural organization of the synaptic exocytosis core complex. *Neuron* 19: 1087-1094.
- Lippincott-Schwartz J, Patterson GH. 2009.** Photoactivatable fluorescent proteins for diffraction-limited and super-resolution imaging. *Trends in Cell Biology* 19: 555-565.
- Manley S, Gillette JM, Patterson GH, Shroff H, Hess HF, Betzig E, Lippincott-Schwartz J. 2008.** High-density mapping of single-molecule trajectories with photoactivated localization microscopy. *Nature Methods* 5: 155-157.
- Marks B, Stowell MHB, Vallis Y, Mills IG, Gibson A, Hopkins CR, McMahon HT. 2001.** GTPase activity of dynamin and resulting conformation change are essential for endocytosis. *Nature* 410: 231-235.
- Matheson LA, Suri SS, Hanton SL, Chatre L, Brandizzi F. 2008.** Correct targeting of plant ARF GTPases relies on distinct protein domains. *Traffic* 9: 103-120.
- Meckel T, Hurst AC, Thiel G, Homann U. 2004.** Endocytosis against high turgor: intact guard cells of *Vicia faba* constitutively endocytose fluorescently labelled plasma membrane and GFP-tagged K<sup>+</sup>-channel KAT1. *Plant Journal* 39: 182-193.
- Men SZ, Boutte Y, Ikeda Y, Li XG, Palme K, Stierhof YD, Hartmann MA, Moritz T, Grebe M. 2008.** Sterol-dependent endocytosis mediates post-cytokinetic acquisition of PIN2 auxin efflux carrier polarity. *Nature Cell Biology* 10: 237-U124.
- Minsky M. 1988.** Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scanning* 10.
- Molendijk AJ, Ruperti B, Palme K. 2004.** Small GTPases in vesicle trafficking. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 694-700.
- Moneron G, Hell SW. 2009.** Two-photon excitation STED microscopy. *Optics Express* 17: 14567-14573.
- Moneron G, Medda R, Hein B, Giske A, Westphal V, Hell SW. 2010.** Fast STED microscopy with continuous wave fiber lasers. *Optics Express* 18: 1302-1309.
- Mongrand S, Stanislas T, Bayer EMF, Lherminier J, Simon-Plas F. 2010.** Membrane rafts in plant cells. *Trends in Plant Science* 15: 656-663.

- Murphy SA, Bandyopadhyay A, Holstein S, Peer W. 2005.** Endocytotic cycling of PM proteins. *Annual Review of Plant Biology*.
- Nabi IR, Le PU. 2003.** Caveolae/raft-dependent endocytosis. *Journal of Cell Biology* 161: 673-677. Review.
- Nagorni M, Hell SW. 1998.**4Pi-Confocal Microscopy Provides Three-Dimensional Images of the Microtubule Network with 100 to 150 nm Resolution. *Journal of Structural Biology*.123: 236-247.
- Nielsen E, Cheung AY, Ueda T. 2008.** The regulatory RAB and ARF GTPases for vesicular trafficking. *Plant Physiology* 147: 1516-1526. Review.
- Onelli E, Prescianotto-Baschong C, Caccianiga M, Moscatelli A. 2008.** Clathrin-dependent and independent endocytic pathways in tobacco protoplasts revealed by labelling with charged nanogold. *Journal of Experimental Botany* 59: 3051-3068.
- Opazo F, Punge A, Bückers J, Hoopmann P, Kastrup L, Hell SW, Rizzoli SO. 2010.** Limited Intermixing of Synaptic Vesicle Components upon Vesicle Recycling. *Traffic* 11: 800-812.
- Orlando K, Guo W. 2009.** Membrane Organization and Dynamics in Cell Polarity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 1.
- Orlando K, Sun XL, Zhang JA, Lu T, Yokomizo L, Wang PY, Guo W. 2011.** Exo-endocytic trafficking and the septin-based diffusion barrier are required for the maintenance of Cdc42p polarization during budding yeast asymmetric growth. *Molecular Biology of the Cell* 22: 624-633.
- Paredes AR, Somerville ChR, Ehrhardt DW. 2006.** Visualization of Cellulose Synthase Demonstrates Functional Association with Microtubules. *Science*: 1491-5.
- Paungfoo-Lonhienne C, Rentsch D, Robatzek S, Webb RI, Sagulenko E, Nasholm T, Schmidt S, Lonhienne TGA. 2010.** Turning the Table: Plants Consume Microbes as a Source of Nutrients. *Plos One* 5.
- Pearse BMF. 1976.** Clathrin-unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73: 1255-1259.
- Pečenková T, Hála M, Kulich I, Kocourková D, Drdová E, Fendrych M, Toupalová H, Žárský V. 2011.** The role for the exocyst complex subunits Exo70B2 and Exo70H1 in the plant-pathogen interaction. *Journal of Experimental Botany* 62: 2107-2116.
- Peskan T, Westermann M, Oemüller R. 2001.** Identification of low-density Triton X-100-insoluble plasma membrane microdomains in higher plants. *European Journal of Biochemistry*.
- Plášek J, Reischig J. 1995.** Kontrast v optické mikroskopii. *Vesmír* 74, 638.
- Ren Y, Yip CK, Tripathi A, Huie D, Jeffrey PD, Walz T, Hughson FM. 2009.** A Structure-Based Mechanism for Vesicle Capture by the Multisubunit Tethering Complex Dsl1. *Cell* 139: 1119-1129.
- Richter S, Geldner N, Schrader J, Wolters H, Stierhof YD, Rios G, Koncz C, Robinson DG, Jürgens G. 2007.** Functional diversification of closely related ARF-GEFs in protein secretion and recycling. *Nature* 448: 488-U410.
- Ridley AJ. 2006.** Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends in Cell Biology* 16: 522-529. Review.
- Robinson MS, Bonifacino JS. 2001.** Adaptor-related proteins. *Current Opinion in Cell Biology* 13: 444-453. Review.
- Rust MJ, Bates M, Zhuang XW. 2006.** Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nature Methods* 3: 793-795.

- Sahl SJ, Leutenegger M, Hilbert M, Hell SW, Eggeling Ch. 2010.** Fast molecular tracking maps nanoscale dynamics of plasma membrane lipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 15: 6829–6834.
- Šamaj J, Baluška F, Voigt B, Schlicht M, Volkmann D, Menzel D. 2004.** Endocytosis, actin cytoskeleton, and signaling. *Plant Physiology* 135: 1150-1161.
- Samuel MA, Chong YT, Haasen KE, Aldea-Brydges MG, Stone SL, Goring DR. 2009.** Cellular Pathways Regulating Responses to Compatible and Self-Incompatible Pollen in Brassica and Arabidopsis Stigmas Intersect at Exo70A1, a Putative Component of the Exocyst Complex. *Plant Cell* 21: 2655-2671.
- Sanderfoot A. 2007.** Increases in the number of SNARE genes parallels the rise of multicellularity among the green plants. *Plant Physiology* 144: 6-17. Review.
- Sandhu APS, Randhawa GS, Dhugga KS. 2009.** Plant Cell Wall Matrix Polysaccharide Biosynthesis. *Molecular Plant* 2: 840-850. Review.
- Scales SJ, Chen YA, Yoo BY, Patel SM, Doung YC, Scheller RH. 2000.** SNAREs contribute to the specificity of membrane fusion. *Neuron* 26: 457-464.
- Semwogerere D, Weeks ER. 2005.** Confocal Microscopy. *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*.
- Shaw PJ. 2005.** Comparison of Widefield/Deconvolution and Confocal Microscopy for Three-Dimensional Imaging. *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, third edition. Springer Science and Business Media.
- Simons K, Ikonen E. 1997.** Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387: 569-572. Review.
- Sivaram MVS, Saporita JA, Furgason MLM, Boettcher AJ, Munson M. 2005.** Dimerization of the exocyst protein Sec6p and its interaction with the t-SNARE Sec9p. *Biochemistry* 44: 6302-6311
- Schermelleh L, Heintzmann R, Leonhardt H. 2010.** A guide to super-resolution fluorescence microscopy. *J. Cell Biology* 190: 2 165–175. Review.
- Schermelleh L, Carlton PM, Haase S, Shao L, Winoto L, Kner P, Burke B, Cardoso MC, Agard DA, Gustafsson MGL, Leonhardt H, Sedat JW. 2008.** Subdiffraction Multicolor Imaging of the Nuclear Periphery with 3D Structured Illumination Microscopy. *Science*. 6: 1332–1336.
- Sollner T, Bennett MK, Whiteheart SW, Scheller RH, Rothman JE. 1993.** A protein assembly-disassembly pathway in-vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell* 75: 409-418.
- Son O, Yang H-S, Lee H-J, Shin K-H. 2003.** Expression of srab7 and SCaM genes required for endocytosis of Rhizobium in root nodules. *Plant Science*.
- Souter M, Topping J, Pullen M, Friml J, Palme K, Hackett R, Grierson D, Lindsey K. 2002.** Hydra mutants of Arabidopsis are defective in sterol profiles and auxin and ethylene signaling. *Plant Cell* 14: 1017-1031.
- Sparkes IA, Graumann K, Martiniere A, Schoberer J, Wang P, Osterrieder A. 2011.** Bleach it, switch it, bounce it, pull it: using lasers to reveal plant cell dynamics. *Journal of Experimental Botany* 62: 1-7. Review.
- Stelzer EHK. 1998.** Contrast, resolution, pixelation, dynamic range and signal-to-noise ratio: fundamental limits to resolution in fluorescence light microscopy. *Journal of Microscopy-Oxford* 189: 15-24.
- Subach FV, Patterson GH, Renz M, Lippincott-Schwartz J, Verkhusha VV. 2010.** Bright Monomeric Photoactivatable Red Fluorescent Protein for Two-Color Super-Resolution sptPALM of Live Cells. *Journal of the American Chemical Society* 132: 6481-6491.
- Subach FV, Patterson GH, Manley S, Gillette JM, Lippincott-Schwartz J, Verkhusha**

- VV. 2009.** Photoactivatable mCherry for high-resolution two-color fluorescence microscopy. *Nature Methods* 6: 153-159.
- Swedlow JR, Hu K, Andrews PD, Roos DS, Murray JM. 2001.** Measuring tubulin content in *Toxoplasma gondii*: A comparison of laser-scanning confocal and wide-field fluorescence microscopy. *Proceedings of the national academy of sciences of USA*.
- Synek L, Schlager N, Eliáš M, Quentin M, Hauser MT, Žárský V. 2006.** AtEXO70A1, a member of a family of putative exocyst subunits specifically expanded in land plants, is important for polar growth and plant development. *Plant Journal* 48: 54-72.
- Taylor MJ, Perrais D, Merrifield CJ. 2011.** A High Precision Survey of the Molecular Dynamics of Mammalian Clathrin-Mediated Endocytosis. *Plos Biology* 9. Review.
- TerBush DR, Maurice T, Roth D, Novick P. 1996.** The Exocyst is a multiprotein complex required for exocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo Journal* 15: 6483-6494.
- Thomas CL, Bayer EM, Ritzenthaler Ch, Fernandez-Calvino L, Maule AJ. 2008.** Specific targeting of a plasmodesmal protein affecting cell-to-cell communication. *PLoS Biol*.
- Toomre D, Bewersdorf J. 2010.** A new wave of cellular imaging. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 26: 285–314
- Tyrrell M, Campanoni P, Sutter JU, Pratelli R, Paneque M, Sokolovski S, Blatt MR. 2007.** Selective targeting of plasma membrane and tonoplast traffic by inhibitory (dominant-negative) SNARE fragments. *Plant Journal* 51: 1099-1115.
- Ueda K, Tan K, Sato F, Yamada Y. 1978.** Phagocytosis in plant protoplasts. *Cell Structure and Function* 3: 25-30.
- Uemura T, Ueda T, Ohniwa RL, Nakano A, Takeyasu K, Sato MH. 2004.** Systematic analysis of SNARE molecules in *Arabidopsis*: Dissection of the post-Golgi network in plant cells. *Cell Structure and Function* 29: 49-65.
- Van Damme D, Gadeyne A, Vanstraelen M, Inze D, Van Montagu MCE, De Jaeger G, Russinova E, Geelen D. 2011.** Adaptin-like protein TPLATE and clathrin recruitment during plant somatic cytokinesis occurs via two distinct pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 615-620.
- Verma DPS. 1992.** Signals in root nodule organogenesis and endocytosis of rhizobium. *Plant Cell* 4: 373-382. Review.
- Vernoud V, Horton AC, Yang ZB, Nielsen E. 2003.** Analysis of the small GTPase gene superfamily of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 131: 1191-1208.
- Wiederkehr A, De Craene JO, Ferro-Novick S, Novick P. 2004.** Functional specialization within a vesicle tethering complex: bypass of a subset of exocyst deletion mutants by Sec1p or Sec4p. *Journal of Cell Biology* 167: 875-887.
- Wildanger D, Medda R, Kastrop L, Hell SW. 2009.** A compact STED microscope providing 3D nanoscale resolution. *Journal of Microscopy-Oxford* 236: 35-43.
- Willig KI, Rizzoli SO, Westphal V, Jahn R, Hell SW. 2006.** STED microscopy reveals that synaptotagmin remains clustered after synaptic vesicle exocytosis. *Nature* 440: 935-939.
- Wolf DE. 2007.** Fundamentals of fluorescence and fluorescence microscopy. Pages 63+. *Digital Microscopy*, 3rd Edition, vol. 81.
- Wu Q, Merchant FA, Castleman KR. 2008.** *Microscope Image Processing*. Elsevier.
- Žárský V, Potocký M. 2010.** Recycling domains in plant cell morphogenesis: small GTPase effectors, plasma membrane signalling and the exocyst. *Biochemical Society Transactions* 38: 723-728.
- Žárský V, Cvrčková F, Potocký M, Hála M. 2009.** Exocytosis and cell polarity in plants - exocyst and recycling domains. *New Phytologist* 183: 255-272. Review.
- Zhang XY, Bi EF, Novick P, Du LL, Kozminski KG, Lipschutz JH, Guo W. 2001.** Cdc42

interacts with the exocyst and regulates polarized secretion. *Journal of Biological Chemistry* 276: 46745-46750.

**Zonia L, Munnik T. 2008.** Vesicle trafficking dynamics and visualization of zones of exocytosis and endocytosis in tobacco pollen tubes. *Journal of Experimental Botany* 59:861-873.

<http://www.microscopyu.com>

<http://www.olympus.com>

<http://www.activemotif.com>