

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra experimentální biologie rostlin



Lokalizace proteinu ARPC2 v rostlinné buňce

Bc. Kateřina Šlajcherová

Praha, 2013

školitelka: RNDr. Kateřina Schwarzzerová, Ph.D.

Prohlašuji, že práce byla vypracována samostatně, s použitím citované literatury a pod vedením školitelky. Práce ani její část nebyla předložena pro získání stejného ani jiného akademického titulu.

V Praze,

Kateřina Šlajcherová

Poděkování:

Děkuji Erice Bellinvia za poskytnutí konstruktu GFP-NtARPC2.

Děkuji své školitelce Katce Schwarzerové za vedení v průběhu experimentů a za opravy, úpravy a náměty v průběhu psaní této práce.

Lukáši Fischerovi a Jindřišce Fišerové děkuji za cenné konzultace v průběhu experimentování, Lence Dvořákové, Lence Havelkové, Janě Krtkové, Mířovi Tyčovi a Standovi Vosolsobě pak za nejednu pomoc s technickými záležitostmi.

Martině Benákové, Lucii Polákové a Petře Schiebertové děkuji za všechnu čokoládu a nové pohledy.

Mamince a Wawimu děkuji za to ostatní, co není vidět.

A všem dohromady děkuji za podporu.

Práce byla podpořena grantem P501/12/1176 (GAČR) a MSM 0021620858 (MŠMT)

Obsah

1	Abstrakt.....	9
2	Abstract.....	10
3	Úvod.....	11
4	Přehled literatury.....	13
4.1	Role aktinu v buňce.....	13
4.2	Polymerace aktinu, jeho dynamika a nukleace.....	14
4.3	ARP2/3 komplex v živočiších.....	15
4.4	ARP2/3 komplex v rostlinách.....	17
4.5	Aktivace a regulace ARP2/3 komplexu.....	21
4.6	Funkce ARP2/3 komplexu v <i>Arabidopsis thaliana</i>	24
4.7	Podjednotky ARP2/3 komplexu.....	26
4.7.1	Lokalizace podjednotek ARP2/3 komplexu u živočichovů a hub.....	26
4.7.2	Lokalizace jednotlivých podjednotek ARP2/3 komplexu u rostlin.....	28
5	Materiál a metodika.....	32
5.1	Materiál, media a kultivační podmínky.....	32
5.1.1	Rostliny.....	32
5.1.2	Bakterie.....	32
5.1.3	Příprava kompetentních bakterií.....	33
5.1.4	Media.....	33
5.2	Klonování.....	34
5.2.1	Izolace mRNA a reverzní transkripce.....	34
5.2.2	Používané primery.....	35
5.2.3	PCR.....	35
5.2.4	Elektroforéza a izolace produktu z gelu.....	37
5.2.5	Ligace produktu do vektoru pDrive.....	37
5.2.6	Transformace plasmidu do bakterií metodou heat-shock.....	37
5.2.7	Modrobílá selekce, testovací PCR, kontrolní restrikce a sekvenace.....	38
5.2.8	Překlonování vektoru z pDrive do pGreen.....	39
5.2.9	Transformace plasmidu do bakterií metodou elektroporace.....	39
5.2.10	Tranformace rostlin <i>Arabidopsis</i> metodou floral dip.....	39

5.3	Mikroskopie	40
5.3.1	Imunofluorescenční vizualizace	40
5.3.2	Další vizualizace a ošetření.....	42
5.4	Proteiny.....	42
5.4.1	Izolace proteinů	42
5.4.2	TCA precipitace	43
5.4.3	Acetonová precipitace	43
5.4.4	Proteinová SDS-PAGE elektroforéza	43
5.4.5	ECL.....	44
5.5	Rescue experimenty.....	44
5.6	qRT-PCR.....	45
6	Výsledky	47
6.1	Klonování	47
6.2	Mikroskopie	49
6.2.1	<i>In vivo</i> pozorování GFP-NtARPC2 rostlin.....	49
6.2.2	<i>In vivo</i> pozorování GFP-NtARPC2 rostlin – TIRF mikroskopie	51
6.2.3	Imunofluorescence – optimalizace protokolu	57
6.2.4	Imunofluorescence - kolokalizace.....	60
6.2.5	Další kolokalizace	64
6.3	Proteiny.....	65
6.3.1	První extrakce proteinů.....	66
6.3.2	Druhá extrakce proteinů	67
6.3.3	Třetí extrakce proteinů	67
6.3.4	Detekce GFP	68
6.4	Rescue experimenty.....	69
6.4.1	Trichomy	69
6.4.2	Listová epidermis	70
6.5	qRT-PCR.....	71
7	Diskuse	74
7.1	Užití tabákového proteinu v rostlině <i>Arabidopsis thaliana</i>	74
7.2	qRT-PCR.....	74
7.3	Mikroskopické výsledky	75
7.3.1	Jsou pozorované tečky klastry nefunkčního proteinu z důvodu overexprese?..	75

7.3.2	Jsou pozorované tečky klastry nefunkčního proteinu z důvodu přítomnosti GFP?	76
7.3.3	Není fúzní protein štěpen?.....	77
7.3.4	Jsou pozorované tečky membránovou organelou?	77
7.3.5	Jaká je lokalizace teček?.....	79
8	Závěr.....	81
9	Seznam citované literatury	82

Přehled použitých zkratk

Abi2 - Abi-interactor2	GTP – guanosintrifosfát
ABP – actin binding protein	HSPC300 - hematopoietic stem progenitor clone 300
ADF-H – ADF/cofilin homology	IPTG – isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
ADP – adenosindifosfát	kbp – tisíce párů bází
ARP – actin-related protein	kDa - kilodalton
ASB – actin-stabilizing buffer	LB – lysogeny broth
ATP – adenosintrifosfát	MS – Murashige-Skoog
BRICK – kukuřičný homolog proteinu	NAP125- Nck-associated protein 125
bp – páry bází	NPF – nucleation-promoting factors
HSPC300 – Hematopoietic stem progenitor clone 300	OD – optická densita
BY-2 – označení buněčné suspenze tabáku	qRT-PCR – kvantitativní real-time PCR
cAMP – cyklický adenosinmonofosfát	PBS – phosphate buffered saline
DMSO – dimethylsulfoxid	PCR – polymerase chain reaction
DNA – deoxyribonucleotide acid	PFA – paraformaldehyd
EGTA – ethyleneglycol-bis (beta-aminoethylether)- N,N'-tetraacetic acid	PIPES – piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic) acid
FH2 – formin homology 2	PIR121 - p53-121F-induced
GEF – guanine-exchange factor	RHD6 – root hair defective 6
GDI – GDP dissociation inhibitor	RNA – ribonucleotide acid
GDP – guanosindifosfát	RPM – otáčky za minutu
GFP – green fluorescent protein	

ROP – Rho of plants

ROS – reactive oxygen species (kyslíkové radikály)

RIC – Rac interactive CRIB domain

SCN1 – Supercentipede1

SDS – sodium dodecylsulfát

SDS-PAGE – SDS-polyacrylamide gel

SOB – super optimal broth

SOC – SOB catabolite repression

SRA1 – specifically rac1-associated

TIRF – total internal reflection
fluorescence

UV – ultraviolet

VCA - verproline homology connecting
acidic domain

VPH – verprolin homology

WASP – Wiscott-Aldrich syndrome
protein

WAVE/SCAR - Wiscott-Aldrich syndrome
protein family verprolin-homologous
protein/suppressor of cAMP receptor of
Dictyostelium

YEB – yeast extract broth

YFP – yellow fluorescent protein

1 Abstrakt

Aktinový cytoskelet je všudypřítomný a plní mnohé nezastupitelné role. Na nukleaci aktinu se u rostlin vedle forminů podílí také ARP2/3 komplex (actin-related protein), složený ze sedmi podjednotek (ARP2, ARP3, ARPC1-C5) a aktivovaný proteinovým komplexem SCAR/WAVE. ARP2/3 komplex je vázán na membránu, vedle nukleace též větví existující mikrofilamenta a mutanti v ARP2/3 komplexu u většiny organismů vykazují vážné poruchy. Rostlinní mutanti mají však mírné fenotypy, např. mutant *Arabidopsis thaliana* postrádající ARPC2 (*dis2-1*) má deformované trichomy a buňky listové epidermis, jeho viabilita však není zasažena. Cílem této práce bylo zmapovat lokalizaci proteinu ARPC2 v rostlinné buňce a detailněji prozkoumat roli ARP2/3 komplexu v morfogenezi rostlinné buňky. Tabáková podjednotka ARPC2 (NtARPC2) byla vizualizována pomocí fúzního proteinu i imunofluorescenčně pomocí protilátek v rostlinách *Arabidopsis* a byly provedeny experimenty s cílem kolokalizovat ji s aktinovým i mikrotubulárním cytoskeletem, s mitochondriemi a membránovými organelami. Vizualizace byly provedeny na konfokálním i TIRF mikroskopu. Bylo zjištěno, že protein GFP-NtARPC2 má v rostlině podobu motilních teček, jejichž pohyb, nikoli však existence, je závislá na aktinovém cytoskeletu. Pohyb těchto teček nápadně připomíná *stop-and-go* pohyb Golgiho aparátu. Kolokalizace teček s konkrétními buněčnými strukturami nebyla přesvědčivě prokázána. Na základě biochemických analýz bylo zjištěno, že fúzní GFP-NtARPC2 protein se v cytoplasmě transformovaných buněk zřejmě částečně rozpadá. Dále bylo zjištěno, že tabákový protein ARPC2 je schopen komplementovat mutantní fenotyp u *dis2-1* rostlin, a to jak ve verzi fúzované s GFP, tak samostatně.

Klíčová slova:

ARP2/3 komplex, aktin, cytoskelet, NPF, SCAR/WAVE, ARPC2

2 Abstract

Actin cytoskeleton is an ubiquitous structure which plays numerous irreplaceable roles. Actin nucleation is, beside formins, performed by ARP2/3 complex (actin-related protein), comprising of seven subunits (ARP2, 3, C1-C5) and activated by protein SCAR/WAVE complex. ARP2/3 complex is attached to the membrane and branches existing microfilaments, apart from nucleating them *de novo*. ARP2/3 mutants in most organisms show severe defects. However, plant mutants exhibit only mild phenotype, for example, *Arabidopsis thaliana* ARPC2 mutant (*dis2-1*) has deformed trichomes and leaf epidermal cells, but its viability is not impaired. The aim of the thesis is to map ARPC2 localization within the cell and broaden our understanding of ARP2/3 complex role in plant cell morphogenesis. Tobacco ARPC2 (NtArpC2) subunit was visualized in *Arabidopsis* plants, using the GFP fusion protein as well as immunofluorescence and anti-ARPC2 antibody. Experiments were undertaken to colocalize the subunit with actin and microtubular cytoskeleton, with mitochondrions, endosomes and other membrane organelles. The specimens were observed in confocal and TIRF microscope. The GFP-NtARPC2 protein shows as motile dots; their movement, but not their existence, is dependent upon actin cytoskeleton. The movement of the dots is similar to the *stop-and-go* movement of Golgi apparatus. Colocalization of the dots with the concrete cell structures was not convincing. According to the biochemical experiments, the GFP-NtARPC2 protein seems to be partly cleaved in cytoplasm of transformed cells. Both GFP-NtARPC2 and NtARPC2 proteins are able to complement the mutant phenotype of *dis2-1* plants.

Keywords:

ARP2/3 complex, actin, cytoskeleton, NPF, SCAR/WAVE, ARPC2

3 Úvod

Aktinový cytoskelet, nezbytná podmínka životaschopnosti buňky, je utvářen a modelován polymerací, depolymerací, sekáním a větvením mikrofilament, polymerů proteinu aktinu. Tuto regulaci podoby a lokalizace mikrofilament vykonává velké množství proteinů vázajících aktin. Jedním z nich je ARP2/3 komplex, membránově vázaný (Kotchoni et al., 2009) komplex sedmi podjednotek, jehož úkolem je nukleace (tj. iniciace polymerace) mikrofilament a jejich větvení, při němž díky ARP2/3 komplexu vyrůstá na boku mateřského filamenta nové filamentum, v úhlu cca 72° (Mathur et al., 2003). U živočichů je ARP2/3 komplex spjat s tvorbou lamelipodií a amébovitým pohybem buněk (Small et al., 2002), u nepohyblivých rostlinných buněk tkví význam ARP2/3 komplexu zejména v regulaci morfogeneze (Mathur et al., 2003).

Původním cílem práce bylo vizualizovat v *Arabidopsis thaliana* podjednotky ARP2/3 komplexu pomocí fúzních proteinů s GFP, vložených v indukovatelných vektorech. Takto vizualizované podjednotky měly být charakterizovány *in vivo* i kolokalizovány s aktinovým a mikrotubulárním cytoskeletem metodou imunofluorescenční vizualizace. Předlohou pro práci byl článek Fišerová et al. (2006), který podobným experimentálním přístupem odhalil, že podjednotky ARP2 a ARP3 mají podobu difusních teček, kolokalizujících s místy rapidní polymerace a větvení aktinu. Poskytl tím přímý mikroskopický důkaz funkce ARP2/3 komplexu v rostlinných buňkách a později na něj navázalo několik dalších podobných prací (Maisch et al. 2009; Delgado-Alvarez et al., 2010; Zhang et al., 2013). Výsledky však byly získány na izolovaných BY-2 buňkách a s použitím nikoli fúzních proteinů, nýbrž kvasinkové protilátky. Cílem mé práce bylo ověřit a rozšířit poznatky o funkci ARP2/3 komplexu v rostlinné buňce:

- za použití nikoli heterologních protilátek, nýbrž fúzních proteinů, odvozených z vlastních rostlinných podjednotek;
- nikoli v izolovaných buňkách, ale v kontextu celého rostlinného organismu *Arabidopsis thaliana*;
- nikoli pouze na dvou, ale na všech sedmi podjednotkách.

Jak říká Szymanski et al. (2009): „*Plant ARP2/3 is an abundant membrane-associated complex, and a large fraction of the ARP2/3 pool may exist in an inactive state. Therefore, it will be crucial to develop sets of live cell probes and functional assays that define active pools of ARP2/3 and provide insight into how ARP2/3-generated actin filaments contribute to coordinated cell expansion*“.

V průběhu práce se však ukázalo, že vytvoření fúzních proteinů nebude z technických důvodů možné, po přibližně roce experimentování bylo tedy rozhodnuto pracovat v *Arabidopsis thaliana* s již hotovým tabákovým fúzním proteinem GFP-NtARPC2. Odpovídajícím způsobem byly přeformulovány cíle práce:

- 1) Transformovat do rostlin *Arabidopsis thaliana* konstrukt *GFP-NtARPC2* a mikroskopicky ho charakterizovat;**
- 2) kolocalizovat protein *GFP-NtARPC2* s buněčnými strukturami;**
- 3) biochemicky charakterizovat rostliny exprimující *GFP-NtARPC2*;**
- 4) komplementovat konstruktem *GFP-NtARPC2* mutantní *dis2-1* rostlinu.**

Beze zbytku byly splněny cíle 1), 3) a 4); cíl 2) byl adresován množstvím přístupů, které však přinesly z valné většiny negativní výsledky. Přínos práce pak spočívá v mikroskopické charakterizaci rostlin exprimujících protein *GFP-NtARPC2* a zejména ve zjištění, že tabákový protein *NtARPC2* dokáže komplementovat mutantní fenotyp *dis2-1*, a to jak ve verzi s *GFP*, tak bez *GFP*.

4 Přehled literatury

4.1 Role aktinu v buňce

Aktin je všudypřítomný protein, jehož přítomnost je pro buňku nepostradatelná. Aktin, jak napovídá jeho jméno, souvisí zejména s pohybem. Role aktinu v buňce byly široce zkoumány a popsány v mnoha přehledných pracích. Aktin obecně podmiňuje pohyb, ať už podílem na tvorbě lamelipodií živočišných buněk (Small et al., 2002), poháněním bakterií *Listeria* a *Shigella* v živých buňkách raketovým pohybem (Loisel, 1999) nebo ovlivňováním tvaru a směru růstu rostlinných buněk (Smith and Oppenheimer, 2005). Mechanismus, jímž aktinový cytoskelet vykonává své funkce, je v zásadě dvojitý – buď funguje jako koleje, po nichž se do místa pohybu (či růstu) přivádějí váčky s potřebnými komponentami, nebo díky své polymeraci působí pohyb čirou silou tlaku na plasmatickou membránu (Cvrckova et al., 2004).

Příkladem, jenž kombinuje oba výše popsané mechanismy, je směrovaný růst rostlinné buňky. Rostlinné buňky jsou na rozdíl od živočišných uzavřeny v pevné buněčné stěně, a proto se jejich přizpůsobení vnějšímu prostředí děje pomocí směrovaného apikálního růstu, kdy určitá část buňky roste směrem od určitého stimulu, případně k němu. Během apikálního růstu tvoří aktin ve špičce oblast s hustou jemnou sítí vláken, zatímco v podélné ose prodlužující se buňky vedou tlustší svazky aktinových vláken, jejich úkolem je dopravovat do špičky váčky odvozené z Golgiho aparátu. Tyto váčky jsou pak fúzovány s cytoplasmatickou membránou ve špičce rostoucí buňky za asistence jemné aktinové sítě (Smith and Oppenheimer, 2005). Popsané schéma však není unikátní pro apikální růst, nýbrž uplatňuje se i při difusním růstu (Smith and Oppenheimer, 2005). Výše popsané schéma ovlivňuje takové rostlinné procesy jako determinace tvaru epidermálních buněk listu, trichomů, pylových láček a kořenových vlásků, na těchto modelech byla také role aktinu v transportu váček, růstu buněk, určování jejich tvaru a polarity zkoumána. Aktinovému cytoskeletu v rostlinné buňce jsou připisovány mnohé další funkce, dokumentované v mnoha přehledných článcích. Jmenujme zde například řízení roviny buněčného dělení, reakce na útok patogenu, regulace průsvitu plasmodesmat, mezibuněčná komunikace, proudění cytoplazmy, regulace turgoru svěřacích buněk průduchů atd. (McCurdy et al., 2001).

Aktin se vyskytuje ve dvou formách – monomerní G-aktin a ve vláčkách vázaný F-aktin. Monomery mají tvar kapsy, v níž je umístěno vazebné místo pro ATP. Po navázání ATP je G-aktin připraven na polymeraci do protofilamenta (dvě protofilamenta se pak stáčí

do pravotočivého filamenta), po připojení dochází po chvíli k hydrolyze ATP na ADP a fosfát. Aktin s připojeným ADP je k ostatním aktinům ve vláknech vázán slaběji než aktin s připojeným ATP, a proto po čase dojde opět k jeho disociaci. Uvolněný aktinový monomer s navázaným ADP pak toto ADP vyměňuje (samostatně, nebo asistovaně pomocí GEF, což proces urychluje) za nové ATP a opět se může zapojit do vlákna. Každé vlákno má dva odlišné konce, plus konec a minus konec. Monomery jsou orientovány head-to tail, ATP vazebná kapsa míří k minus konci. K přidávání podjednotek dochází na obou koncích, na plus konci ovšem rychleji (Alberts et al., 2002). Ve většině buněk existuje více isotypů aktinu. V *Arabidopsis thaliana* nacházíme tři vegetativní a pět reproduktivních isotypů, které se liší svými sekvencemi i mírou exprese a nejsou vzájemně zcela zaměnitelné (Šlajcherová et al., 2012). Spolu s ABP zajišťují jemnou regulaci dynamiky aktinového cytoskeletu. Obšírněji bylo o aktinu pojednáno v mnoha přehledných člancích, velmi ilustrativní je např. Pollard and Borisy (2003).

4.2 Polymerace aktinu, jeho dynamika a nukleace

Cytoskelet je dynamická struktura. Dobře známá je dynamická nestabilita mikrotubulů, kdy mikrotubuly na svém plus konci buď rostou, stagnují nebo ubývají, přičemž mezi těmito dvěma stavy dochází k přepínání známému jako *catastrophe/rescue*. Dynamická nestabilita mikrotubulů byla široce studována, ovšem mikrotubuly nejsou předmětem této práce. Aktinový cytoskelet je také dynamická struktura, charakter její dynamiky se ovšem od mikrotubulů liší. Kortikální aktinový cytoskelet v epidermálních buňkách hypokotylu *Arabidopsis thaliana* obsahuje síť náhodně orientovaných vláken, jejichž životnost malá (<30s), přestože rychle rostou (1,7 $\mu\text{m/s}$ – desetkrát rychleji než kortikální mikrotubuly), a to kvůli častému sekání vláken (0,011 rozpadů/ $\mu\text{m/s}$). Některá vlákna vykazovala také depolymeraci (0,3 μm), která ale probíhala mnohem pomaleji než růst a autoři studie nikdy nepozorovali kompletní rozpad vlákna depolymerací, obvykle byla vlákna spíše rozsekaná na malé kousky (Staiger et al., 2009). Nová aktinová vlákna tedy mohou vznikat nejen polymerací a depolymerací, jako u mikrotubulů, ale zdá se, že jejich dynamika je založena spíše na sekání již existujících filament a prodlužování nově vzniklých konců, zaznamenáno bylo i spojování fragmentů vláken do delších filament. (Smertenko et al., 2010).

Jen 4,4 % v buňce nově vzniklých plus konců byla využita k opětovnému růstu, a pokud, pak nikoli okamžitě (Staiger et al., 2009). Zdá se, že celá stochastická dynamika aktinového cytoskeletu je pečlivě regulována pomocí ABP. Spontánní vznik nového

vlákna čistě z volných monomerů je totiž termodynamicky nepravděpodobný, protože vyžaduje vytvoření vysoce nestabilních aktinových trimerů (Deeks and Hussey, 2005).

Existuje nepřeberné množství ABP s nejrůznějšími funkcemi, z nichž většina nějak ovlivňuje dynamiku aktinových filament.

Několik ABP je schopno nukleace *de novo*, jde o forminy a ARP2/3 komplex. Forminy dokážou tvořit nová vlákna z volných monomerů, zatímco ARP2/3 komplex odvětjuje nová vlákna z existujících filament (Cvrckova et al., 2004). U živočichů pak byly popsány i další nukleátory (Chesarone and Goode, 2009). Tato práce se zabývá ARP2/3 komplexem, proto je zde forminům věnován pouze malý prostor.

Forminy jsou skupina proteinů, sdílející doménu FH2. V *Arabidopsis thaliana* bylo nalezeno přinejmenším 21 isotypů, rozdělených do dvou tříd (I a II). Další domény, vyskytující se v některých forminech, zprostředkovávají např. interakci mikrofilament a mikrotubulů, vazbu na membránu, profilin či schopnost svazkovat mikrofilamenta nebo mikrotubuly (Wang et al., 2012). Forminy tvoří dimery, čtvercovité ploché struktury, ve dvou protilehlých rozích spojené flexibilními linkery, které dimeru umožňují „kráčet jako po schodech“ (Xu et al., 2004). Po nukleaci nového vlákna totiž zůstávají procesivní forminy navázány na plus konci rostoucího filamenta, moderují rychlost elongace a brání čepičkujícím proteinům v terminaci elongace (Firat-Karalar and Welch, 2011). Neprocesivní forminy se po nukleaci přesouvají na bok rostoucího filamenta, kde dokáží katalyzovat vznik dalšího, odvětujícího se vlákna (Wang et al., 2012).

4.3 ARP2/3 komplex v živočiších

Druhým, a v rostlinách dosud posledním, hráčem, který katalyzuje v rostlinných buňkách nukleaci aktinu, je ARP2/3 komplex. ARP2/3 komplex je proteinový komplex, který byl objeven před téměř dvaceti leti v solubilním extraktu z organismu *Acanthamoeba castellanii*, rozděleném pomocí agarosové afinitní chromatografie (Machesky et al. 1994). Skládá se ze sedmi podjednotek, dvou proteinů podobných aktinu (actin-related protein - ARP2, ARP3) a pěti dalších podjednotek. Molekulová hmotnost ARP2 a ARP3 je 47 kDa, respektive 44 kDa (Machesky et al., 1994), molekulová hmotnost ostatních podjednotek je vyjádřena jejich obratlovými jmény, viz **obr.1**. ARP2/3 komplex je konvenčně značován u živočichů zkratkou Arp2/3, u rostlin pak ARP2/3. Z důvodu terminologické jednoty bude v tomto textu používáno vždy označení ARP2/3 komplex.

ARP2/3 komplex byl kromě *Acanthamoeba* objeven v mnoha dalších organismech. Je zásadní pro tvorbu předozadní osy v embryu háďátka *Caenorhabditis elegans*, pro růst savčích buněk, pro vývoj embrya *Drosophila*, je esenciální pro kvasinku *Saccharomyces cerevisiae* i pro myš, podmiňuje raketový pohyb bakterií *Listeria* a *Shigella* (Vartiainen and Machesky, 2004).

Arp2/3 complex subunit nomenclature.		
HUGO name	Common vertebrate name	Yeast name
Arp3	Arp3	Arp3
Arp2	Arp2	Arp2
ARPC1	p40	Arc40, Sop2
ARPC2	p34	Arc35
ARPC3	p21	Arc18
ARPC4	p20	Arc19
ARPC5	p16	Arc15

Obr.1 Tabulka přiřazující k sobě různá jména pro jednotlivé podjednotky Arp2/3 komplexu. V prvním sloupci najdeme názvy běžně používané u rostlin, v druhém jejich synonyma vyjadřující jejich molekulovou hmotnost v kDa, tento způsob označení podjednotek Arp2/3 komplexu se používá u obratlovců. Ve třetím sloupci jsou k vidění jména kvasinkových homologů. Převzato z Pollard and Beltzner, 2002.

Kvasinka
Saccharomyces cerevisiae bez funkčního ARP2/3 komplexu nedokáže řádně endocytovat a umírá, nebo je alespoň vážně narušen její růst (Deeks and Hussey, 2005). Neschopnost mutantů endocytovat souvisí s buněčnou lokalizací ARP2/3

komplexu v kvasinkách. V kvasinkách byl ARP2/3 detekován v kortikální vrstvě v ostrůvkách aktinu, „*actin patches*“. Tyto ostrůvky se účastní endocytózy a jsou vysoce pohyblivé, za jejich pohyb zodpovídá právě aktinový cytoskelet a ARP2/3 komplex (Moseley and Goode, 2006).

V živočišných buňkách zodpovídá ARP2/3 komplex také za pohyb. Díky ARP2/3 komplexu jsou buňky schopny generovat lamelipodia a filopodia, která umožňují migraci buněk, která se uplatňuje např. během hojení poškozeného centrálního nervového systému (Vincent et al., 2012), při pohybu buněk imunitního systému (Nicholson-Dykstra, 2008), ale také při šíření nádorových buněk (Kelley et al., 2010). Lamelipodia umožňují pohyb také jednobuněčným organismům, připomínajícím améby, jako je *Dyctiostelium discoideum* (Heinrich et al., 2008) nebo zmiňovaná *Acanthamoeba castellanii*.

4.4 ARP2/3 komplex v rostlinách

Rostlinné buňky jsou až na výjimky nepohyblivé a své adaptace na vnější prostředí a vůbec svoji potřebu měnit nějak svou polohu v prostoru realizují pomocí směřovaného růstu, pomocí morfogeneze - změny tvaru svého těla. A je to právě morfogeneze, na níž se podílí ARP2/3 komplex v rostlinách. Jak uvidíme dále, u rostlin má ARP2/3 komplex jedinečnou úlohu v apikálním i v difusním růstu, v morfogenezi trichomů, kořenových vlásků i buněk epidermis. Studie subbuněčných struktur inzerčních mutant v jednotlivých podjednotkách ARP2/3 komplexu naznačují, že výše zmíněné procesy pak souvisejí s endomembránovým systémem a s aktinovým cytoskeletem (Deeks and Hussey, 2005).

Arabidopsis thaliana má celkem devět genů pro podjednotky ARP2/3 komplexu, neboť ARPC1 a ARPC2 jsou kódovány dvěma geny, např. *ARPC1a* a *ARPC1b* (www.ncbi.nlm.nih.gov). ARP2/3 komplex byl v *Arabidopsis thaliana* potvrzen na přelomu tisíciletí – bylo zjištěno, že některé mutantní podjednotky ARP2/3 komplexu jsou zodpovědné za fenotypové projevy třídy *distorted* (Mathur et al., 2003; Le et al., 2003).

Tyto mutanty mají poměrně mírný fenotyp, zdá se tedy, že u rostlin, na rozdíl od živočichů a kvasinek, buď není komplex pro život rostliny esenciální, nebo nejsou esenciální jednotlivé podjednotky pro funkci ARP2/3 komplexu. Důvod tohoto rozdílu není znám.

Distorted je jméno třídy, do níž bylo zahrnuto osm genů, jejichž mutace vyvolávala defekty ve vývoji listových trichomů. Hülskamp et al. (1994) analyzovali defekty rostlinných trichomů v mutantních rostlinách, které dle projevů (žádné trichomy, abnormálně rozmístěné trichomy, abnormálně větvené trichomy atd.) rozdělili do šesti tříd; jednou z nich byla třída *distorted*. Rostliny třídy *distorted* se vyznačují deformovanými trichomy, trichomy jsou kratší a zkroucené, jejich tvar je pozměněný. Autoři studie předpokládali, že deformace vzniká až během extenze trichomu. Do třídy *distorted* bylo zařazeno osm genů: *ALIEN*, *CROOKED*, *DISTORTED1*, *DISTORTED2*, *GNARLED*, *KLUNKER*, *SPIRRIG* a *WURM* (Hülskamp et al., 1994).

V dalších letech bylo zjištěno, že rostliny třídy *distorted* se vyznačují také defektem v morfogenezi epidermálních buněk listu, jejichž cirkularita se zvyšuje (Li et al., 2003). Kořenové vlásky a pylové láčky mutovaných rostlin uvádějí někteří autoři jako fenotypově standartní (Li et al., 2003), jiní zaznamenali vlnité, krátké a pahýlovité kořenové vlásky (Mathur et al., 2003). Někdy mohou být rostliny menší, ačkoli celkový

habitus rostliny se od wt rostlin liší jen málo (Le et al., 2003; Li et al., 2003). Také organizace aktinu je v mutovaných rostlinách zasažena, a to v epidermálních buňkách i v trichomech (Li et al., 2003). Aberantní organizace aktinu v průduchových buňkách zřejmě způsobuje defekt ve fúzi vakuol, což má za následek zhoršenou schopnost otvírat průduchy. Ve svěřacích buňkách průduchu bylo zjištěno, že mutanty v podjednotkách ARP2 a ARP3 měly defektní distribuci F-aktinu, defektní fúzi vakuol (velké množství malých vakuolek přetrvávalo i tehdy, když wt měl vakuoly už dávno fúzované v jednu velkou) a pomaleji otevíraly průduchy (Li et al., 2013). Při experimentech s reakcí *distorted* rostlin na gravitaci a světlo bylo zjištěno, že přinejmenším *dis1* a *dis2* rostliny mají pozměněnou gravitotropickou a fototropickou reakci (Reboulet et al., 2010).

Za některými geny třídy *distorted* stojí mutantní podjednotky ARP2/3 komplexu či jeho regulátory. Podjednotky ARP2/3 komplexu jsou zodpovědné za čtyři z osmi genů třídy *distorted*, regulátory ARP2/3 komplexu za dva geny, protein související s fúzí membránových váčků za jeden gen. Konkrétně, homologem genu CROOKED je nejmenší podjednotka ARP2/3 komplexu, *ARPC5* (Mathur et al., 2003). Homologem genu DISTORTED1 je *ARP3*, homologem genu WURM je *ARP2* (Le et al., 2003). Homologem genu DISTORTED2 je pak *ARPC2* (El-Assall et al., 2004). Geny GNARLED a KLUNKER odpovídají regulátorům ARP2/3 komplexu (NAP125, respektive SRA1), o nichž bude řeč dále (Brembu et al., 2004; Saedler et al., 2004a). Gen SPIRRIG byl identifikován jako homolog proteinu WD40/BEACH, který se podílí na fúzi membránových váčků (Saedler et al., 2009). Poslední, osmý gen, ALIEN, ještě čeká na rozluštění své funkce. Pro přehled viz následující tabulka:

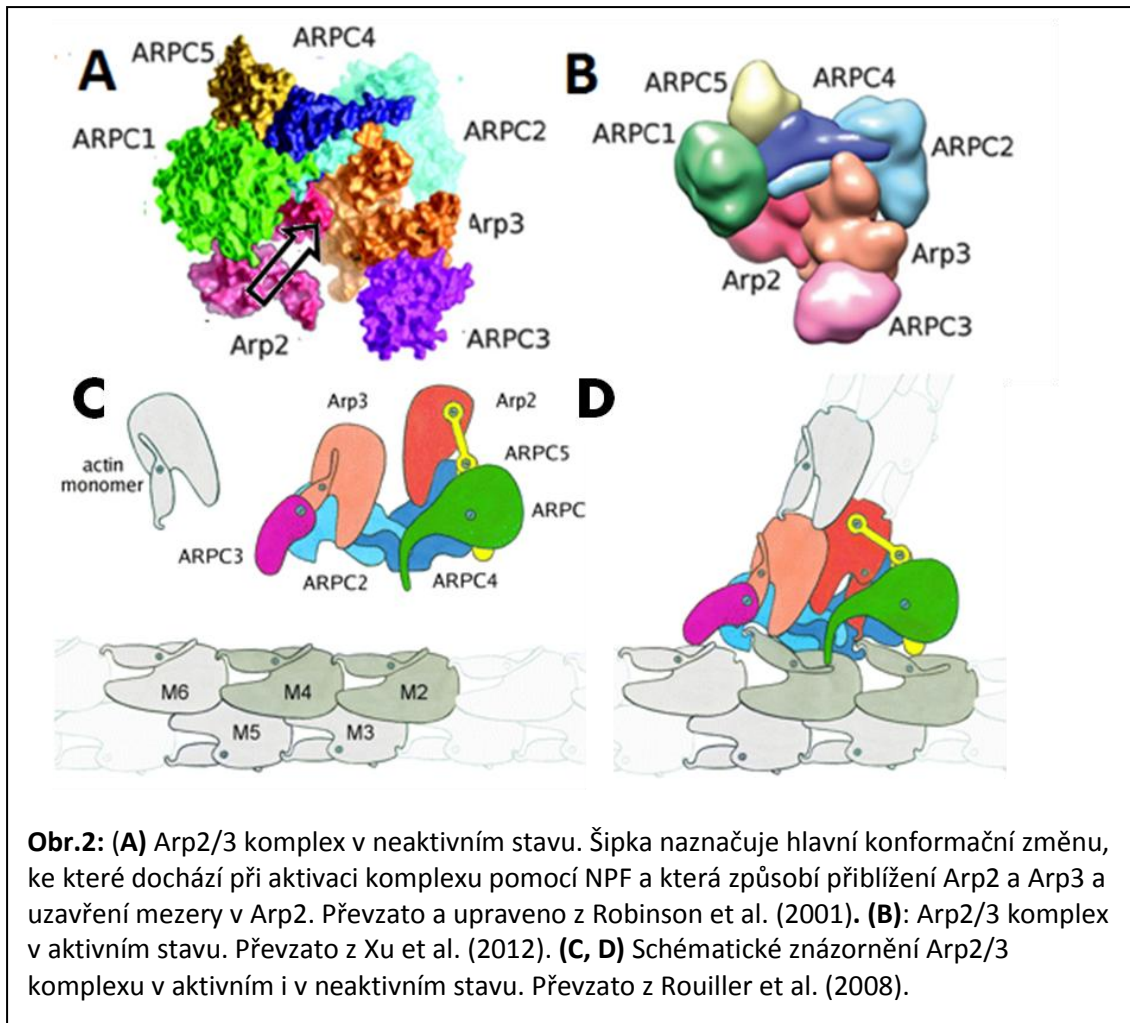
název genu	proteinový produkt	funkce genu	citace
DISTORTED1	ARP3	podjednotka ARP2/3	Le et al., 2003
DISTORTED2	ARPC2	podjednotka ARP2/3	El-Assall et al., 2004
WURM	ARP2	podjednotka ARP2/3	Le et al., 2003
CROOKED	ARPC5	podjednotka ARP2/3	Mathur et al., 2003
KLUNKER	SRA1	regulátor ARP2/3	Saedler et al., 2004a
GNARLED	NAP125	regulátor ARP2/3	Brembu et al., 2004
ALIEN	?	?	?

SPIRRIG	WD40/BEACH	membránové fúze	Saedler et al., 2009
---------	------------	-----------------	----------------------

V tabulce chybí mutanti v podjednotkách ARPC1, ARPC3 a ARPC4. První zmínka o mutantě v ARPC4 pochází z roku 2003 a autoři studie se na základě nepublikovaných dat zmiňují, že její fenotyp odpovídá mutantům ze třídy *distorted*, jde tedy zřejmě opět o defekt trichomů (Li et al., 2003). Tyto výsledky – kompletní *distorted* fenotyp u ARPC4 mutant – byly později potvrzeny a rozpracovány v detailu (Kotchoni et al., 2009). Mutanty v podjednotkách ARPC1 a ARPC3 nebyly v *Arabidopsis* dosud publikovány. Mutanta v ARPC1 je sice u kvasinek letální (Balcer et al., 2010), u rostlin je ovšem ARPC1 kódována dvěma geny, ležícími těsně za sebou. Dle www.arabidopsis.org leží první varianta *ARPC1a* na mapě AGI v pozici 13 153 214 – 13 157 107 bp (délka genu včetně intronů, samotná cds pro *ARPC1* je cca 1500 bp), druhá varianta *ARPC1b* leží na mapě AGI v pozici 13 346 122 – 13 349 980 bp, oba geny jsou na chromosomu 2 od sebe tedy vzdáleny cca 190 kbp, přičemž celý chromosom 2 má dle databáze www.ncbi.nih.gov délku cca 19 700 kbp. Velmi pravděpodobně se u těchto dvou genů jedná o tandemovou duplikaci; ostatně chromosom 2 je tandemových duplikací plný (Lin et al., 1999). Nejpravděpodobnějším důvodem neexistence publikované ARPC1 mutanty je tedy nejspíš ne její letalita, ale vzájemná redundance těchto dvou genů a z toho plynoucí neexistence specifického fenotypu mutanty.

Jednotlivé podjednotky se skládají do ARP2/3 komplexu. První představa o vzhledu ARP2/3 komplexu byla získána Robinsonem et al. (2001) z krystalů proteinu a byla publikována v Science. Práce odhalila, že ARP2 a ARP3 se jen málo liší od aktinu, který zřejmě mimikují. Z **obr. 2A** je patrné, že podjednotky ARPC1, ARPC2, ARPC4 a ARPC5 tvoří jakousi rovinu, na které sedí podjednotky ARP2 a ARP3. Podjednotka ARPC3 je pak připojena na ARP3. Podjednotky ARP2 a ARP3 se nedotýkají, na rozdíl od situace v aktinovém filamentu, kdy jsou v těsném kontaktu, a zřejmě proto je struktura neaktivní. Zřejmá je také velká prohlubeň v podjednotce ARP2 - na obrázku to vypadá, jako by byla rozdělená na dvě části (Robinson et al., 2001). Po navázání ATP na ARP3 dochází k malé konformační změně na ARP3, aniž by se ovšem uzavírala mezera mezi ARP2 a ARP3, nebo mezera v ARP2, a aniž by komplex získal schopnost hydrolyzy ATP a nukleace aktinového filamenta (Nolen et al., 2004). Až navázání NPF (nucleation-promoting factor, aktivátory ARP2/3 komplexu, o nichž bude řeč dále) způsobí konformační změnu celého komplexu. Během ní se dochází ke ztrátě kontaktu mezi ARPC1 (p40) a ARP2, ARPC5 napomůže svým N-koncem pohybu ARP2 a dojde

k přiblížení ARP2 a ARP3. Ty zaujmou podobu dimeru, který velmi připomíná aktinový dimer v aktinovém filamentu. Také se uzavře prohlubeň v podjednotce ARP2 (Xu et al., 2012). Elektronová tomografie pak potvrdila předchozí pozorování a umožnila zrekonstruovat celý komplex ve 3D (Rouiller et al., 2008).



4.5 Aktivace a regulace ARP2/3 komplexu

Pro aktivaci ARP2/3 komplexu jsou zapotřebí, jak vyplývá z minulé kapitoly, proteiny zvané NPF, které způsobí spolu s ATP navázaným na ARP3 konformační změnu, díky které je ARP2/3 komplex schopen nukleovat nové aktinové vlákno. Takovým NPF je např. **WASP** (**W**iscott-**A**ldrich **s**yndrome **p**rotein), který je znám výlučně z hematopoetických buněk a u rostlin se tudíž nevyskytuje, případně jeho isoforma, protein N-WASP, který byl původně izolován z mozku a u rostlin ho také nenajdeme (Millard et al., 2004). Dále byly v savcích objeveny ještě další dva příbuzné proteiny, které byly nazvány **WAVE** (**WASP** family **v**erprolin-homologous protein), protože protein by vytipován na základě toho, že obsahuje aktin vazebnou doménu VPH (Miki et al., 1998). VPH je doména, vyskytující se v kvasinkovém proteinu verprolin, který se podílí na tvorbě aktinomyosinového kroužku během pučení (Munn and Thanabalu, 2009), ale také v proteinech WASP a N-WASP (Miki et al., 1998).

WASP, N-WASP ani savčí WAVE proteiny u rostlin nenajdeme. Při genetickém screenu v *Dictyostelium* byl však objeven příbuzný protein, který byl pojmenován **SCAR**

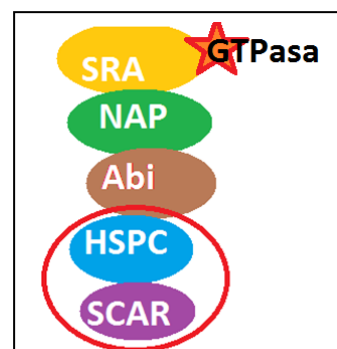
(suppressor of cAMP receptor), protože vyřazení jeho genu odstranilo abnormality způsobené ztrátou receptoru pro cAMP (Bear et al., 1998). Tento protein je isotypem savčích WAVE a také se u savců vyskytuje jako třetí isotyp WAVE. Obě jména, SCAR i WAVE, jsou tak zaměnitelná, a v této práci budeme vzhledem k jejímu rostlinnému zaměření používat pro rostlinné WAVE termín SCAR. Existuje tedy celkem pět NPFz rodiny WASP: WASP, N-WASP, SCAR/WAVE1, SCAR/WAVE2 a SCAR/WAVE3. Všechny se vyskytují například v savcích, kde také mají různě specializované funkce, vždy však spojené s aktivací ARP2/3 komplexu (Yamaguchi et al., 2002), pouze jeden isotyp (SCAR izolovaný z *Dictyostelia*) se však vyskytuje v rostlinách (Millard et al., 2004).

Všechny proteiny rodiny WASP obsahují aktin vazebnou VCA doménu, která se skládá z jedné nebo dvou (v případě N-WASPU) VPH (V), po kterých následuje cofilin homology doména (C) a kyselá (acidic – A) oblast (Yamaguchi et al., 2002). Doména homologní ke cofilinu, (cofilin homology domain), neboli též doména homologní k ADF (ADF homology domain, ADF-H) je stejně jako VPH aktin vazebnou doménou (Poukkula et al., 2011). Pro aktivaci ARP2/3 komplexu je třeba, aby se SCAR svou doménou VCA navázal na rozhraní podjednotek ARP2 a ARP3 na minus konci ARP2/3 komplexu (Xu et al., 2012).

Během této interakce je SCAR asociován s HSPC300 (Hematopoietic stem progenitor clone 300). HSPC neboli BRICK (označení homologu HSPC z kukuřice) je malý, 8kDa velký protein, jehož přesná funkce v aktivaci ARP2/3 komplexu zatím není známa, jeho mutanti ovšem vykazují fenotyp podobný genům třídy *distorted*. HSPC nepomáhá se sestavováním SCAR

komplexu, ani neumožňuje jeho funkci, neboť *in vitro* byla pozorována aktivace ARP2/3 komplexu pomocí SCAR bez HSPC. Spekuluje se o roli HSPC ve stabilizaci SCAR proteinu a jeho ochraně proti proteasomům (Le et al., 2006). Zřejmě též propojuje SCAR protein s inhibitory SRA, Abi a NAP, viz dále (Gautreau et al., 2004).

Za běžných okolností je ale komplex SCAR-HSPC je inhibován interakcí s SRA1 (Specifically rac1-associated), známým též jako PIR121 (p53-121F-induced), s



Obr.3 Představa o architektuře neaktivního SCAR/WAVE komplexu. Červený kruh vyznačuje dvě podjednotky, které po odštěpení od SCAR/WAVE komplexu aktivují Arp2/3 komplex. Hvězda ukazuje místo interakce SCAR/WAVE komplexu a Rac-GTPasy.

NAP125 (**N**ck-associated **p**rotein **125**) a s Abi2 (**A**bi-interactor**2**). Co se týče architektury komplexu, zdá se, že jádro je tvořeno proteiny Abi a NAP. Na NAP je navázán SRA, z druhé strany, na Abi, je navázán HSP a na něm protein SCAR. Komplex SCAR snad tvoří jakýsi sloupec, ilustrace viz **obr.3**. K odštěpení SCAR - HSPC dochází po aktivaci Rac-GTPasy, která se v aktivním stavu váže na SRA (Gautreau et al., 2004) a způsobí odštěpení dimeru SCAR-HSPC, který se pak může navázat na ARP2/3 a aktivovat ho (Jörgens et al., 2010).

GTPasy jsou rodinou proteinů s regulační funkcí. Vážou-li GTP, jsou aktivní, časem ovšem dochází k hydrolýze. GTPasa vázající GDP je neaktivní, dokud ho nepustí a nenaváže nové GTP. Tento krok opuštění GDP je pomalý a urychlují ho proteiny **GEF** (**G**TPase **e**xchange **f**actor). U živočichů nacházíme velké množství GTPás rozdělených do mnoha tříd. Jednou z nich jsou Rho GTPasy, mezi něž patří Rho, Rac a Cdc42 GTPasy. U rostlin se vyskytuje pouze jedna třída GTPás, nazývaná **ROP** (**R**ho **o**f **p**lants) nebo Rac. Její aktivita je modulována proteiny **RIC** (**R**OP **i**nteractive **C**RIB motif-containing effector) (Craddock et al., 2012).

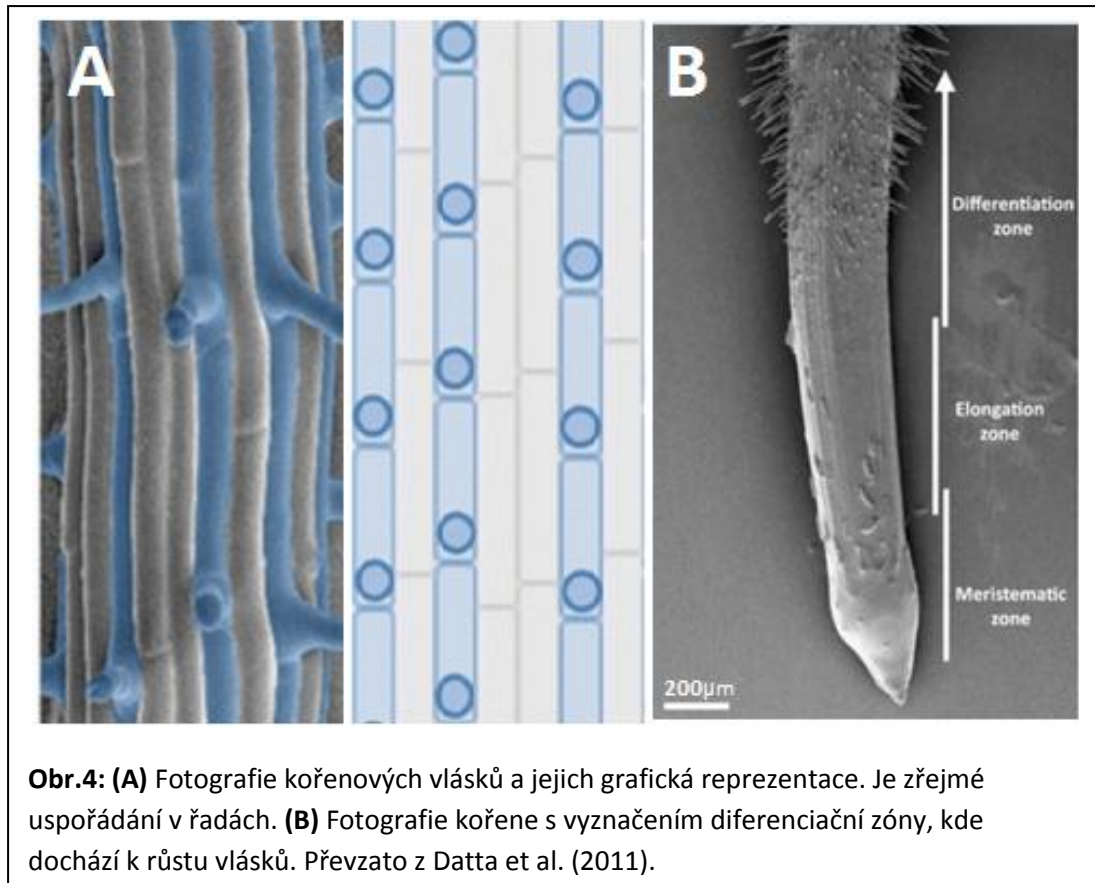
Oblast aktivace ARP2/3 komplexu je složitá zejména množstvím zkratk a proteinů, zde je proto přiloženo shrnutí zkratk a jejich významů:

zkratka	význam
NPF	faktory, které aktivují ARP2/3 komplex, např. proteiny WASP, N-WASP, SCAR/WAVE. Obsahují VCA doménu pro interakci s ARP2/3 komplexem
WASP	jeden z NPF, v rostlinách se nevyskytuje
N-WASP	další z NPF, v rostlinách se nevyskytuje
WAVE	další z NPF, jeden z jeho tří isotypů se vyskytuje u rostlin
SCAR	jiný název pro WAVE, používaný spíše u rostlin
VPH	aktin vazebná doména, která je spolu s doménou ADF-H součástí domény VCA
ADF-H	aktin vazebná doména, která je spolu s doménou VPH součástí domény VCA
VCA	doména, kterou NPF interaguje s ARP2/3

	komplexem
HSPC300	též BRICK1; protein, který zřejmě stabilizuje a chrání SCAR.
Rac-GTPasa	GTPasa, která interaguje se SRA a umožňuje tím odštěpení HSPC-SCAR ze SCAR komplexu; též ROP
SRA	součást SCAR komplexu, který inhibuje SCAR protein; váže se na něj Rac-GTPasa; též PIR
Abi	součást SCAR komplexu, který inhibuje SCAR protein
NAP	součást SCAR komplexu, který inhibuje SCAR protein
PIR	viz SRA
ROP	viz Rac-GTPasa
RIC	proteiny modulující aktivitu Rac-GTPas

4.6 Funkce ARP2/3 komplexu v *Arabidopsis thaliana*

Zatímco v živočišných buňkách se ARP2/3 komplex podílí obvykle na procesech spojených s pohybem, rostlinné buňky, obklopené pevnou buněčnou stěnou, nedokážou realizovat amébovitý pohyb, na němž se v živočišných buňkách ARP2/3 komplex podílí. Rostlinné buňky své adaptace na vnější prostředí realizují směrovaným růstem, změnou tvaru buněk. V rostlinách se ARP2/3 komplex podílí na apikálním i difusním růstu a s ním spojenou dopravou váčků a určováním polarity, na morfogenezi trichomů, kořenových vlásků i epidermálních buněk (Mathur, 2005).



Obr.4: (A) Fotografie kořenových vlásků a jejich grafická reprezentace. Je zřejmé uspořádání v řadách. (B) Fotografie kořene s vyznačením diferenciační zóny, kde dochází k růstu vlásků. Převzato z Datta et al. (2011).

Kořenové vlásky jsou trubicovité jednobuněčné apikálně rostoucí výběžky kořene. Kořenové vlásky vyrůstají z buněk epidermis kořene, poprvé se objevují v diferenciační zóně, která leží nad meristematickou a elongační zónou, viz **obr.4B**. Ne každá buňka epidermis kořene produkuje vlasek. U *Arabidopsis thaliana* se epidermální buňky dělí na trichoblasty, z nichž vlásky vyrůstají, a atrichoblasty (ty ostatní). Trichoblasty vznikají z buněk ležících na rozhraní dvou buněk kortexu, atrichoblasty z buněk, dotýkajících se pouze jedné buňky kortexu (Datta et al., 2011). Místo růstu vlásku bývá na spodním konci buňky, viz **obr. 4A**. Na výběru místa iniciace a na iniciaci samotné se podílí i aktinový cytoskelet, nezdá se ale, že by jeho úloha byla zásadní (Pei et al., 2012).

Naproti tomu, v elongujícím se kořenovém vlásku hraje cytoskelet zásadní úlohu. Ošetření rostoucího vlásku aktinovými drogami vede k zastavení růstu, v případě mikrotubulárních drog dochází ke ztrátě polarity. Soudí se, že mikrotubulární cytoskelet se spolupodílí na udržování vápníkového gradientu, který pomáhá udržovat ve vlásku polaritu (Datta et al., 2011), známá je též souvislost mezi kortikálními mikrotubuly a ukládáním celulósových mikrofibril buněčné stěny (Szymanski, 2009). Aktinový cytoskelet je pro elongaci ještě důležitější, tvoří ve většině vlásku dlouhé tlusté svazky, po nichž se do špičky dopravují váčky a také po nich jezdí organely. Ve špičce (*subapical region*) pak najdeme jemnou aktinovou síť (*meshwork*), jejímž účelem je

retence váčků a jejich směřování do míst exocytózy, v úplné špičce se pak nachází pouze monomerní G-aktin, protože filamenta by znemožňovala fúzi váčků. Po ukončení růstu vlásku tento G-aktin mizí a je nahrazen filamenty (Pei et al., 2012). Ve špičce se nachází velké množství váčků odvozených od Golgiho aparátu, samotný Golgiho aparát leží spolu s mitochondriemi a endoplasmatickým retikulem o něco níže, ještě níže najdeme vakuoly a jádro (Datta et al., 2011).

Trichomy jsou také jednobuněčné, tentokrát však větvené útvary, umístěné zejména na svrchní straně listů. Rostou difusním růstem a v porovnání s kořenovými vlásky vykazují některé odlišnosti, např. ošetření trichomů cytoskeletárními drogami vede k jiným výsledkům než v případě kořenových vlásků (Szymanski et al., 1999).

Trichomy vyrůstají mezi dlaždicovými buňkami listové epidermis. Dlaždicové buňky připomínají dílky puzzle. Na rozdíl od apikálně rostoucích kořenových vlásků, epidermální buňky rostou difusně, tlak zvětšující se vakuoly působí isotropický růst. Charakteristického tvaru je pak dosaženo místně specifickou extenzí buněčné stěny. Oslabená buněčná stěna v těchto místech snadněji podléhá tlaku vakuoly, tvoří se laloky, „lobes“. Při tvarování buňky se opět uplatňuje cytoskelet, na mladé buňce lze nalézt mikrofilamenta v budoucích lalocích a mikrotubuly v budoucích prohlubních mezi laloky (Szymanski, 2009). Materiál pro růst je do vznikajících laloků dopravován cílenou sekrecí komponent membrány a buněčné stěny, která je podobná cílené sekreci na špičce buněk v případě apikálního růstu. Epidermální buňky v sobě tak spojují prvky difusního i polarizovaného růstu (Guimil and Dunand, 2007).

4.7 Podjednotky ARP2/3 komplexu

Předchozí kapitoly obsahovaly víceméně ucelené příběhy, v nichž hlavní roli hrál ARP2/3 komplex jako celek. Protože je tato práce zaměřena na pouze jednu podjednotku ARP2/3 komplexu, protein ARPC2, je do literárního přehledu nutno zahrnout také kapitolu, která si klade za cíl prozkoumat, co je z literatury známo o rolích jednotlivých podjednotek ARP2/3 komplexu. Z metodologického hlediska se zaměříme na informace o lokalizaci jednotlivých podjednotek, naopak poněkud opomíjet budeme informace, získané analýzou mutantů – tyto údaje už byly zpracovány v předchozích kapitolách, a navíc ARP2/3 mutanti nejsou předmětem práce.

4.7.1 Lokalizace podjednotek ARP2/3 komplexu u živočichů a hub

Lokalizace jednotlivých podjednotek ARP2/3 komplexu byla široce studována u mnohých organismů. V živočišných buňkách je lokalizován na periférii lamelipodií

fibroblastů (Welch et al., 1997), v buněčném kortexu améb či v aktinových ostrůvcích (*actin patches*) kvasinek (Van Gestel et al., 2003). U neuronů byly pomocí protilátek lokalizovány podjednotky ARP3, ARPC2 a ARPC3 uprostřed růstového kužele (*growth cone*) (Strasser et al., 2004). ARP3 byl identifikován v invadopodiích buněk trabekulární sítě (*trabecular meshwork*) v lidském oku, kde byla též zaznamenána jeho kolokalizace s proteinem N-WASP. Protein se zde vyskytuje ve formě teček, soustředěných zejména v okolí jádra (Aga et al., 2008). Opakovaně udávaná lokalizace ARP2/3 komplexu na předním konci lamelipodií živočišných buněk (Welch et al., 1997; Huang et al., 2006; Zuo et al., 2006 a další) hraje roli v buněčné migraci, a je tak předmětem zájmu rakovinných výzkumů (např. Huang et al., 2006).

V houbě *Neurospora crassa* (jejíž apikálně rostoucí hyfy vykazují mnohé podobnosti s rostlinnými apikálně rostoucími buňkami) byl ARP2 a ARP3 pomocí GFP fúze lokalizován do subapikální oblasti rostoucích hyf (Delgado-Alvarez et al., 2010), nikoli do samotné špičky. To je v souladu s předpokládanou polohou jemné aktinové sítě (Pei et al., 2012), navíc u nerostoucích hyf se signál postupně přesunul až do špičky (Delgado-Alvarez et al., 2010), zřejmě tak, jak ve špičce došlo ke vzniku filament. Dále se ARP2 nachází v oblasti formujících se přepážek a pomocí TIRF mikroskopie bylo zjištěno, že se nacházejí v bezprostřední blízkosti plasmatické membrány (Delgado-Alvarez et al., 2010).

Lokalizace podjednotek ARP2/3 komplexu poblíž plasmatické membrány je v souladu se skupinou výsledků, která ukazuje na kolokalizaci podjednotek ARP2/3 komplexu s různými membránovými strukturami. V buňkách krysích ledvin bylo imunofluorescencí zjištěno, že ARP3 kolokalizuje s Exo70, což je komponenta exocystu, membránově vázaného komplexu podílejícího se na exocytose. ARP3 i Exo 70 se po indukci pomocí EGF (extracelulární signál zajišťující tvorbu lamelipodií) spolu přesouvají na přední konec lamelipodií a buňka získává schopnost pohybu. V mutantních buňkách bez Exo70 nebyla tato specifická lokalizace pozorována a buňky nezískaly schopnost pohybu, zdá se tedy, že exocyst je těsně provázán s funkcí ARP2/3 komplexu. V kvasinkových buňkách bylo biochemicky zjištěno, že ARPC1 interaguje s C-koncem Exo70. Tato interakce je také stimulována EGF (Zuo et al., 2006). ARPC2 byl nalezen i v buňkách psích ledvin v místech zvlnění membrány (*membrane ruffles*) a také v místech styku dvou buněk. Kolokalizuje s proteinem Tiam1 a jeho interakce s tímto proteinem, který funguje jako GEF pro Rac-GTPasu, byla potvrzena též dvouhybridním systémem (Ten Klooster et al., 2006).

Dále bylo zjištěno, že ARPC2 kolokalizuje za určitých podmínek s pozdními endosomy (Holtta-Vuori et al., 2005) a regulátory ARP2/3 komplexu kolokalizují s Golgiho aparátem. Konkrétně Rho GTPasa Cdc42 v aktivované formě rekrutuje na membránu Golgiho aparátu N-WASP, jeden ze živočišných proteinů, které aktivují ARP2/3 komplex (Stamnes, 2002).

V této souvislosti je zajímavým zjištěním je, že ARP2 byl v hyfách houby *Neurospora crassa* nacházen ve formě teček, které vykazovaly někdy pohyb, někdy byly statické. Po ošetření latrunkulinem se tečky nerozpadly, zastavil se však jejich pohyb a zmizela specifická lokalizace (Delgado-Alvarez et al., 2010). Tento pohyb podezřele připomíná *stop-and-go movement* Golgiho aparátu, kdy se u jednotlivých váčků *cis-golgiho* retikula střídají okamžiky cílevědomého pohybu o rychlosti až 4,2 μ m/s a okamžiky nečinnosti, během nichž se váčky jen šmrdoří (*wiggle*) na místě (Nebenfuhr et al., 1999).

4.7.2 Lokalizace jednotlivých podjednotek ARP2/3 komplexu u rostlin

U rostlin je problematika lokalizace ARP2/3 komplexu prostudována jen velmi nedostatečně. Prací není mnoho, jsou na různých experimentálních modelech a často se zaměřují na jednotlivé buňky, vytržené z kontextu rostliny. Publikované práce zkoumají buňky obvykle z biochemického hlediska, případně vizualizují jednotlivé podjednotky. Použité vizualizační metody jsou obvykle imunofluorescence za použití homologních i heterologních protilátek a dále fúze s fluorescenčními protieny, které umožňují sledovat buňky *in vivo* a zjišťovat tak dynamiku podjednotek ARP2/3 komplexu.

Kotchoni et al. (2009) biochemicky zjistili, že většina ARP2/3 komplexu je vázána na membránu, konkrétně byl tento výsledek potvrzen pro podjednotky ARPC4 a ARP3. Tato asociace nebyla narušena ani v přítomnosti latrunkulinu, naopak nebyla potvrzena v mutantních rostlinách, postrádajících funkční ARPC4 podjednotku. Pouze plně složený komplex se tedy váže na membránu, ale není třeba, aby byl aktivován. Vzhledem k možnosti disociovat komplex od membrány pomocí 2M NaCl či 5M močoviny se autoři domnívají, že jde o periferní ukotvení v membráně (Kotchoni et al., 2009).

Pomocí heterologních protilátek byla identifikována podjednotka ARP3 v listech tabáku a kořenech kukuřice, v mikrosomální i v solubilní frakci. Konfokální mikroskopii byly také identifikovány vláknité struktury v protoplastech membránových svleček (*membrane ghosts*) buněk listu tabáku, sami autoři však vyjadřují pochybnosti o

spolehlivosti tohoto výsledku. Ve vznikajícím kořenovém vlásku byl zaznamenán difusní i tečkovaný signál, a to zejména u špičky (Van Gestel et al., 2003).

V tabákových BY-2 buňkách byly heterologní protilátkou z kvasinky identifikovány podjednotky ARP2 a ARP3 jako tečky asociované s aktinovými filamenti, zejména pak v místech, kde se aktinová filamenta větvila. Oproti předcházejícímu výsledku, zde byla ARP3 podjednotka pomocí biochemických metod nalezena pouze v mikrosomální frakci, nikoli v solubilní, což ovšem odpovídá výsledkům získaným v práci Kotchoni et al. (2009), a ARP2 pouze v solubilní, nikoli v membránové frakci, což výsledkům z práce Kotchoni et al. (2009) neodpovídá a vyvstává tak otázka, zda jde o omyl nebo zda se lokalizace ARP2 liší od lokalizace ARP3 a ARPC4 (Fišerová et al., 2006). ARP3 byla v BY-2 pozorována také pomocí ARP3-RFP fúze. Byly zaznamenány tečky v oblasti okolí jádra a v kortexu, kolokalizující s aktinovými filamenti, která se v místech kolokalizace s ARP3 místy větvila. V případě depolymerace aktinu latrunkulinem či chladem vznikala nová vlákna po odstranění depolymeračního agens zejména v místech ARP3 teček (Maisch et al., 2009). Tento výsledek potvrzuje práci Fišerová et al. (2006), v níž byla podobná data získána pomocí heterologní protilátky. ARP3 tečky byly nejhustěji přítomné v koncových buňkách řetízku BY-2 buněk, a to zejména na koncích těchto koncových buněk. Tento signál byl přítomen od stadia dvoubuněčného řetízku a ukazuje na význam ARP2/3 komplexu pro polarizaci (Maisch et al., 2009)

V embryích chaluhy *Silvetia* byla opět pozorována nenáhodná lokalizace podjednotek ARP2 a ARP3, a to v polarizované zygotě okolo jádra a na pólu, z něhož vyrostě rhizoid, v případě klíčících zygot pak ve formě provazce táhnoucího se od jádra k subapexu rostoucího rhizoidu. Distribuce ARP2 v rostoucím rhizoidu pak připomínala podobnou studii subcelulární distribuce ARP2 a ARP3 v hyfách houby *Neurospora crassa* – v úplné špičce ARP2 přítomen nebyl, zato v subapexu se nacházel ve velkém množství (Hable and Kropf, 2005). I v mechu *Physcomitrella patens* se podjednotky ARP2/3 komplexu nacházejí na místech apikálního růstu. Podjednotka ARPC4 fúzovaná s YFP se zde objevuje ve špičkách rostoucích filament a rhizoidů (Perroud and Quatrano, 2006).

Z výše uvedených údajů je zřejmé, že lokalizace jednotlivých podjednotek ARP2/3 komplexu byla zkoumána, a to zejména v rostlinách, pouze v několika málo posledních letech. Žádná práce ovšem, pokud je nám známo, se nepokusila prozkoumat lokalizaci všech podjednotek ARP2/3 komplexu, autoři si vždy vyberou pouze jednu

něbo několik málo podjednotek, a získané výsledky pak vztahují k celému komplexu. I v případě, že si autoři různých prací vyberou různé podjednotky, rozdílnost použitých vizualizačních metod, experimentálních postupů a často i pokusných organismů pak takřka znemožňuje porovnávat jednotlivé práce mezi sebou.

Pokud bychom získali nástroj, který by nám umožnil pozorovat různé podjednotky ve stejném organismu stejným přístupem, mohli bychom porovnat lokalizaci jednotlivých podjednotek. Na základě údajů z literatury je zřejmé, že mutanty v jednotlivých podjednotkách mají odlišné fenotypové projevy a jednotlivé podjednotky mají svoje vlastní specifické funkce. Proto se domníváme, že není vyloučené, aby jednotlivé podjednotky byly schopny své specifické funkce vykonávat např. i tehdy, když nejsou vázány v komplexu. Mezi argumenty, které podporují tuto domněnku, patří zjištění, že:

- různé mutanty v podjednotkách ARP2/3 komplexu mají různé fenotypové projevy, kvantitativně i kvalitativně odlišné, např. mutanty v ARP3 a v ARPC2 mají zcela odlišný vliv na fototropismus a gravitropismus rostliny (Reboulet et al., 2010)
- podjednotka ARPC4 je schopna vazby na membránu, zatímco u jiných podjednotek toto potvrzeno nebylo (Kotchoni et al., 2009)
- ARP2 se nachází v solubilní frakci, ARP3 v mikrosomální frakci (Fišerová et al., 2006)
- kvasinkový ARPC1 interaguje s komponentou exocystu Exo70 (Zuo et al., 2006), kvasinkový ARPC2 interaguje s proteinem Tiam1, GEFem Rac-GTPasy (Ten Klooster et al., 2006)

Všechny tyto údaje ukazují, že by mohlo být přínosné studovat podjednotky ARP2/3 komplexu také jako individuální proteiny, nejen jako stejnocenné součásti ARP2/3 komplexu.

Expereze fúzních konstruktů podjednotek ARP2/3 komplexu a GFP a studium jejich lokalizace představuje účinný nástroj, jak výše uvedeného dosáhnout. Navíc stabilní exprese ve studované rostlině umožňuje lépe postihnout roli podjednotek ARP2/3 komplexu v kontextu celé rostliny, na rozdíl od transienční exprese. Také výběr experimentálního materiálu – rostliny *Arabidopsis thaliana*, nikoli pouze izolovaných

buněk buněčných kultur – dává naději na lepší vhled do role ARP2/3 komplexu v kontextu celého organismu.

5 Materiál a metodika

Následující kapitola podává přehled použitých materiálů a metod, rozdělený do čtyř oblastí – materiál, klonování, mikroskopie a proteinová analýza.

5.1 Materiál, media a kultivační podmínky

5.1.1 Rostliny

Byly použity rostliny *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., ekotyp Columbia (wt rostliny) a *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., ekotyp Landsberg erecta (*dis2-1* rostliny). Rostliny byly pěstovány jak nesterilně v jiffech (rašelinové válečky od společnosti Jiffy Products International), tak sterilně *in vitro* na minimálním MS mediu na hranatých Petriho miskách 12 cm x 12 cm uzavřených parafilmem. Tyto misky byly postaveny nastojato pod úhlem cca 5°. Rostliny byly kultivovány při fotoperiodě 16/8 a při 23°C.

Pro pěstování nesterilních rostlin byl používán arasystém za účelem snížení ztráty semen, snížení rizika kontaminace experimentů ostatních uživatelů kultivační místnosti, snížení rizika kontaminace životního prostředí geneticky modifikovanými semeny a zvýšení komfortu při zacházení s rostlinami.

Pro pěstování *in vitro* byla semena sterilizována opláchnutím 96 % ethanolem, inkubací v 50 % Savu (což odpovídá 2,5 % NaClO) po dobu 10 minut a poté 4-5x propláchnuta sterilní destilovanou vodou. Poté byla ve vodě alespoň 2 dny stratifikována při 4°C a poté vysévána na medium pomocí 200 µl pipety sterilně ve flowboxu.

Pro imunofluorescenci byly použity buňky BY-2 (*Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow 2; Nagata et al., 1992).

5.1.2 Bakterie

Byly použity bakterie *Escherichia coli*, kmen JM109, pěstované ve formě kolonií, nebo suspenze. Kolonie byly pěstovány na tuhém LB mediu při 37°C, na kulatých miskách položených vzhůru nohama a uzavřených parafilmem. Suspenze byly pěstovány v tekutém LB mediu (při transformacích v SOC mediu) při 37°C, na orbitální třepačce při 180 RPM, ve zkumavkách či Erlenmayerových baňkách, dle objemu suspenze.

Pro transformaci plasmidů do bakterií byly použity kompetentní bakterie.

Bakterie *Agrobacterium tumefaciens*, kmen C58C1 s pomocným plasmidem pGV2260 (Deblaere et al., 1985), byly pěstované ve formě kolonií, nebo suspenze. Kolonie byly pěstovány na tuhém LB mediu s rifampicinem při 28°C, na kulatých Petriho miskách položených vzhůru nohama a uzavřených parafilmem. Suspenze byly pěstovány v YEB mediu s rifampicinem při 28°C, na orbitální třepačce při 180 RPM v Erlenmayerových baňkách.

Pro transformaci plasmidů do bakterií byly použity kompetentní *Agrobacterium tumefaciens*, získané od Stanislava Vosolsobě dle postupu v jeho diplomové práci (Vosolsobě, 2010).

Všechny bakterie byly uchovávány také v -70°C v podobě glycerolové konzervy (do 900 µl bakteriální suspenze bylo přidáno 100 µl glycerolu, ihned zmrazeno v tekutém dusíku).

5.1.3 Příprava kompetentních bakterií

Konzerva *Escherichia coli*, kmen JM109, byla rozčárkována na plotnu LB media a druhý den bylo několik kolonií zaočkováno do media SOB a kultivováno přes noc. Ráno byly 2 ml této suspenze zaočkovány do 250 ml media SOB a kultivovány při 37°C a 180 RPM do $OD_{600} = 0,6$. Poté byla suspenze 10 minut chlazená na ledu a dvakrát centrifugována (2 500 g, 10 min, 4°C). Po každé centrifugaci byl odlit supernatant a pelet byl resuspendován nejdříve v 80, poté ve 20 ml vychlazeného media TB. Následně byl k bakteriím přidán DMSO do finální koncentrace 7 % a po 10 min stání na ledu byly buňky po alikvotech 500 µl zamrazeny v tekutém dusíku a skladovány v -70°C. Kompetentnost získaných buněk byla ověřena transformací (viz dále) plasmidem pUC.

5.1.4 Media

	LB	MS	YEB	SOC	TB	SOB
pepton (Serva)	10		5	20		20
yeast extract (Serva)	5		0,5	5		5
sacharosa (Lach-Ner)		10	2,5			
glukosa				3,6		
NaCl	10			500 µl 1M		0,6
KCl				50 µl 2,5 M	18,6	0,2
MgSO ₄ .7H ₂ O			1	500 µl 1M		2,5
MgCl ₂ .6H ₂ O				500 µl 1M		2
MnCl ₂					6,9	
CaCl ₂					1,7	

MS sole		2,2				
PIPES					3	
agar (Ducheve Biochemie)	17,5	12	17,5			
pH	7,5	5,7			6,7	6,7

Všechna media byla doplněna destilovanou vodou do 1l. Udaná množství jsou v gramech. Do SOC média byly soli přidávány až po autoklávování ve formě sterilních roztoků. Tekuté medium získáme vynecháním agaru.

Do medií byla přidávána antibiotika (MP Biomedicals) a další látky, a to takto:
kanamycin – zásobní roztok 500 mg/10 ml vody, aplikace 1 μ l/ml
ampicilin – zásobní roztok 500 mg/1 ml vody, aplikace 1 μ l/ml
rifampicin – zásobní roztok 100 mg/10 ml metanolu, aplikace 5 μ l/ml
hygromycin – zásobní roztok 20 mg/1 ml vody, aplikace 1 μ l/ml
claforan – zásobní roztok 100 mg/1 ml vody, aplikace 0,5 μ l/ml
17- β -estradiol (Sigma) – zásobní roztok 20mM v DMSO, aplikace 0,1 μ l/ml na výslednou koncentraci 2 μ M, pokud není určeno jinak.

Antibiotika i estradiol byly sterilizovány filtrací a přidávány do media až po jeho vyklávování a zchlazení na cca 60°C.

5.2 Klonování

5.2.1 Izolace mRNA a reverzní transkripce

Rostliny *Arabidopsis thaliana* (wt) byly pěstovány *in vitro*, ve stáří 14 dní byly zváženy, po 100 mg alikvotech vloženy do 2 ml mikrozkušavek Eppendorf spolu se dvěma ocelovými kuličkami a zamraženy v tekutém dusíku. Dále byl materiál homogenizován v kuličkovém mlýnku Retsch MM 301 (frekvence 23 Hz, 2x2 min). RNA byla izolována pomocí kitu RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, katalogové číslo 74904) dle protokolu výrobce a skladována při -70°C. Koncentrace výsledné RNA byla určena pomocí spektrofotometru Thermo Spectronic BioMate 5 z absorbance naředěného vzorku při 260 a 280 nm. Z těchto údajů byla určena i čistota výsledné RNA.

Reverzní transkripce byla provedena pomocí ReverseAid MMuLV Reverse Transcriptase (Fermentas) dle průvodního protokolu. Výchozí množství RNA bylo 1 μ g.

5.2.2 Používané primery

Syntézu primerů provedla firma Generi biotech s.r.o., Hradec Králové. Byly to tyto primery:

AtARP2F: G GAT CCA ATG GAC AAC AAA AAC GTC GTC G
AtARP2R: AAGCTT TTA GGC TTG GCT CAT TTT ATT CAA AC

AtARP3F: G GAT CCA ATG GAC CCG ACT TCT CGA CC
AtARP3R: AAGCTT TCA ATA CAT TCC CTT GAA CAC

AtARPC1aF: G GAT CCA ATG GCA GTG GTG GAT GTT CAT C
AtARPC1aR: AAGCTT TTA AAA CTG ATT GCC AAG TTC TTG

AtARPC2bF: G GAT CCA ATG GCA TAT C TC GAA AGA GCC TC
AtARPC2bR: AAGCTT TTA GTC CAA TTT TGT GTA TGA TTT ATC

AtARPC3F: G GAT CCA ATG GTT TAT CAC TCG AGT TTT GTG
AtARPC3R: AAGCTT TCA TAG GAC GAC CAC GTT CAT GAA T

AtARPC4F: G GAT CCA ATG GCA AAC TCA TTA CGG CTG TAT
AtARPC4R: AAGCTT CTA CTT CAA GAG CTG CTT TAC ATG

AtARPC5F: G GAT CCA ATG GCA GAA T TC GTT GAA GCT G
AtARPC5R: AAGCTT TCA AAC GGT GTT GAT GGT ATC AGT AAG

Na konce primerů byla vložena restrikční místa BamHI a HindIII, také byly primery upraveny přidáním nukleotidů tak, aby ARP2/3 podjednotky a GFP byly ve stejném čtecím rámci. Po doručení byly primery dle pokynů výrobce naředěny na koncentraci 0,1 mM a skladovány v -20°C. Část primerů byla naředěna ještě 10x na koncentraci 0,01 mM, tyto primery byly pak používány v reakcích.

5.2.3 PCR

PCR byla prováděna zejména na thermocycleru MJResearch PTC-200. Vzhledem k technickým potížím, které vznikaly v souvislosti s neobyčejně vysokou mírou mutací ve výsledných konstruktech, bylo vyzkoušeno několik polymeráz, konkrétně Taq DNA Polymeráza, Pfu DNA Polymeráza (Fermentas) a Dream Taq DNA Polymeráza. V závislosti na těchto modifikacích byl modifikován i cyklus.

Složení reakční směsi na jednu 50 µl reakci:

voda: 37 µl

puf: 5 µl (pro Taq DNA Polymerázu, Pfu DNA Polymerázu a Dream Taq DNA Polymerázu vždy jiný, pro tyto polymerázy specifický puf)

MgCl₂: 3 µl (pouze pro Taq DNA Polymerázu, pro Pfu DNA Polymerázu a Dream Taq DNA Polymerázu nahrazeno vodou, protože pufr pro Pfu DNA Polymerázu a Dream Taq DNA Polymerázu již hořčík obsahují)

dNTP: 1 μ l
cDNA: 1 μ l
primery: 1 μ l
polymeráza: 0,75 μ l

Program:

94°C – 3 min

(94°C – 30 s; 58°C – 45 s; 72°C – 1 min), opakovat 35x. Pro Pfu polymerázu prodloužena teplota 72°C, konkrétně pro ARP3, C1 a C2 na 2,5 min; pro C3, C4, a C5 na 1,5 min.

72°C – 10 min

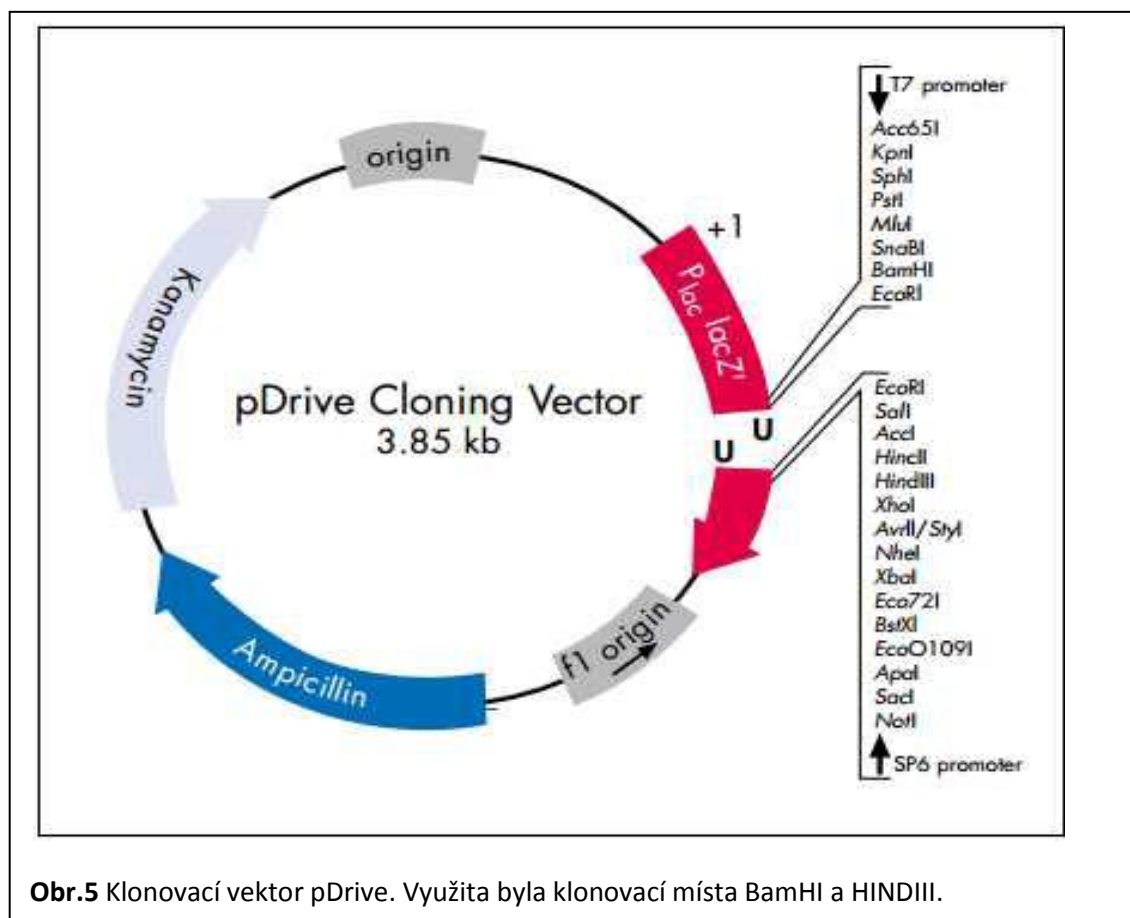
Nakonec chlazení na 4°C.

Pro testovací PCR byla používána poloviční směs o celkovém objemu 20 μ l a vždy pouze Taq polymeráza.

V případě Pfu DNA Polymerázy byl po PCR zařazen ještě jeden krok, protože tato polymeráza má sice nižší chybovost, netvoří však lepivé konce (přesahy AAA na 3' koncích), které jsou nezbytné pro klonování do pDrive. Vzorke amplifikované pomocí Pfu byly tedy po rozdělení na agarosové elektroforéze a po izolaci z gelu (25 μ l eluátu, viz dále) smíchány s 5 μ l pufru (Taq buffer), 3 μ l MgCl₂, 0,2 μ l dNTP, 0,2 μ l polymerázy (Taq DNA Polymerázy) a doplněny destilovanou vodou do 50 μ l. Tato směs byla inkubována 10 minut při 72°C. Poté byla DNA vysrážena z vodné fáze přidáním 5 μ l 3 M octanu sodného (pH 5,3) a 150 μ l 96 % ethanolu. Zvortexovaná směs byla inkubována 2 hod při -20°C, poté opatrně přenesena do vychlazené centrifugy, aby se nenarušil vzniklý pelet obsahující DNA, a zcentrifugována (20 min, 14 000 g, 4°C). Po slítí supernatantu bylo k peletu doplněno 200 μ l 70% ethanolu, směs byla inkubována 5 min při pokojové teplotě, aby z peletu do ethanolu vydifundovaly sole, a znovu stočena (5 min, 14 000 G, 4°C). Supernatant byl odlit, pelet byl vysušen a poté rozpuštěn v destilované vodě.

5.2.4 Elektroforéza a izolace produktu z gelu

PCR produkt byl nanesen na 1,2 % agarosový gel (1,2 % agarosa v pufru TAE (40mM Tris acetát, 1mM EDTA, pH 8,0), GelRed 1 µl/1ml), smísen s 6x DNA Loading Dye (Fermentas) v poměru 1:5, jako marker byl použit 2 µl GeneRuler (Fermentas). Elektroforéza byla připojena ke zdroji napětí (obvykle 100 mV a 50 mA, v případě potřeby i méně) na cca 30 minut. Produkt odpovídající velikosti byl pak z gelu izolován kitem Qiagen II Gel Extraction Kit (Qiagen) dle pokynů výrobce.



5.2.5 Ligace produktu do vektoru pDrive

Vyizolovaná DNA odpovídající jednotlivým podjednotkám byla dále transformována do vektoru pDrive (Qiagen, viz **obr. 5**) mezi restrikční místa BamHI a HindIII kitem Qiagen PCR cloning kit dle protokolu výrobce. Vektor kóduje geny pro resistenci na antibiotika ampicilin a kanamycin, pro selekci byla používána vzhledem k nestabilitě ampicilinu zejména resistance na kanamycin.

5.2.6 Transformace plasmidu do bakterií metodou heat-shock

Získaná ligační směs byla transformována do kompetentních bakterií *Escherichia coli*. Nejprve byly kompetentní bakterie rozmrazeny na ledu, pak byly

přidány 4 µl ligační směsi a buňky byly špičkou pipety lehce promíchány. Po 30 min inkubace na ledu byly buňky vystaveny teplotnímu šoku 42°C po dobu 1 min, poté byly 2 min zchlazeny na ledu a nakonec k nim byl přidán 1 ml SOC media o teplotě 37°C, v němž byly 1 hod inkubovány na orbitální třepačce při 220 RPM. Nakonec byly bakterie vysety na tuhé LB medium se selekčním markerem, na něž bylo za studena rozetřeno s 20 µl X-galu (80 mg/l). Bakterie byly kultivovány při 37°C do druhého dne.

5.2.7 Modrobílá selekce, testovací PCR, kontrolní restrikce a sekvenace

Selekce je založena jednak na kanamycinové rezistenci nesené plasmidem pDrive (přežívají jen transformované buňky), a jednak na aktivitě LacZ peptidu, který štěpí X-gal za vzniku modrého indolového zbarvení bakteriálních kolonií. Aktivita LacZ peptidu je indukována pomocí IPTG, které je přirozeně obsaženo v námi používaném kaseinovém peptonu, není ho tedy nutno přidávat, jako v případě, kdy by byl použit sójový pepton S, který IPTG neobsahuje. Klonovací místo plasmidu pDrive leží uvnitř LacZ genu, inserce fragmentu tudíž ruší aktivitu LacZ peptidu a bakteriální kolonie nesoucí plasmid s vloženým DNA fragmentem zůstávají bílé. Vzhledem k omezené spolehlivosti modro-bílé selekce (dr. Fischer, ústní sdělení; také vlastní pozorování) byla přítomnost fragmentu dodatečně kontrolována po přečárkování předběžně vybraných kolonií na nové plotny (kultivace 1 den, 37°C) pomocí PCR. Z narostlých přečárkovaných bakterií bylo špičkou pipety odebráno velmi malé množství, které bylo přeneseno na dno plastové zkumavky. Do této zkumavky pak byla namíchána PCR směs a bylo provedeno PCR a elektroforéza. Kolonie, které na elektroforéze ukázaly pruh o správné velikosti, byly vybrány k další analýze.

Nadějně kolonie z předchozího kroku byly zaočkovány do 3 ml tekutého LB media se selekčním antibiotikem a ponechány růst 16 hodin. Poté z nich byla pomocí kitu Wizard Plus SV Minipreps (Promega) dle návodu výrobce extrahována DNA. Koncentrace získané DNA byla určena pomocí spektrofotometru.

DNA získaná v předchozím kroku byla podrobena kontrolní restrikci. Reakce měla toto složení: 1,5 µl pufru (R+ buffer with BSA), 7,5 µl vody, 5 µl vektoru, 0,5 µl BamHI enzymu, 0,5 µl HindIII enzymu. Inkubace 1 hodinu v 37°C.

Po restrikci byla směs nanášena na elektroforézu a ty vzorky, které daly proužek o správné velikosti (příp. více pruhů v případě výskytu restrikčních míst i uvnitř fragmentu), byly poslány na sekvenaci.

Sekvence byla provedena servisně Sekvenační laboratoří Biologické sekce PřF UK pomocí M13 primerů, délka přečteného fragmentu se pohybovala kolem 1kbp. Výsledné sekvence byly porovnány pomocí programu BLAST s cDNA sekvencemi podjednotek kvůli odhalení mutací.

5.2.8 Překlonování vektoru z pDrive do pGreen

Vektor pGreen byl spolu s pDrive s vloženým inzertem z předchozího kroku podroben restričnímu štěpení enzymy HindIII a BamHI. Složení reakční směsi bylo stejné jako v případě kontrolní restrikce, jen inkubace trvala 3 hod. Produkty restričního štěpení byly elektroforézou separovány a produkty odpovídající velikosti (podjednotka ARP2/3 komplexu pro pDrive a celý rozštěpený plasmid pro pGreen) izolovány. Otevřený pGreen a vyštěpená ARP2/3 podjednotka byly zaligovány pomocí kitu Qiagen PCR cloning kit dle návodu výrobce. Koncentrace DNA byly měřeny spektrofotometrem. Ligační směsi byly metodou heat-shock transformovány bakterie *E. coli*, pomocí testovací PCR byla ověřena přítomnost plasmidu v narostlých koloniích a byla z nich izolována DNA kitem Wizard Plus SV Minipreps (Promega) dle návodu výrobce.

5.2.9 Transformace plasmidu do bakterií metodou elektroporace

Vektor pGreen se zaligovaným inzertem z předchozího kroku byl transformován do kompetentních bakterií *Agrobacterium tumefaciens* metodou elektroporace, kdy 40 µl kompetentních buněk bylo rozmrazeno na ledu a spolu s 1-4 µl DNA inkubováno 1 min. Poté byla směs přenesena do vychlazené kyvety a byl aplikován elektrický puls (25 µF, 2 kV, 200 ohm) v elektroporátoru (BioRad Gene Pulser). Poté bylo přidáno 1 ml YEB media do kyvety, buňky byly i s médiem přeneseny do zkumavky a 2 hod inkubovány při 28°C a 220 RPM. 100 µl suspenze pak bylo vyseto na pevné YEB medium s rifampicinem a selekčním antibiotikem.

5.2.10 Transformace rostlin *Arabidopsis* metodou floral dip

Transformované bakterie z předchozího kroku byly převedeny do suspenze v YEB mediu s rifampicinem a selekčním antibiotikem a ponechány přes noc narůst. Druhý den bylo 0,6 ml bakteriální suspenze inokulováno do 300 ml YEB media s rifampicinem a selekčním antibiotikem, tato suspenze byla kultivována při 28°C do druhého dne.

Druhý den byla suspenze centrifugována (15 min, 3700 g, 4°C), většina supernatantu byla odebrána, pelet byl resuspendován nejprve ve zbylém supernatantu a poté v 5 % sacharose s 0,05 % smáčedlem Silwett (AgroBio Opava). Z rostlin byla ostříhána všechny šesule i květy a poté byly do suspenze rostliny na 10 s ponořeny. Nakonec byly rostliny volně zabaleny do folie a ponechány přes noc v chladu a temnu.

5.3 Mikroskopie

Většina vzorků byla pozorována pod konfokálním mikroskopem Leica TCS NT (Leica Microsystems Heidelberg GmbH) objektivem 63x s vodní imerzí a numerickou aperturou 1,2 (HCX PL APO ibd. BL 63,0×/1,2 W), pro snímky pokožky děložních listů byl využit objektiv 20x s vodní imerzí a numerickou aperturou 0,7 (HC PL APO ibd. BL 20,0×/0,7 W).

Byl využit Ar/Kr laser pro pozorování GFP a Alexa 488 (Invitrogen, excitace při 488 nm, emise při 514-545 nm), Alexa 555 (Invitrogen, excitace 543 nm, emise 560-620), FM4-64 (Invitrogen, excitace při 514 nm, emise při 650 – 750), Rhodamin-faloidin (Sigma, excitace při 543 nm, emise při 545 – 590 nm) a Mitotracker (Molecular probes, excitace při 579 nm, emise při 599 nm). Pro dvojité značené vzorky bylo použito sekvenční snímání.

Obrázky byly zpracovány pomocí Leica Lite softwaru (Leica Microsystems Heidelberg GmbH) a Photoshopu.

Některé snímky byly získány pomocí mikroskopu Olympus Provis AX 70 (Olympus Optical Co., Ltd, Tokyo, Japan) a kamery Nikon DXM1200 (Nikon Inc., Tokyo, Japan).

Několik snímků bylo pořízeno pomocí mikroskopu TIRF (Leica DMI6000) v Ústavu molekulární genetiky v Krči.

5.3.1 Imunofluorescenční vizualizace

Pro imunofluorescenční vizualizaci byly použity obvykle pětidenní rostliny kultivované *in vitro*, mezi jednotlivými kroky byly rostliny přenášeny v košíčkách s nylonovým propustným dnem.

Použité roztoky:

pufir ASB: 3,024 g PIPES, 0,1232 g MgSO₄·7H₂O, 0,3804 g EGTA, pH = 6,4.

pufir PBS: 0,8 g NaCl, 0,2319 g Na₂HPO₄·12H₂O, 0,02 g KCl, 0,0158 g KH₂PO₄

Navážky na oba pufry jsou v gramech na 100 ml.

Fixáž I: ASB + 400 μ M MBS 20 min

Fixáž II: ASB + 400 μ M MBS + 0,1 % Triton X-100 + 3,7 % PFA + 0,07 % glutaraldehyd + inhibitory proteas (10 μ M leupeptin, 1,25 μ M pepstatin, 300 μ M PMSF)

Enzymace: ASB + 0,1 % Triton X-100 + 1 % BSA (MP Biomedicals) + 0,4M manitol + inhibitory proteas + enzymy: 0,5 % celulasa (Sigma) a 0,5 % pektolyasa Y-23 (Kyowa Chemical Products Co Ltd.)

protilátky:

primární:

mouse anti-actin (ICN, 1:400)

rabbit anti-NtARPC2 (polyklonální, získána v rámci disertační práce Havelková (2010); 1:1000)

rabbit anti-ARP2 (polyklonální, rozeznává ARP2 *Saccharomyces pombe* (McCollum et al., 1996), ověřena pro použití v rostlinách v práci Fišerová et al. (2006), 1:400)

rabbit anti-ARP3 (polyklonální, rozeznává ARP3 *Saccharomyces pombe* (McCollum et al., 1996), ověřena pro použití v rostlinách v práci Fišerová et al. (2006), 1:400)

rat anti- α -tubulin YOL1/34 (Santa Cruz Biotechnology, 1:1000)

sekundární:

anti-rabbit Alexa 488 (Invitrogen, 1:1000)

anti-rat Alexa 488 (Invitrogen, 1:1000)

anti-rabbit Alexa 555 (Invitrogen, 1:1000)

anti- mouse Alexa 555 (Invitrogen, 1:1000)

Rostliny byly vloženy do nylonového košíčku, 20 minut inkubovány ve fixáži I a pak 40 minut ve fixáži II. Dále byly promyty 2x 5 minut v ASB s 0,1 % Tritonem X-100, pak extrahovány 10 minut v ASB s 1 % Tritonem X-100 a opět promyty 2x 5 minut v ASB s 0,1 % Tritonem X-100. Pak byla provedena 25 minut enzymace, promytí 3x 5 minut v ABS a pak inkubace 10 minut v methanolu při -20°C . Dále byly vzorky opět promyty 10 minut v PBS a poté 20 minut inkubovány v PBS se sodium borohydridem (1g/ml) kvůli eliminaci autofluorescence. Pak byly propláchnuty 3x 10 minut v PBS, 30 minut inkubovány v PBS s 1 % BSA a 50 mM glycinem a nakonec inkubovány též

s primární protilátkou (2 hodiny při pokojové teplotě, nebo přes noc při 4°C). Pak byly promyty 2x 15 minut v PBS a 2 hodiny inkubovány při pokojové teplotě se sekundární protilátkou. Nakonec byly promyty opět 2x 15 minut v PBS a pozorovány.

5.3.2 Další vizualizace a ošetření

Latrunkulin (Sigma-Aldrich) – 1 hod před pozorováním byly rostliny vloženy do 1250 μ l vodovodní vody s 0,1 μ l zásobního roztoku latrunkulinu. Zásobní roztok je 2,53mM, výsledná koncentrace je tedy 200 nM.

Značení membrán: FM4-64 (Invitrogen) – 24 hod před pozorováním byly rostliny vloženy do 625 μ l vodovodní vody s 1 μ l zásobního roztoku FM4-64. Zásobní roztok je 20mM v DMSO, výsledná koncentrace je tedy 32 μ M.

Vizualizace mitochondrií: Mitotracker (Invitrogen) – 1 hod před pozorováním byly rostliny vloženy do 2 ml vodovodní vody s 0,1 μ l zásobního roztoku Mitotrackeru. Zásobní roztok je 1mM v DMSO, výsledná koncentrace je tedy 0,05 μ M.

Vizualizace aktinu pomocí rhodamin-faloidinu: Rhodamin-faloidin (Sigma-Aldrich) – Rostliny byly přeneseny do košíčku s nylonovým dnem, 10 min inkubovány ve fixáži I (1,8 % PFA v základním pufru) a 10 min ve fixáži II (1,8 % PFA a 1 % glycerol v základním pufru), poté byly krátce promyty v základním pufru (0,0761 g EGTA, 0,6048 g PIPES, 0,0203 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$) a dalších 10 min inkubovány v základním pufru. Poté byl do 1 ml základního pufru přidán 1 ml zásobního roztoku rhodamin/faloidinu (0,66 μ M v 96 % ethanolu), v této směsi (koncentrace rhodamin/faloidinu je zde 0,33 μ M) byly rostliny inkubovány 30 min, poté byly třikrát propláchnuty v PBS a pozorovány.

5.4 Proteiny

5.4.1 Izolace proteinů

Přibližně 3g rostlinného materiálu (14denní rostliny) bylo zmrazeno v tekutém dusíku a ve třecí misce rozdrčeno na prášek. K homogenizátu byl přidán 1 ml extrakčního pufru (5 mM EGTA, 25 mM MES, 5 mM $MgCl_2$, 1 M glycerol, pH 6,9) s aditivy (100 mM GTP, DTT a PMSF, 100 μ M aprotinin, leupeptin a pepstatin) a po rozmrazení byla směs centrifugována 15 min při 3 000 g, 4°C. Směs se rozdělila na pelet I (hrubé nečistoty) a supernatant I (solubilní a mikrosomální buněčná frakce).

Dále se postup lišil, v některých případech byl pro další kroky použit celý supernatant I, v jiných byla prováděna frakcionace: supernatant I byl centrifugován znovu 30 min při 18 000 g, 4°C, čímž došlo k dalšímu oddělení peletu II (tj. mikrosomální frakce) a supernatantu II (tj. solubilní frakce).

Supernatant I či II (tedy ať už jen solubilní frakce, nebo solubilní smíšená s mikrosomální) byl podroben buď TCA precipitaci, nebo acetonové precipitaci.

Pelet II (vznikl pouze tehdy, pokud byla prováděna frakcionace) byl rozpuštěn v 2D pufru (50 mM Tris - HCl, pH 6,8; 2 % SDS, 36 % močovina, 30 % glycerol, 5 % merkaptotanol; 0,5 % bromfenolová modř).

5.4.2 TCA precipitace

Supernatant II byl smíchán 1:100 s roztokem A (1,5 % deoxycholát sodný 1 % azid sodný), promíchán a inkubován 15 minut při laboratorní teplotě. Poté byl přidán 1:10 roztok B, vzorek byl promíchán a centrifugován (30 min, 15 000 g). Supernatant byl odstraněn, pelet byl resuspendován v 1 ml 80 % acetonu a suspenze byla znovu centrifugována (30 min, 15 000 g), supernatant byl odsát a sediment vysušen na vzduchu. Pelet byl rozpuštěn v 2D pufru, zahřán (3 min, 99°C) a pelet byl homogenizován tlučkem. V případě potřeby bylo před zahříváním upraveno pH pomocí 1 M NaOH do bazické oblasti, abychom se vyhnuli kyselé hydrolyze.

5.4.3 Acetonová precipitace

V některých případech byla místo TCA precipitace využita acetonová precipitace. Supernatant II byl smíchán s pětinasobným množstvím podchlazeného (-20°C) acetonu, zvortexován a přes noc inkubován v -20°C. Poté byl centrifugován (15 min, 15 000 g, 4°C) a vzniklý pelet byl promyt 100 µl 90 % podchlazeného acetonu, vzorek byl opět centrifugován (5 min, 15 000 g, 4°C), supernatant odejmut, pelet byl vysušen a rozpuštěn v 2D pufru. Tento pelet není kvůli rozpuštění třeba zahřívát jako po TCA precipitaci.

5.4.4 Proteinová SDS-PAGE elektroforéza

Na rozdělení vyizolovaných proteinů byla použita SDS-PAGE (sodium-dodecylsulfát-polyakrylamid) elektroforéza v zařízení Minigel twin (Biometra). Byl používán 4 % zaostřovací a 10 % dělicí gel, napětí 100 V, proud 25 mA/gel a výkon 70 W. V případě potřeby byla před provedením elektroforézy provedena determinace koncentrace proteinů ve vzorku, aby bylo zajištěno, že jednotlivé vzorky budou

naneseny rovnoměrně. Stanovení koncentrace bylo prováděno pomocí kitu 2D-Quant kit (GE Healthcare).

Elektroforeticky rozdělené proteiny byly vizualizovány buď pomocí barviva Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma) 0,25 % v 10 % kyselině octové a 45 % metanolu, nebo byly blotovány na PVDF membránu. Pro blotování byl použit transferový pufr (14,4 g glycinu, 12,1 g Tris ve 200 ml methanolu, dolít destilovanou vodou do 1 l), blotování probíhalo 3 hod při 300 A, 300 V a 7 W. Před blotováním byla PVDF membrána aktivována methanolem.

5.4.5 ECL

Základní protokol značení proteinů a membráně blotu je variabilní; bylo vyzkoušeno mnoho experimentálních postupů ve snaze získat optimální výsledek. V následujícím textu jsou možné alternativy vyjmenovány a podtrženy, v kapitole výsledky je pak popsáno, které alternativy vedly k jakým výsledkům.

Membrána PVDF s proteiny byla aktivována ponořením do metanolu (pokud byla vyschlá) a poté blokována v 50 ml 4 % roztoku sušeného mléka v TBS pufru (20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1 % TritonX-100, pH 7,4) na orbitální třepačce (60 RPM). Blokování probíhalo 1 hod při 37°C, nebo přes noc v 4°C.

Poté byla membrána inkubována s primární protilátkou (1:500, či 1:1000) v 4 ml nebo v 8 ml TBS (150 mM NaCl, nebo 300 mM NaCl), a to přes noc ve 4°C, či při laboratorní teplotě 1 hod.

Poté byl blot omyt 3x 10 min v TBS (150 nebo 300 mM NaCl, dle toho, v jakém TBS probíhala inkubace s primární protilátkou), inkubován 1 hod při laboratorní teplotě se sekundární protilátkou (1:500, nebo 1:1000, nebo 1:2000), znovu omyt 2x 10 min v TBS (150 mM NaCl) a vyvolán systémem ECL (Pierce ECL Western Blotting substrate, Thermo Scientific) dle návodu výrobce.

Používali jsme primární protilátky proti NtARPC2 (viz mikroskopie) a proti GFP (monoklonální mouse anti-GFP, Roche). Jako sekundární protilátky byly použity křenové peroxidázy goat anti-mouse HRP (Stressgene) a goat anti-rabbit HRP (Promega).

5.5 Rescue experimenty

Semena byla vysévána na minimální MS medium s claforanem, 2 μ M estradiolem a selekčním antibiotikem a kultivována *in vitro* do stáří cca 14 dní, než se na většině rostlin objevily cca čtyři pravé listy. Poté byly trichomy rostlin hodnoceny

pod binolupou, pokud byly na rostlině nalezeny alespoň tři wt trichomy, byla rostlina prohlášena za mutantní rostlinu, kde byl obnoven fenotyp expresí proteinu (*rescue plant*), pokud ne, byla prohlášena za *dis* fenotyp. Byl sledován také počet rostlin, které i po dostatečné době nevytvořily pravé listy/vůbec nevyklíčily/zahynuly, tyto rostliny spadají do kategorie „nelze posoudit“. Získané výsledky pak byly velmi jednoduše statisticky zpracovány pomocí programu Excel. Snímky trichomů byly pořízeny pomocí binolupy a fotoaparátu Nikon.

Rostliny pro snímky epidermis děložních listů byly pěstovány analogicky, ve stáří 14 dní byly z misek vyjmuty, na rostlinách se zachráněným fenotypem (*rescue*) byly binolupou zkontrolovány trichomy, zda nejsou *dis*, poté byly rostliny inkubovány 1 hod s barvivem FM4-64 a pozorovány pod konfokálním mikroskopem.

5.6 qRT-PCR

Pro experimenty kvantitativní real-time PCR byly využity standardně pěstované 14denní rostliny, z nichž byla získána cDNA postupem popsáným v kapitole 5.2.1.

Samotná qRT-PCR byla provedena pomocí těchto primerů:

```
AtARP2-F: ACC ATG TAC CCA GGA TTA CC
AtARP2-R: CGA TCC GCA ATC TGA GTT TC
AtARP3-F: TGA GGA TTG GGA TGC TAT GG
AtARP3-R: ACA GCA ATG TAA AGC CCA GG
AtARPC2a-F: TAG AGA AGT GGT GAT GGG TG
AtARPC2a-R: AGT GAC TTT ATC CGC CTG AG
AtARPC2b-F: GAG CAG TGA CAT TGA AGG AG
AtARPC2b-R: ATC AAG GTT TAG GCC AAG GG
Aktin9-F: CTA TTC TCC GCT TTG GAC TTG GCA
Aktin9-R: AGG ACC TCA GGA CAA CGG AAA CG
```

Primery byly otestovány pomocí standardní PCR a agarosové elektroforézy, popsané v předchozích kapitolách. qRT-PCR byla provedena servisně na pracovišti Ústavu experimentální botaniky v Praze-Lysolajích.

Reakce byly provedeny na přístroji Light cycler 480 (Roche) pomocí kitu FastStart DNA Master SYBR Green PLUS Kit (Roche Applied Science).

Amplifikovány byly zhruba 100 bp dlouhé úseky, a to za pomoci fluorescenčně značených nukleotidů, přírůstek fluorescence byl během reakce sledován a na jeho základě byla posouzena míra exprese jednotlivých genů, vyjádřená crossing pointy a ratií (poměry).

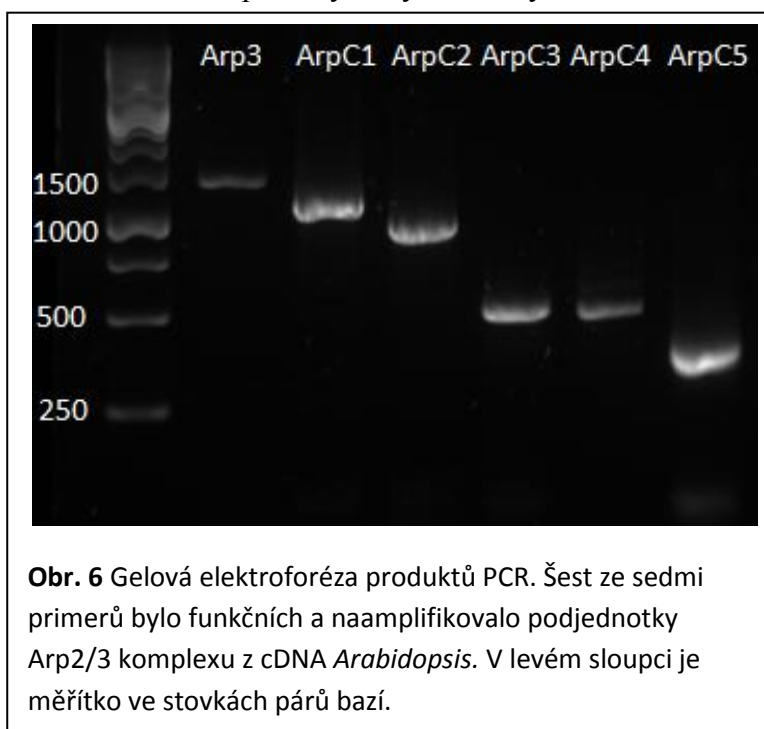
Crossing point je maximum druhé derivace fluorescenční křivky (pro ilustraci viz **obr. 33**, fluorescenční křivka vyjadřuje průběh fluorescence v PCR reakci) a vyjadřuje míru exprese zkoumaného genu. Ratio (poměr) je pak číselné vyjádření této míry, vztažené k expresi některého běžného housekeeping genu, v tomto případě aktinu. Reakce byla provedena ve dvou duplikátech a pěti ředěních (20x, 40x, 80x, 160x a 320x) a výsledné crossing pointy i poměry jsou aritmetickými průměry.

6 Výsledky

6.1 Klonování

Prvotním cílem práce bylo vytvořit rostliny *Arabidopsis thaliana*, transformované fúzním konstruktem podjednotek ARP2/3 komplexu z *Arabidopsis thaliana* a GFP. Po otestování primerů na cDNA bylo zjištěno, že všechny fungují dobře, pouze primer na ARP2 nefunguje vůbec, viz **obr. 6**. V další práci byl tedy ARP2 vynechán.

Pro vznik první sady konstruktů byla použita Taq polymeráza. Bylo získáno a sekvencováno 14 konstruktů (jeden ARP2, tři ARPC1, jeden ARPC2, dva ARPC3, tři ARPC4 a čtyři ARPC5) analýzou výsledků sekvenace bylo ovšem



zjištěno, že jsou všechny mutované.

Pro vznik druhé sady konstruktů byla použita Dream Taq DNA polymeráza. Bylo získáno 19 konstruktů (čtyři ARP3, šest ARPC1, tři ARPC2, tři ARPC4 a tři ARPC5), část z nich za sníženého počtu cyklů PCR (25x místo 35x), ale i tak opět všechny obsahovaly chyby v sekvenci.

Pro vznik třetí sady konstruktů byla použita Pfu DNA polymeráza a adekvátně modifikovaný cyklus. Bylo získáno 9 konstruktů (tři ARPC1, tři ARPC3 a tři ARPC5), jeden z nich (ARPC3) neobsahoval chyby v sekvenci, viz **obr. 7**. Tento konstrukt byl použit k další práci.

Nakonec byl tedy získán jeden konstrukt GFP-AtARPC3, který byl po transformaci do *Agrobacterium tumefaciens* transformován do rostliny *Arabidopsis thaliana*. Během selekce ovšem nebylo nalezeno žádné transformované semeno. Transformace vektoru do *Arabidopsis* byla ještě třikrát opakována, vždy ovšem s tímž výsledkem, rostliny se transformovat nepodařilo, respektive během selekce nebylo

nalezeno žádné transformované semeno. Celkem byly provedeny čtyři transformace, to je cca 50 rostlin.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
970 bits(525)	0.0	525/525(100%)	0/525(0%)	Plus/Minus
Query 1	ATGGTTTATCACTCGAGTTTTGTGGATGAAGAAGGAGTAACAAAGGCATGTGGTTGTCCA	60		
Sbjct 629	ATGGTTTATCACTCGAGTTTTGTGGATGAAGAAGGAGTAACAAAGGCATGTGGTTGTCCA	570		
Query 61	TTGCTTCCTCTCAAGAGTCATATAAAAAGGTCCTGCACCTGTTTCAGAACAAGATAAAACT	120		
Sbjct 569	TTGCTTCCTCTCAAGAGTCATATAAAAAGGTCCTGCACCTGTTTCAGAACAAGATAAAACT	510		
Query 121	GATATAGTAGACGAGGCAATCACCTTCTTTTCGTGCTAATGTCTTCTTCACAAACTTTGAT	180		
Sbjct 509	GATATAGTAGACGAGGCAATCACCTTCTTTTCGTGCTAATGTCTTCTTCACAAACTTTGAT	450		
Query 181	ATCAAAAGTCCTGCTGATAAGCTCCTTATTTACTTGACGTTTTATATAAATGTGGCGTTA	240		
Sbjct 449	ATCAAAAGTCCTGCTGATAAGCTCCTTATTTACTTGACGTTTTATATAAATGTGGCGTTA	390		
Query 241	AAGAGGCTTGAAGGCTGTAGAACATGGCTGTTGGAACATAAGCGATTATCAACTTGGGT	300		
Sbjct 389	AAGAGGCTTGAAGGCTGTAGAACATGGCTGTTGGAACATAAGCGATTATCAACTTGGGT	330		
Query 301	TTAGAAGATATTCCTGTTCTCGGAGAACTGGCTTTTCTTTCCAGGICTCTTTTCGCTT	360		
Sbjct 329	TTAGAAGATATTCCTGTTCTCGGAGAACTGGCTTTTCTTTCCAGGICTCTTTTCGCTT	270		
Query 361	CCGAGTCCCAGGACGAAGCAGAGCTTTTCAGGAACATCTTAAGCAGGTTCCGAGAGGAG	420		
Sbjct 269	CCGAGTCCCAGGACGAAGCAGAGCTTTTCAGGAACATCTTAAGCAGGTTCCGAGAGGAG	210		
Query 421	ACAAGTGGGAGGTTACTGAGTGTAGCATATAGAGCCAACGGGACACCAATAAATGGTGG	480		
Sbjct 209	ACAAGTGGGAGGTTACTGAGTGTAGCATATAGAGCCAACGGGACACCAATAAATGGTGG	150		
Query 481	CTTGCATTGCGCAAGAGGAAATTCATGAACGTGGTCGTCCTATGA	525		
Sbjct 149	CTTGCATTGCGCAAGAGGAAATTCATGAACGTGGTCGTCCTATGA	105		

Obr. 7 Nukleotidový alignment cDNA podjednotky ArpC3 a námi získaného klonu. Alignment byl vytvořen pomocí programu BLAST (megablast).

Snaha získat rostliny *Arabidopsis thaliana* transformované fúzními konstrukty GFP a podjednotek ARP2/3 komplexu z *Arabidopsis thaliana* byla tedy opuštěna.

V další práci byl využit fúzní konstrukt tabákové podjednotky ARPC2 a GFP (*GFP-NtARPC2*), vyrobený v naší laboratoři Dr. Ericou Bellinvia. Jde sice o tabákovou podjednotku, analýzou sekvence bylo zjištěno, že se od podjednotky *Arabidopsis* na proteinové úrovni liší v 28 %, v 11 % jde o substituce podobných aminokyselin, v 17 % o substituce odlišných aminokyselin, viz **obr. 8**. Dále byl použit stejný konstrukt, ovšem bez GFP (*NtARPC2*). Tyto konstrukty byly několikrát úspěšně natransformovány do *Arabidopsis thaliana*, a to jak do wt, tak do *dis2-1* rostlin. Transformovaná semena byla využita k dalším experimentům.

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
471 bits(1212)	2e-171	Compositional matrix adjust.	231/321(72%)	268/321(83%)	6/321(1%)
Query 1	MILLQSHSRFLLQTLTRAQNLDKAVELDYQWIEFDDVRYHVQVTMKNPNLLLLSVSLPN				60
Sbjct 1	MILLQSPSRYLLQILSNRVQNLEKGVELDCQWVEFDDIRYHIQASVKNPNVLLSVSLPI				60
Query 61	PPPEAMSF DGLPLGAIEAIKTTYGTGFQILDPPRDGFSLTLKLNFSKVRPDEE----LLT				116
Sbjct 61	PPPE + F GLPLGA+EAIK YG QILDPPRDGF+LTLKLN SK+ PDEE LLT				120
Query 117	KLASIREVVMGAPLKIIFKHLASRTVAPELDRLVAIMHRPNETFFLVQPQADKVTVAFFMR				176
Sbjct 121	K+AS+REVVMGAPL+ + KHL SRTV +L + VA++HRPNE+FFLVQPQ DKVTV FPMR				180
Query 177	FKDSVDTILATSFLKEFVEARRAAALNTAPSCSWSPAPQEQLEGAPKETLSANAGFVTFV				236
Sbjct 181	F DSVDT+LATSFL+EFVEARR A LN AP C WSP+APQEL+ A E LSANAGFV+FV				240
Query 237	IFPRHVEGKLDRTVWNLSTFHAYVSYHVKFSSEGFMHTRMRRRVESMIQALDQAKP-LEK				295
Sbjct 241	IFPRHVEGRKLDRTVWNLSTFHAYVNYHVKCFMHTRMRRQVESLIQALDRAKPDSEK				300
Query 296	T-RSMNKSFKRLGLNEVNHT		315		
Sbjct 301	RS ++SFKR+ L + N++				
	AKRSSPSRSFKRMSLKDGNNS		321		

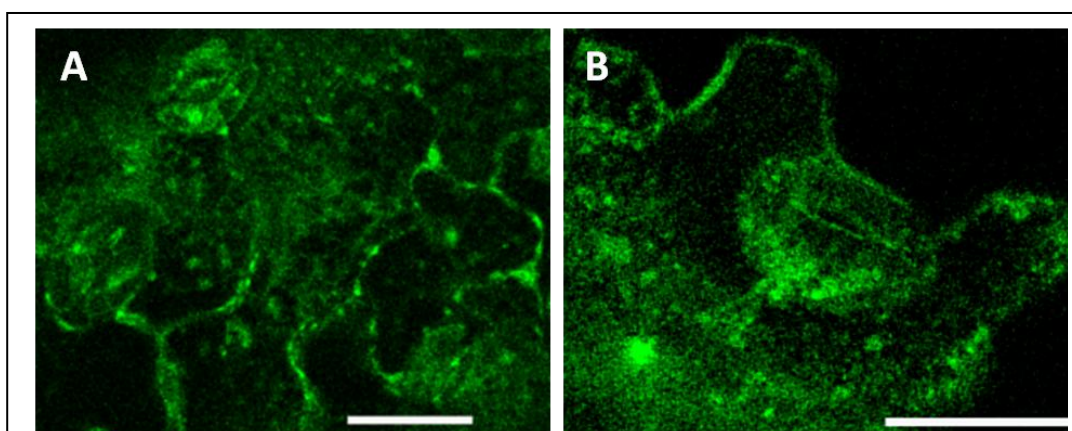
Obr. 8 Proteinový alignment huseníčkové (query) a tabákové (subject) sekvence proteinu ArpC2a. Alignment byl vytvořen pomocí programu BLAST.

6.2 Mikroskopie

Pokud není řečeno jinak, všechny obrázky byly získány pozorováním *in vivo* na konfokálním mikroskopu na 5denních semenáčcích rostliny *Arabidopsis thaliana*, pěstovaných na minimálním MS mediu. Pozorována byla rhizodermis elongační zóny kořene. Rostliny transformované konstruktem *GFP-NtARPC2* byly indukovány 2 μ M estradiolem. Měřítka je 20 μ m (pokud není uvedeno jinak).

6.2.1 *In vivo* pozorování GFP-NtARPC2 rostlin

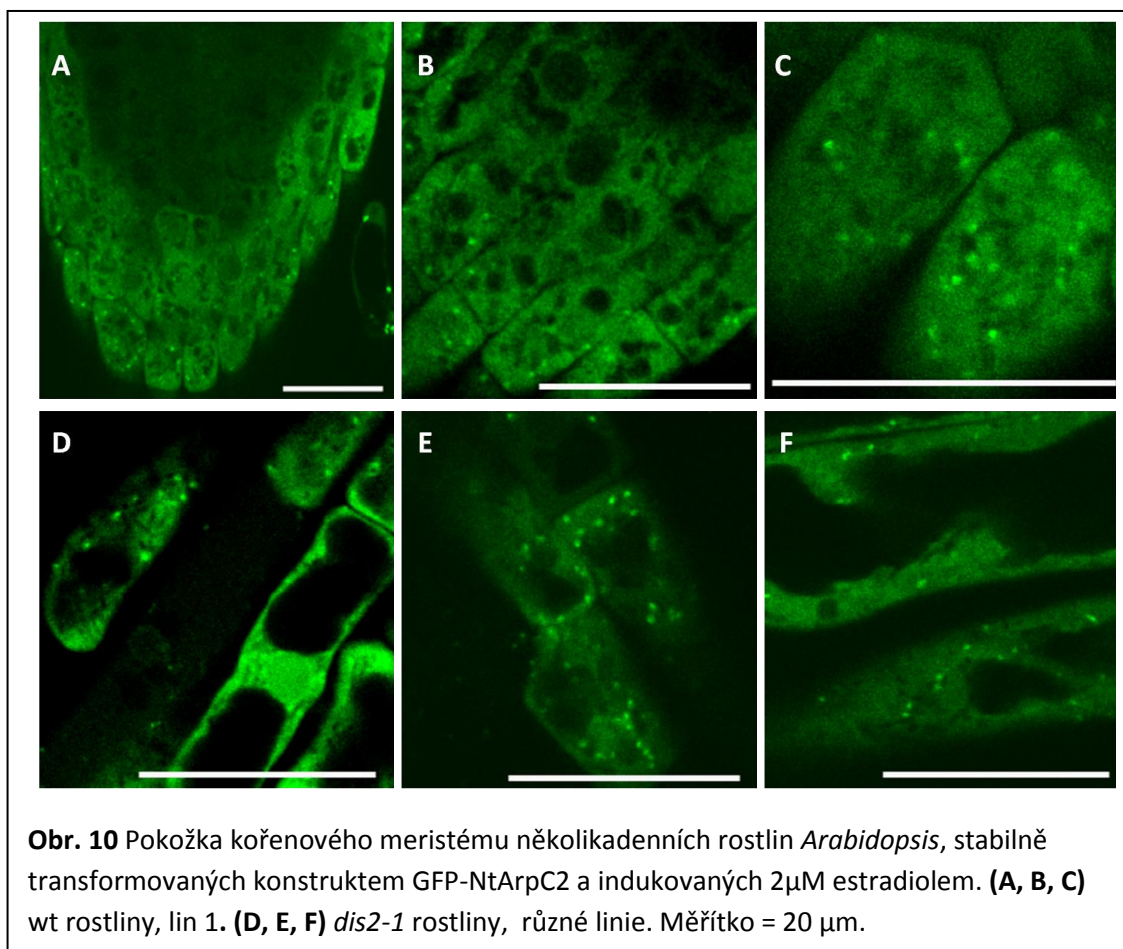
Zpočátku byla fluorescence indukována vložení dospělého listu do roztoku s estradiolem. Pozorovali jsme difusní signál v cytoplasmě a občasné tečky (viz **obr.9**)



Obr. 9 Pokožka dospělého listu wt rostlin *Arabidopsis*, stabilně transformovaných konstruktem GFP-NtArpC2, indukce vložení do roztoku s estradiolem přes noc. Měřítka = 20 μ m.

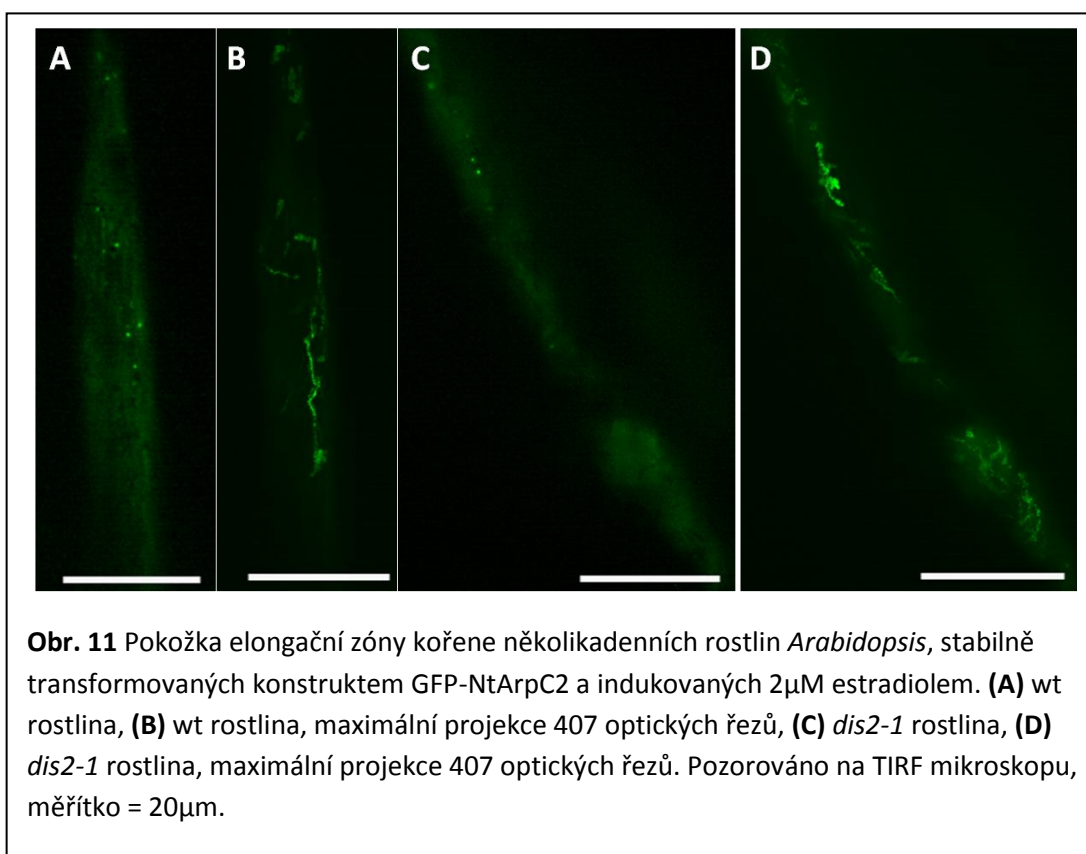
v buňkách pokožky listu, a ve svěracích buňkách průduchů. Výrazný signál byl viditelný na okrajích buněk, kde by mohl představovat lokalizaci podjednotek v kortikální cytoplasmě. Bylo ale zjištěno, že tento způsob indukce není nejvhodnější, neboť buňky indukuje nerovnoměrně a také činí obtížnou indukci kořenů, které jsme chtěli pozorovat. V dalších experimentech jsme tedy používali rostliny pěstované *in vitro* na indukčním mediu.

Z důvodů zmíněných v následující kapitole byly pro další práci vybrány kořeny, konkrétně buňky rhizodermis meristematické a tranzitní zóny kořene. Pozorovali jsme v nich difusní signál v cytoplasmě (nikoli ovšem v jádře) jako pozadí pro jasné, motilní tečky, lokalizované v cytoplasmě celé buňky. Množství teček se lišilo jak v jednotlivých buňkách, tak mezi jednotlivými rostlinami, ale nijak dramaticky. Stejně tak se odlišovala intenzita difusního signálu v jednotlivých buňkách a rostlinách. Tečky nebyly pozorovány v jádře ani ve vakuole, viz **obr. 10**. Dále byly získány a analyzovány rostliny *dis2-1*, transformované konstruktem GFP-NtARPC2. Zjistili jsme, že mezi těmito rostlinami a wt liniemi neexistují v lokalizaci transgenního proteinu v podstatě žádné rozdíly, viz **obr. 10**.



6.2.2 *In vivo* pozorování GFP-NtARPC2 rostlin – TIRF mikroskopie

TIRF mikroskopie potvrdila všechny doposud získané výsledky a umožnila sledovat velmi detailně pohyb teček, který lze charakterizovat jako přetrhovaný, *stop-and-go movement* známý v souvislosti s Golgiho aparátem, viz **obr. 11**. Samotný pohyb teček je obzvláště dobře zřetelný na maximální projekci optických řezů. Mezi wt a *dis2-1* rostlinami nebyly zaznamenány žádné rozdíly.


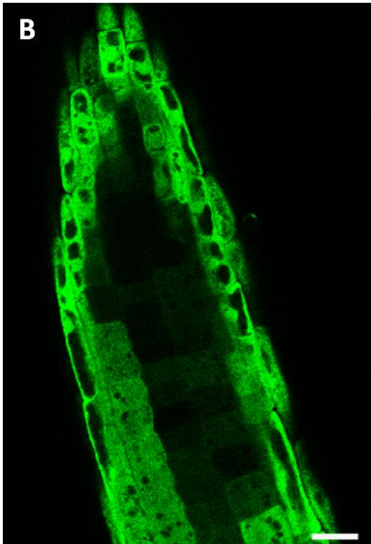
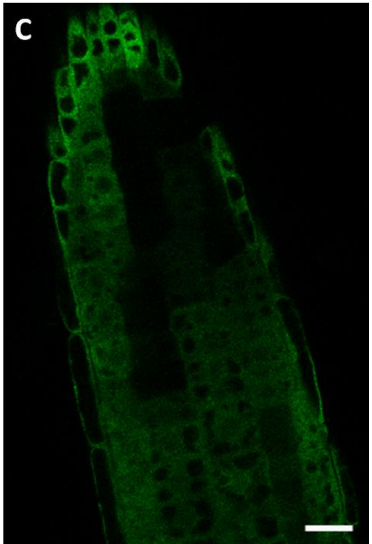


6.2.2.1 *In vivo* pozorování GFP-NtARPC2 rostlin – různé linie

Protože bylo získáno několik linií jak wt, tak *dis2-1* rostlin transformovaných GFP-NtARPC2 (7 pro wt, 43 pro *dis2-1*), bylo na náhodně vybraných liniích porovnáno, zda struktury pozorované po expresi transgenů jsou u všech linií stejné. Za standardizovaných podmínek (stejně nastavení konfokálního mikroskopu, stejné kultivační podmínky, stejné místo snímání) bylo porovnáno nejprve osm linií *dis2-1* GFP-NtARPC2 (linie 1 až 8) a poté orientačně i dvě linie wt GFP-NtARPC2 (linie 1 a 5). Bylo zjištěno, že jednotlivé linie se mezi sebou liší v intenzitě signálu, v množství teček a v chimeričnosti celkového signálu, viz **obr. 12**. Chimeričností se míní rozdíl mezi charakteristikami signálu (zejména jeho intenzitou) mezi jednotlivými buňkami stejného pletiva stejné rostliny. Mezi velikostí či lokalizací teček rozdíly zaznamenány nebyly. V další práci pak, pokud není řečeno jinak, byla pro wt i *dis2-1* GFP-NtARPC2

rostliny používána linie 1, protože tyto linie vykazovaly nejsilnější signál GFP, nejvíce teček a žádnou chimeričnost.

	nesvítí	svítí málo	svítí dost	svítí chimericky a málo	svítí chimericky a dost
linie 1			4 (4, 0)		
linie 2	1	3 (2, 1)			
linie 3				1 (1, 0)	3 (3, 0)
linie 4				2 (1, 1)	2 (0, 2)
linie 5	1		1 (0, 1)		2 (0, 2)
linie 6				4 (1, 3)	
linie 7	2		1 (1, 0)	1 (1, 0)	
linie 8					4 (0, 4)

Obr. 12 Tabulka - porovnání signálu různých linií rostlin *dis2-1 Arabidopsis*, stabilně transformovaných konstruktem GFP-NtArpC2 a indukovaných 2 μ M estradiolem, pozorováno za standardizovaných podmínek. V závorce je celkový počet rostlin v dané kategorii vždy rozdělen na rostliny s tečkami (první číslo) a bez teček (druhé číslo). **(A)** linie 1, nechimerická; **(B, C)** linie 6, chimerická. Měřítko = 20 μ m.

6.2.2.2 *In vivo pozorování GFP-NtARPC2 rostlin – různé podmínky*

Následující experimenty byly provedeny, aby bylo zjištěno, zda tečky nejsou výsledkem overexprese GFP-NtArpC2 a tedy zda lokalizace v pohyblivých tečkách není artefakt. Nejprve byly v prvním experimentu porovnány, opět za standartizovaných podmínek, čtyři skupiny transformovaných wt rostlin, konkrétně rostliny pěstované na 2 μ M estradiolu, 0,5 μ M estradiolu a rostliny pěstované bez estradiolu, přenesené na indukční medium (opět 2 μ M a 0,5 μ M estradiol) 29 hodin před pozorováním. Na rostlinách byly hodnoceny tři parametry: intenzita svícení, chimeričnost a přítomnost teček. Výsledky jsou shrnuty na **obr. 13**. Chimerické rostliny se zřejmě vyskytují

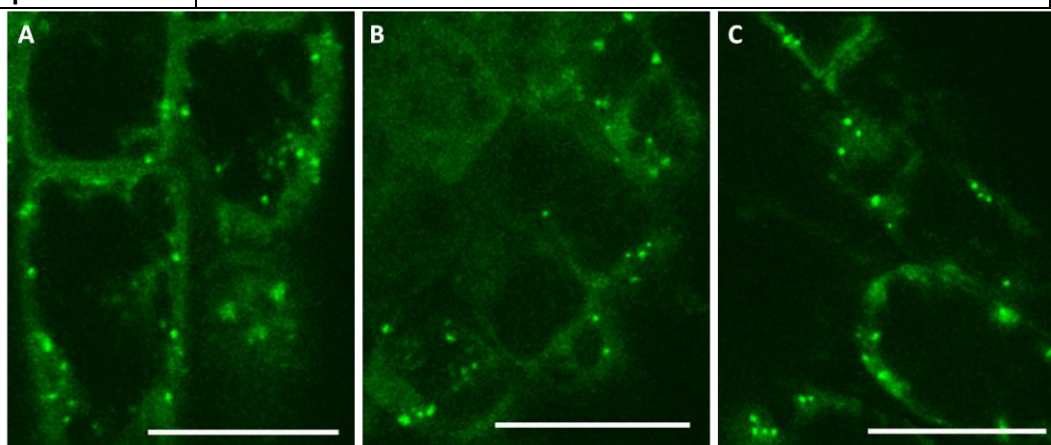
zejména při vystavení rostlin nižším koncentracím estradiolu po nižší dobu. V intenzitě svícení se mezi rostlinami nevyskytují žádné významnější rozdíly, použité koncentrace estradiolu byly zřejmě všechny příliš nízké, proto bylo při druhém experimentu využito jemnějšího rozlišení a nižších koncentrací. Dále se zdá, že tečky se tvoří až při delším působení estradiolu, nebo při působení estradiolu v časnějších fázích vývoje rostliny. Proto bylo ve třetím experimentu využito jemnějšího časového rozlišení.

CHIMERIČNOST	chimerické	nechimerické	
2 μM	17%	83%	
0,5 μM	17%	83%	
29 hod na 2 μM	0%	100%	
29 hod na 0,5 μM	42%	58%	
INTENZITA	svítí hodně	svítí středně	svítí málo
2 μM	8%	67%	25%
0,5 μM	10%	80%	10%
29 hod na 2 μM	25%	50%	25%
29 hod na 0,5 μM	25%	50%	25%
TEČKY	tečky přítomny hodně	tečky přítomny středně	tečky přítomny málo až vůbec
2 μM	8%	42%	50%
0,5 μM	25%	58%	17%
29 hod na 2 μM	0%	33%	67%
29 hod na 0,5 μM	0%	33%	67%

Obr. 13 Tabulka – porovnání signálu rostlin wt *Arabidopsis*, stabilně transformovaných konstruktem GFP-NtApc2, pozorováno za různých podmínek. Sledovány byly tři parametry – chimeričnost, intenzita svícení a přítomnost teček. V závorkách je uveden počet analyzovaných rostlin. Na základě informací o intenzitě svícení byl proveden druhý experiment (viz **obr. 14**), na základě informací o přítomnosti teček byl proveden třetí experiment (viz **obr. 16**). Každá varianta (tj. řádek) byla testována na 12 rostlinách.

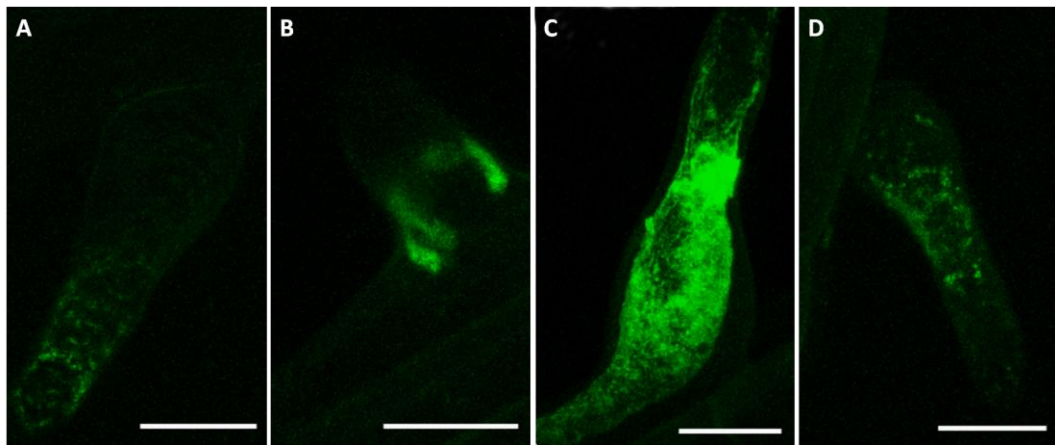
Ve druhém experimentu byly využity wt (linie 1) i *dis2-1* (linie 4) transformované rostliny, ale všechny byly pěstovány od začátku na indukčních mediích (0M, 0,01 μM, 0,05 μM, 0,1 μM a 0,5 μM estradiol). Hodnocena byla přítomnost teček v buňkách, výsledky jsou shrnuty na **obr. 14**. Vyplývá z nich, že se snižující se koncentrací estradiolu se snižuje podíl buněk, které dávají jasný signál s tečkami až k úplnému vymizení signálu v případě *dis2-1* rostlin a k jeho snížení u wt rostlin. Dále bylo zjištěno, že *dis2-1* rostliny přestávají svítit už při mnohem vyšších koncentracích než wt rostliny. Tečky ovšem nikdy nemizí rychleji než celkový signál, omezení overexprese nevede k vymizení teček.

	silně svítí pozadí i tečky	pozadí málo, svítí jen tečky	pozadí málo, bez teček	nesvítí
wt				
0,5μM (6)	100%			
0,1μM (8)	60%		40%	
0,05μM (9)	80%			20%
0,01μM (6)	15%	30%	30%	15%
0μM (2)				100%
dis2-1				
0,5μM (7)		30%	70%	
0,1μM (7)			60%	40%
0,05μM (9)				100%
0,01μM	neanalyzováno			
0μM				



Obr. 14 Tabulka – porovnání signálu rostlin wt i *dis2-1 Arabidopsis*, stabilně transformovaných konstruktem GFP-NtArpC2, pozorováno za různých podmínek. Pro *dis2-1* byla použita linie 4. V závorkách je uveden počet analyzovaných rostlin. **(A)** elongační zóna kořene wt GFP-NtArpC2, indukce 0,5μM estradiolem, **(B)** elongační zóna kořene wt GFP-NtArpC2, indukce 0,05μM estradiolem, **(C)** elongační zóna kořene wt GFP-NtArpC2, indukce 0,01μM estradiolem. Měřítka = 20 μm.

V třetím experimentu byly využity wt transformované rostliny indukované na začátku experimentu 2 μM estradiolem a pak sledované po 15 minutách. Hypotéza, že tečky se tvoří až po delší expozici estradiolu, byla podpořena výsledkem z prvního experimentu, v němž se tečky v rostlinách, vystavených indukci po krátkou dobu, netvořily, viz **obr. 15**. Bylo předpokládáno, že v období mezi počátkem indukce a vytvořením teček by se mohl vyskytnout i jiný signál než tečky.

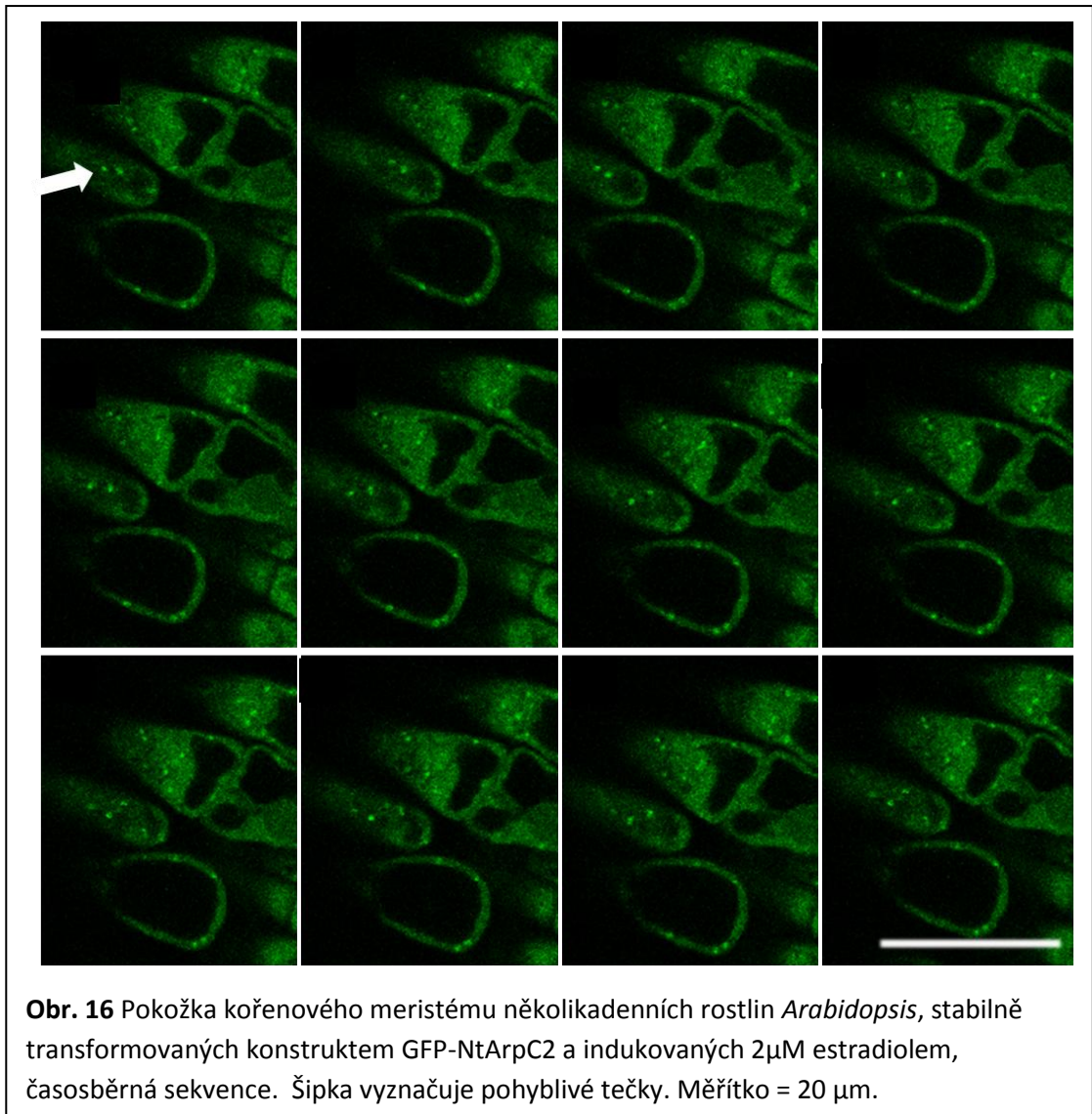


Obr. 15 Kořenové vlásky několikadenních rostlin *Arabidopsis*, stabilně transformovaných konstruktem GFP-NtArpC2 a indukovaných 2 μ M estradiolem, vždy maximální projekce 15 optických řezů: **(A)** indukce po dobu 75 minut, první tečky, **(B)** indukce po dobu 105 minut, jasně vyznačen prstenec okolo špičky rodícího se kořenového vlásku, **(C)** indukce po dobu 120 minut, velmi jasný signál, **(D)** indukce po dobu 150 minut, tečky pod plasmatickou membránou ve formě kruhů. Měřítka = 20 μ m.

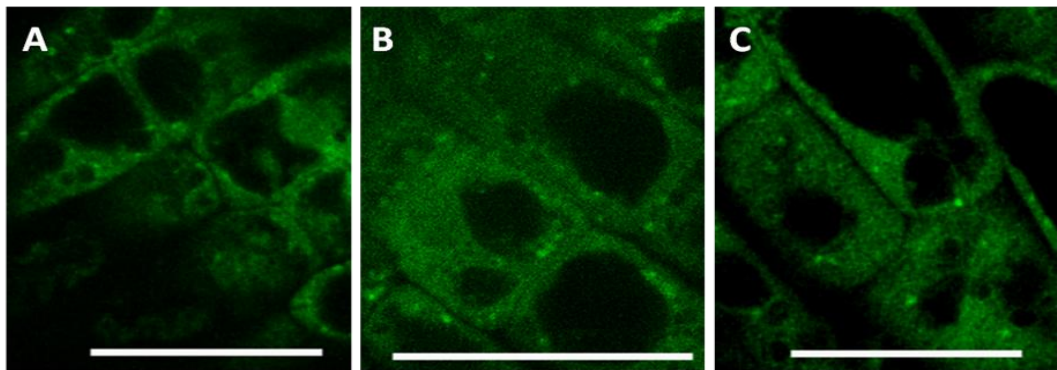
Navrhovaná hypotéza se ovšem nepotvrdila – tečky (i když ojedinělé) se objevily zároveň s difusním signálem, který sice s delším působením estradiolu sílil, nebyl však pozorován jiný signál než tečky a difusní signál. Přednostně byl signál zaznamenán v kořenových vláskách (nejdříve a nejsilněji), viz **obr. 15A, C**. Byl získán obrázek velmi mladého kořenového vlásku, kolem jehož rodící se špičky je jasný signál, viz **obr. 15B**, a obrázek staršího rostoucího kořenového vlásku, v němž se signál drží stále na plasmatické membráně u špičky, což dělá na složeném snímku dojem kruhů, viz **obr. 15D**. Tento vzor je patrný také na optickém řezu špičkou kořenového vlásku na **obr. 15A**. Zároveň bylo zjištěno, že první signál se objevuje už asi po hodině, což svědčí pro rychlou odpověď rostliny na indukci.

6.2.2.3 *In vivo* pozorování GFP-NtARPC2 rostlin - pohyb

Pomocí časosběrných sekvencí bylo zjištěno, že tečky jsou motilní, viz **obr. 16**. Motilita teček mezi *dis* a *wt* rostlinami se nelišila.



Po ošetření rostlin latrunkulinem B (váže se k aktinovým monomerům a zabraňuje jejich polymeraci do vlákna, je tedy depolymerující cytoskeletární drogou) bylo zjištěno, že existence teček není na přítomnosti funkčního cytoskeletu závislá, viz **obr. 17**. V charakteru, množství, velikosti, lokalizaci atd. nebyly mezi rostlinami ošetřenými latrunkulinem a neošetřenými pozorovány žádné rozdíly, motilita teček však na aktinovém cytoskeletu závislá je, v ošetřených rostlinách ustal při porovnání s kontrolou veškerý pohyb signálu. Zdá se tedy, že tečky by mohly kolokalizovat s cytoskeletem, vzhledem k tomu, že jejich pohyb je na něm závislý. Bylo tedy přistoupeno k imunofluorescenční vizualizaci cytoskeletu za účelem zjištění možné kolokalizace teček s cytoskeletem.



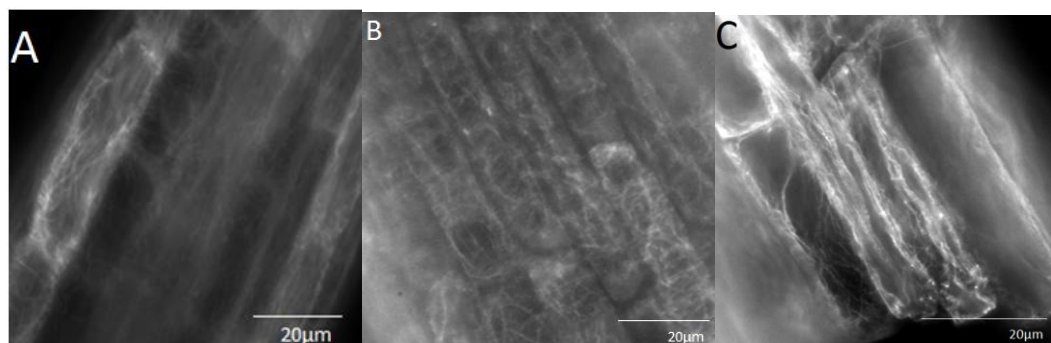
Obr. 17 (A, B, C) Pokožka elongační zóny kořene několikadenních rostlin *Arabidopsis*, stabilně transformovaných konstruktem GFP-NtArpC2 a indukovaných 2 μ M estradiolem, ošetřeno latrunkulinem. Měřítko = 20 μ m.

6.2.3 Imunofluorescence – optimalizace protokolu

Aby bylo možné studovat kolokalizaci pozorovaných teček s cytoskeletem, bylo rozhodnuto vizualizovat cytoskelet imunofluorescenční metodou. Bylo provedeno několik experimentů s cílem optimalizovat metodu, konkrétně tyto modifikace základního protokolu:

- 2 % PFA (paraformaldehyd) ve fixáži II
- 3,7 % PFA ve fixáži II
- vakuová infiltrace (0,5 atm) ve fixáži II po dobu 20 minut

Aktin byl značen primární protilátkou mouse anti-actin a pozorován na mikroskopu Provis (viz **obr. 18**) a na konfokálním mikroskopu (viz **obr. 19**).



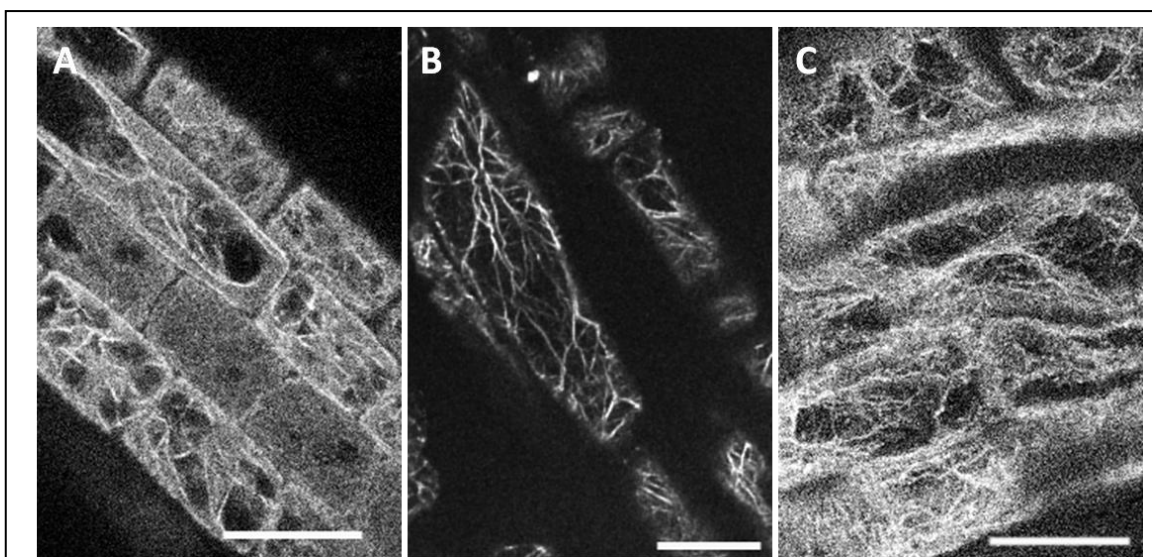
Obr. 18 Imunofluorescenční vizualizace aktinových mikrofilament dle základního protokolu. Buňky pokožky elongační zóny kořene, pozorováno fluorescenčním mikroskopem Provis.

Základní protokol dobře vizualizoval aktinová filamenta zejména v buňkách rhizodermis kořenového meristému i elongační zóny. Ve vzorcích podrobených vakuové infiltraci či zvýšené koncentraci paraformaldehydu nebyly zaznamenány

významnější rozdíly oproti kontrolní variantě, bylo tedy rozhodnuto v dalších experimentech používat základní protokol.

V kořenových vláscích, listech a listových trichomech se aktin vizualizovat nepodařilo, nebo jen zcela ojediněle. Kořenové vlásky jsou zřejmě poškozovány zejména manipulací s rostlinami během jejich vyjímání z kultivační misky. Vyřešení tohoto problému by si vyžádalo jiný způsob pěstování rostlin, proto se další práce soustředila na vizualizaci aktinu v listové epidermis. Zde zřejmě brání úspěšné vizualizaci zejména kutikula a pevnější buněčná stěna (protože v ojedinělých případech, kdy se aktin v listech podařilo vizualizovat, to bylo obvykle v poškozených strukturách), proto bylo vyzkoušeno několik cest, jak aktin v listech vizualizovat:

- 0,5 %, 2 %, 3 %, 4 % či 5 % celuláza během enzymace
- 0,5 %, či 1,5 % pektolyáza během enzymace
- použití dospělých nastříhaných listů (proužky 3mm x 2cm), namísto semenáčků
- použití dospělých mrazově rozlámaných listů (list zmražen v tekutém dusíku a narušen přitlačením mezi dvěma skly v polovině působení fixáže II)



Obr. 19 (A) Pokožka elongační zóny kořene wt rostlin *Arabidopsis*, značeno sekundární protilátkou Alexa 555 **(B)** a Alexa 488, **(C)** pokožka elongační zóny kořene *dis2-1* rostlin *Arabidopsis*, značeno sekundární protilátkou Alexa 555. Imunofluorescenční vizualizace aktinových mikrofilament dle základního protokolu, pozorováno na konfokálním mikroskopu. Měřítko = 20 μm .

Žádná z těchto metod však nevedla k úspěšné vizualizaci aktinových filament v listu, buď byly buňky narušené příliš a aktin zničený, nebo málo a protilátky nepronikly ke strukturám, které měly značit. Pro další studium byla tedy vybrána oblast kořenové špičky – malé, ještě neelongované buňky pokožce kořene, cca 200 μm za

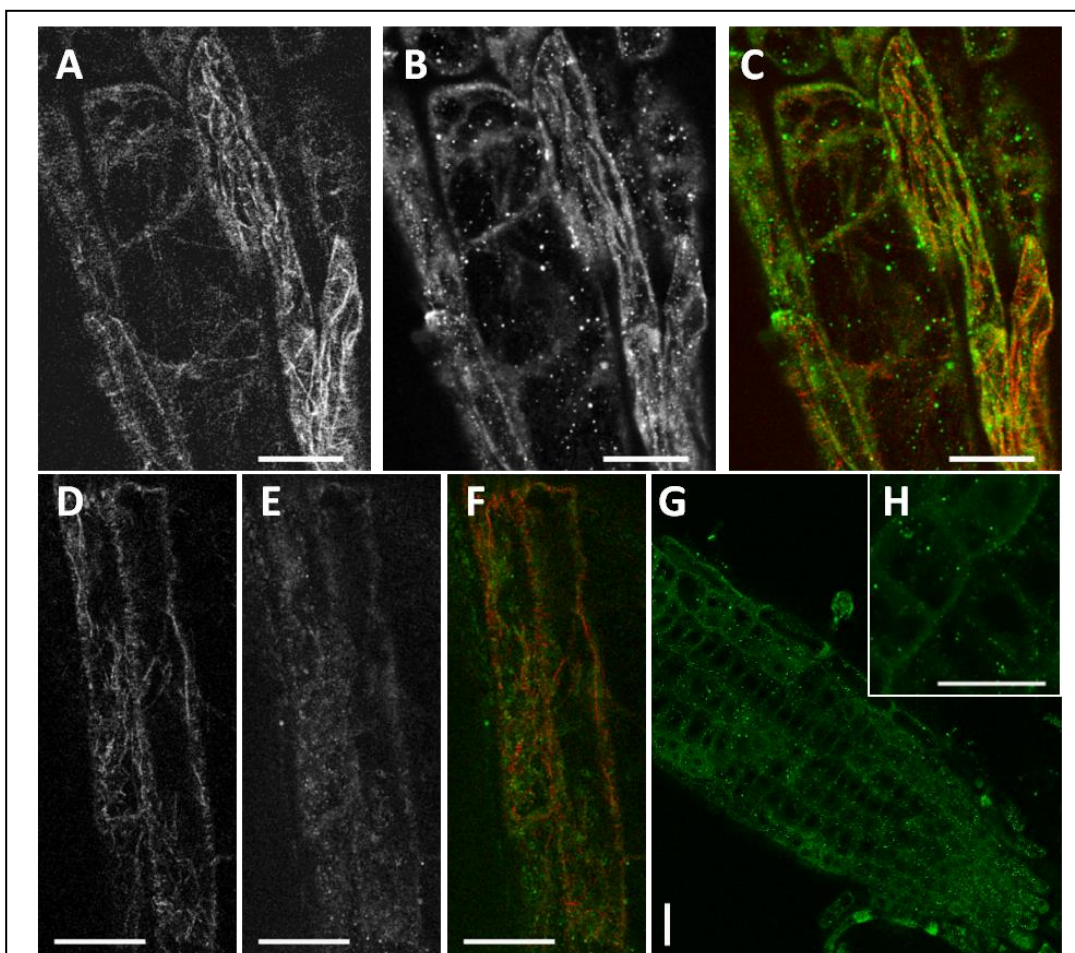
kořenovou špičkou. Tento výběr byl proveden i proto, že z předběžných experimentů již bylo známo, že právě v této oblasti je nejlépe vidět i GFP-NtARPC2, a proto, že v této oblasti se vyskytují malé, ještě nefúzované vakuoly, a v průběhu práce se ukazovalo, že právě s fúzí vakuol ARPC2 možná souvisí.

Porovnáním výsledků z konfolálního a fluorescenčního mikroskopu bylo také zjištěno, že pouze výsledky z konfokálního mikroskopu dosahují požadované kvality, a proto bylo rozhodnuto v dalších experimentech použít pouze konfokální mikroskop.

Výše zmíněnou metodou (základní protokol, kořenový meristém, konfokální mikroskop) byl imunofluorescenčně značen aktinový i mikrotubulární cytoskelet, a to jak ve wt rostlinách, tak v *dis2-1* rostlinách, viz **obr. 19**. Dle literatury se aktin v *dis2-1* a wt rostlinách se liší, filamenta jsou aberantní, kratší, jsou orientována více náhodně (Schwab et al., 2003). Díky těmto výsledkům jsme ověřili, že používaný způsob vizualizace aktinu (základní protokol, kořenový meristém, konfokální mikroskop) je optimální. Dále bylo také ověřeno, že co se týče sekundární protilátky, jak Alexa 488, tak Alexa 555 funguje pro vizualizaci aktinu dobře.

6.2.4 Imunofluorescence - kolokalizace

Dále bylo provedeno dvojité značení vzorků, pomocí protilátek proti aktinu a proti podjednotkám ARP2/3 komplexu (ARP2, ARP3, ARPC2). Tyto vzorky byly pozorovány na konfokálním mikroskopu. Bylo zjištěno, že všechny tři protilátky fungují a značí podjednotky ARP2/3 komplexu jako tečky, jejichž signál je difusně rozptýlen v cytoplasmě. Kolokalizace s buněčnými strukturami nebyla zaznamenána,



Obr. 20 (A-C) Pokožka elongační zóny kořene wt rostlin *Arabidopsis*; **(A)** aktin **(B)** ArpC2, **(C)** složené kanály 9A a 9B.

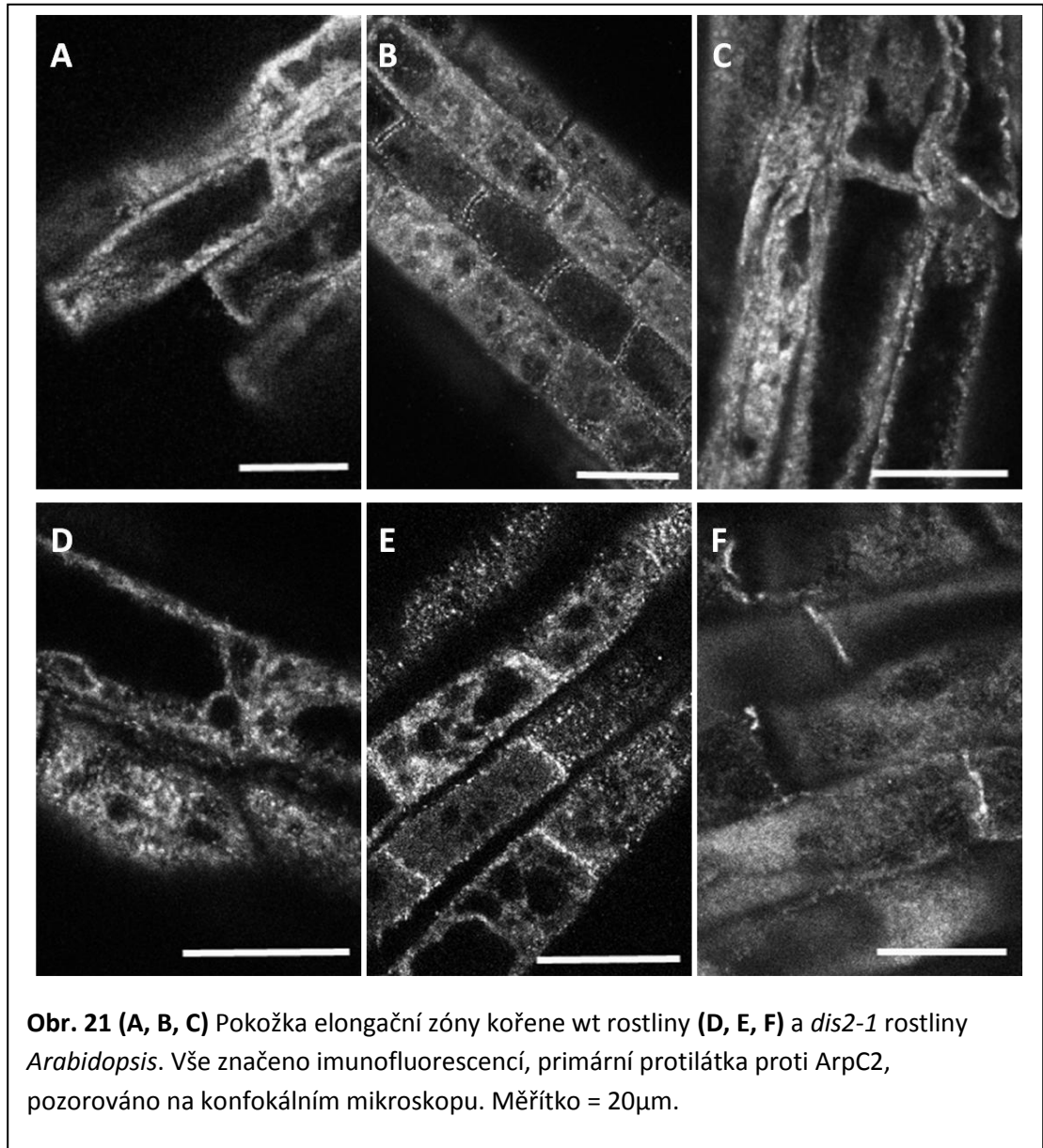
(D-F) Pokožka elongační zóny kořene wt rostlin *Arabidopsis*; **(D)** aktin, **(E)** Arp2, **(F)** složené kanály 9D a 9E.

(G-H) Pokožka elongační zóny kořene wt rostlin *Arabidopsis*, Arp3.

Vše značeno imunofluorescencí, pozorováno na konfokálním mikroskopu. Měřítka = 20 μ m.

pomocí dvojitého značení jsme se snažili detekovat kolokalizaci s aktinovým cytoskeletem, důkazy pro ni jsou ale spíše slabé, viz **obr. 20**. Tento experiment byl několikrát opakován, kolokalizaci aktinového cytoskeletu a ARPC2 v kořenovém

meristému wt rostlin fixovaných imunofluorescenční metodou se však nepodařilo nikdy spolehlivě prokázat.



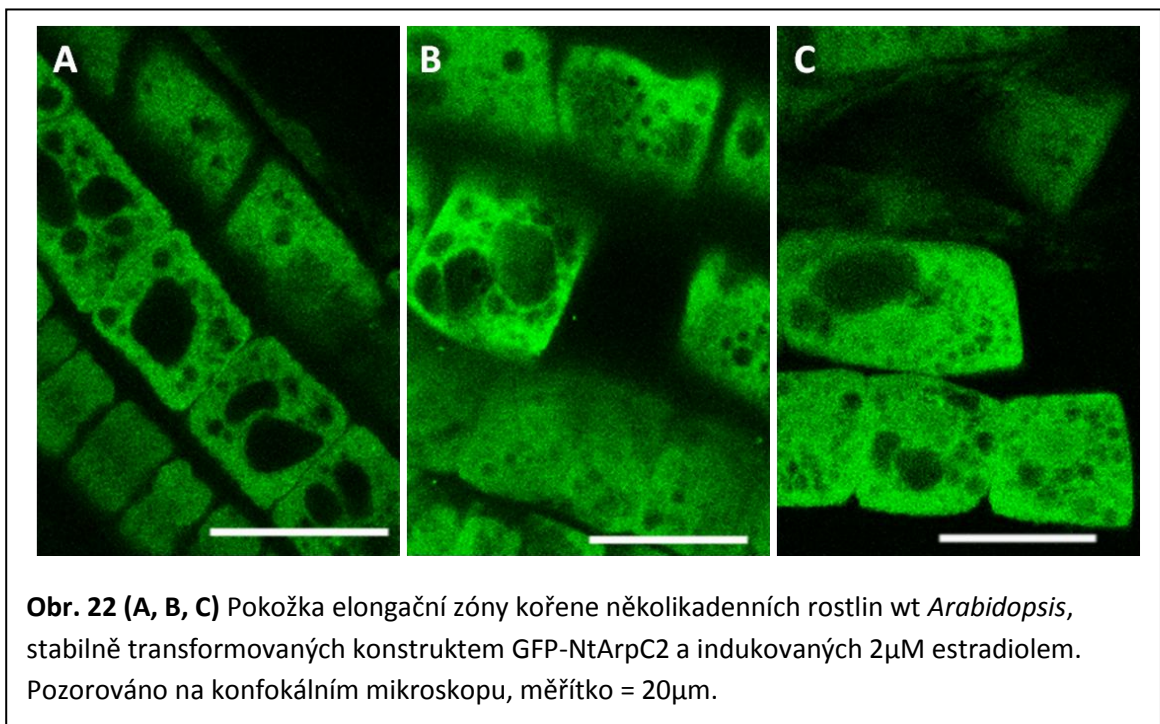
Obr. 21 (A, B, C) Pokožka elongační zóny kořene wt rostliny (**D, E, F**) a *dis2-1* rostliny *Arabidopsis*. Vše značeno imunofluorescencí, primární protilátka proti ArpC2, pozorováno na konfokálním mikroskopu. Měřítka = 20μm.

Dále bylo ověřováno, zda je anti-ARPC2 protilátka v rostlinách specifická. Pomocí protilátky rabbit anti-ARPC2 byly označeny wt a *dis2-1* rostliny. Protože *dis2-1* jsou mutantní rostliny, které neexprimují funkční ARPC2 protein (díky inzerci uvnitř mutantního genu je gen transkribován v přibližně stejné délce jako wt gen, při translaci však dochází k předčasnému ukončení translace (Saedler et al., 2004b)), neměl by v nich být patrný tečkovaný pattern jako ve wt rostlinách. Jak je z **obr. 21** zřejmé, wt i *dis2-1* rostliny vykazují stejný vzorec a protilátka tedy přinejmenším v rostlinách *Arabidopsis* specifická není a pro lokalizaci ARPC2 v buňkách ji nelze použít. Tento výsledek nebyl způsoben nespecifitou vazbou sekundární protilátky. Použitím pouze

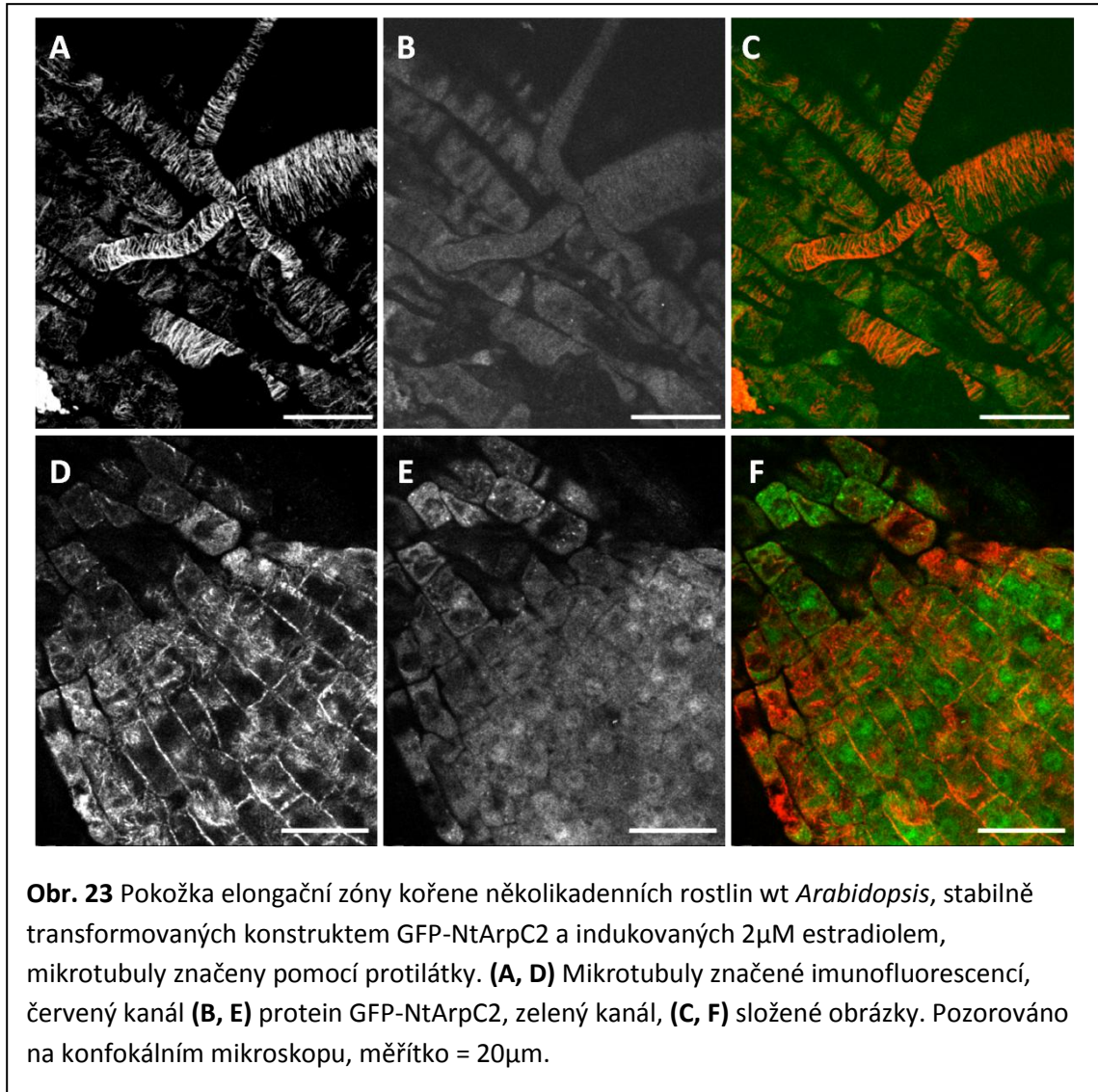
sekundárních protilátek (anti-rabbit Alexa 488, anti-rabbit Alexa 555, anti-mouse Alexa 555) nebyl nikdy detekován podobný signál, naopak, takto připravené preparáty neměly žádný signál.

Vzhledem k tomu, že nebylo možné použít protilátku anti-ARPC2 pro lokalizaci ARPC2 v rostlinách kvůli její nespecifitě, byly použity transformované GFP-NtARPC2 rostliny, a to jak pro pozorování *in vivo*, tak pro fixaci a následné značení aktinového i mikrotubulárního cytoskeletu imunofluorescencí. Tento postup umožňuje vizualizovat v jedné buňce aktin i ARPC2 a ověřit jiným způsobem, zda spolu tyto dvě struktury (tečky ARPC2 a aktinová vlákna) přece jen nekolokalizují.

Bylo ovšem zjištěno, že zřejmě vlivem fixační procedury (byla použita metodika pro vizualizaci cytoskeletu) se svítící tečky rozpadají a obvykle byl patrný pouze cytoplasmický difusní signál, u něhož nebylo možné určit, jestli s něčím kolokalizuje. Výjimečně se nějaké tečky zachovaly, ne ovšem v takové kvalitě a četnosti, aby se tento přístup dal použít, viz **obr. 22**. Za povšimnutí stojí i velké množství drobných vakuol, které jsou pro buňky kořenového meristému typické.

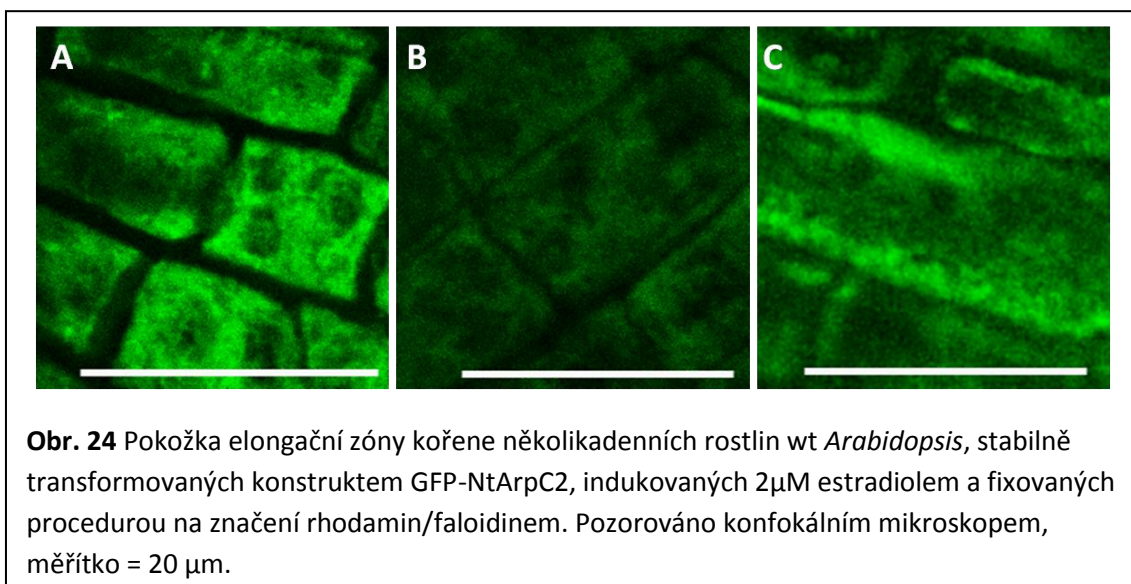


Kolokalizaci s mikrotubuly, viz **obr. 23**, se vzhledem k výše uvedeným skutečnostem nepodařilo potvrdit, nicméně z pozorování se zdá, že kortikální mikrotubuly a zachovalé tečky se nenacházejí ve stejné optické rovině.

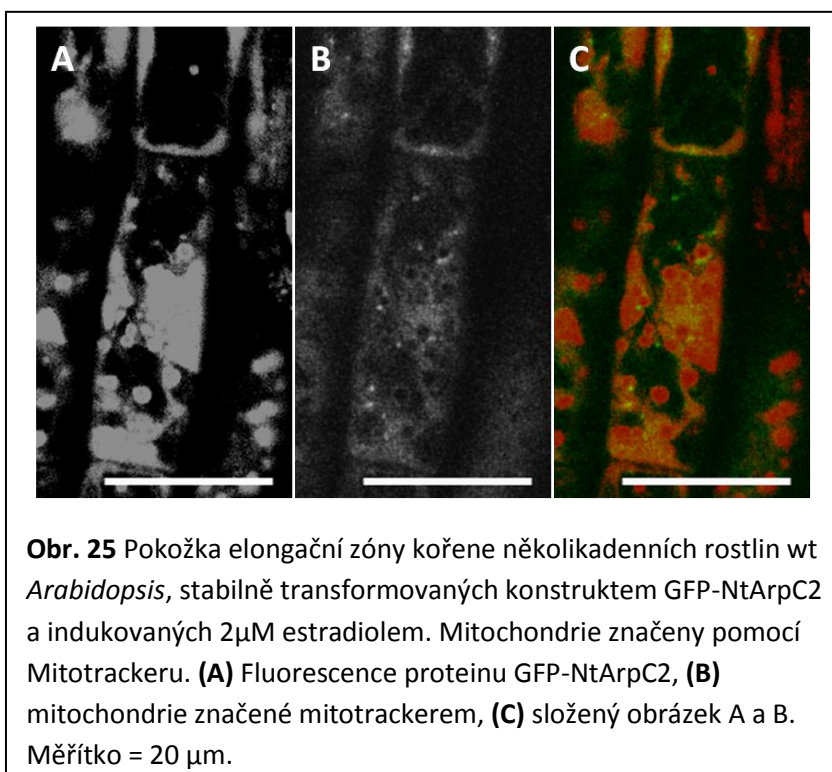


6.2.5 Další kolokalizace

Vzhledem k výše zmíněné nemožnosti vizualizovat tečky v rostlině fixované imunofluorescenční procedurou (ať už pomocí nativní fluorescence indukovaných rostlin, nebo pomocí protilátky), pokusili jsme se vizualizovat aktinový cytoskelet pomocí rhodamin/faloidinu v naději, že tato fixační procedura, která je šetrnější,

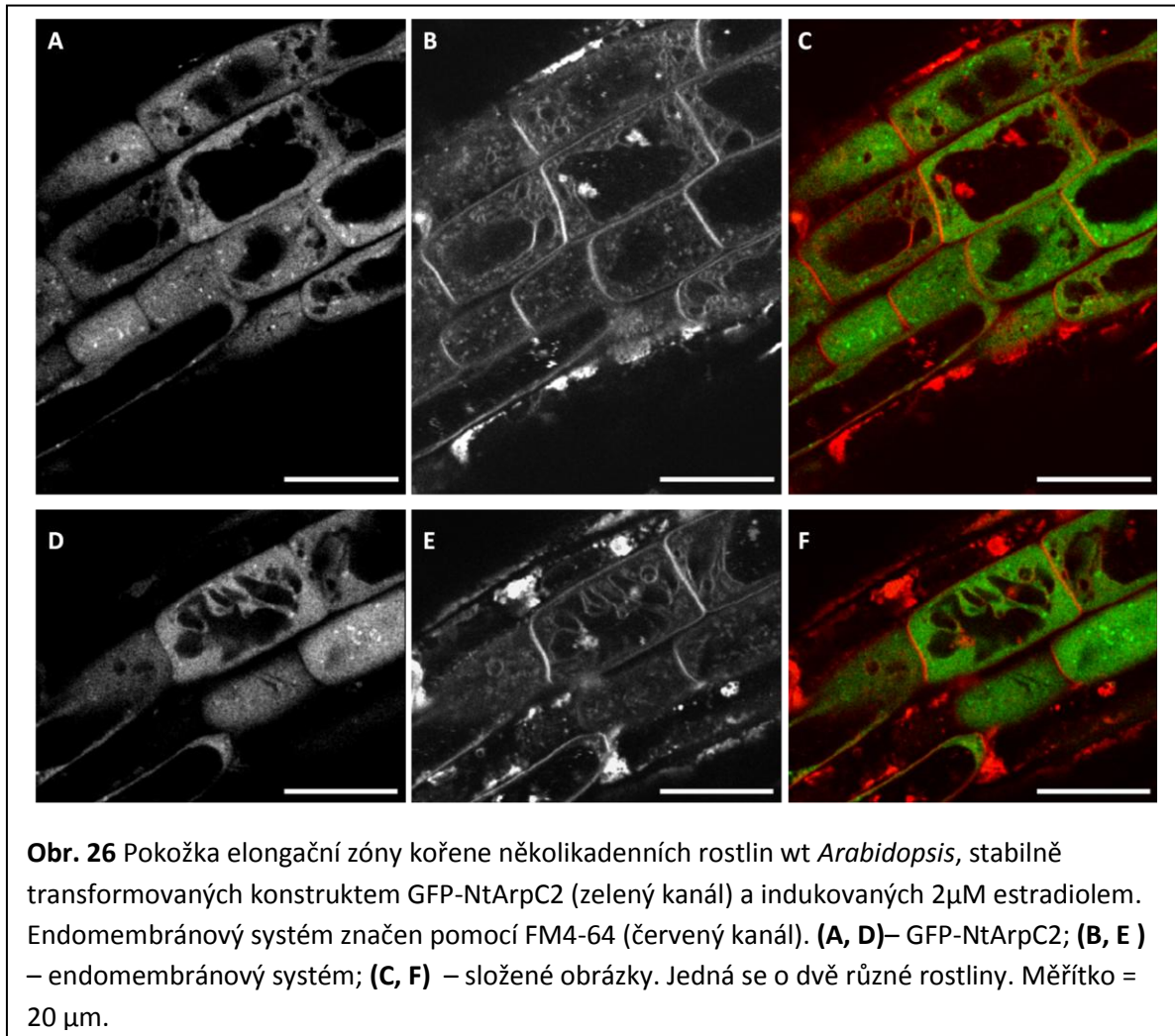


nezpůsobí rozpad teček. Bohužel, ukázalo se, že výsledky získané touto procedurou byly nikoliv lepší, ale horší než výsledky získané imunofluorescenční metodou; cytoskelet nebyl zřetelně vizualizován a procedura způsobovala taktéž rozpad teček, viz **obr. 24**.



Ošetření
rostlin
Mitotrackerem (látka
vizualizující
mitochondrie)
kolokalizaci
s mitochondriemi
nepotvrdila, viz **obr.
25**.

Ošetření
rostlin FM4-64 (látka
vizualizující
endomembránový
systém) kolokalizaci



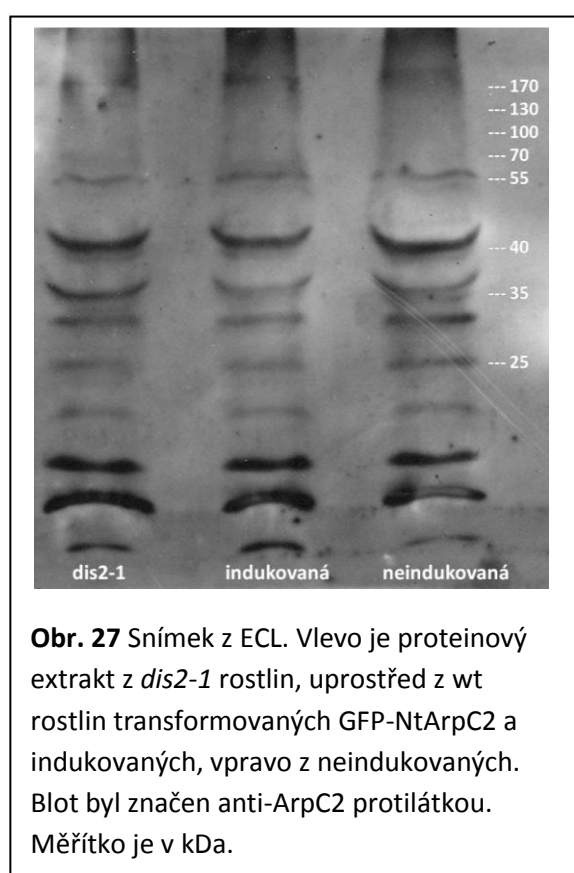
s endomembránami nepotvrdila, viz **obr. 26**

6.3 Proteiny

Cílem biochemických experimentů bylo ověřit, zda se fúzní GFP-NtARPC2 protein v rostlinách skutečně exprimuje a potvrdit tak mikroskopické výsledky, dále porovnat intenzitu exprese ve wt, *dis2-1* a transformovaných wt i *dis2-1* rostlinách. S přibývajícimi mikroskopickými výsledky získala na významu i snaha zjistit, zda fúzní protein není degradován např. vlivem proteáz, a zda protilátka proti NtARPC2, která se ukázala být nespecifická při mikroskopických pozorováních, je nespecifická i na blotech.

6.3.1 První extrakce proteinů

Nejprve byly proteiny izolovány z rostlin transformovaných *GFP-NtARPC2* (indukované i neindukované) a z *dis2-1* rostlin. Vzorek nebyl frakcionován, po přesrážení TCA byl nanesen na gel a přebloťován. Blokování blotu proběhlo při 37°C po dobu 1 hod. Na blotu byl detekován protein ARPC2 pomocí protilátky (1:500, inkubace přes noc ve 4°C, 150 mM NaCl, 4 ml TBS) a po inkubaci se sekundární protilátkou (1:1000) bylo provedeno ECL. Byl očekáván výrazný pruh v oblasti 65 kDa (ARPC2 má velikost zhruba 35 kDa, připojené GFP pak 29 kDa) ve vzorku izolovaném z indukovaných rostlin, slabší pruh o velikosti 35 kDa (pouze nativní ARPC2 o velikosti 35 kDa, bez připojeného GFP) ve vzorku z neindukovaných rostlin a žádný



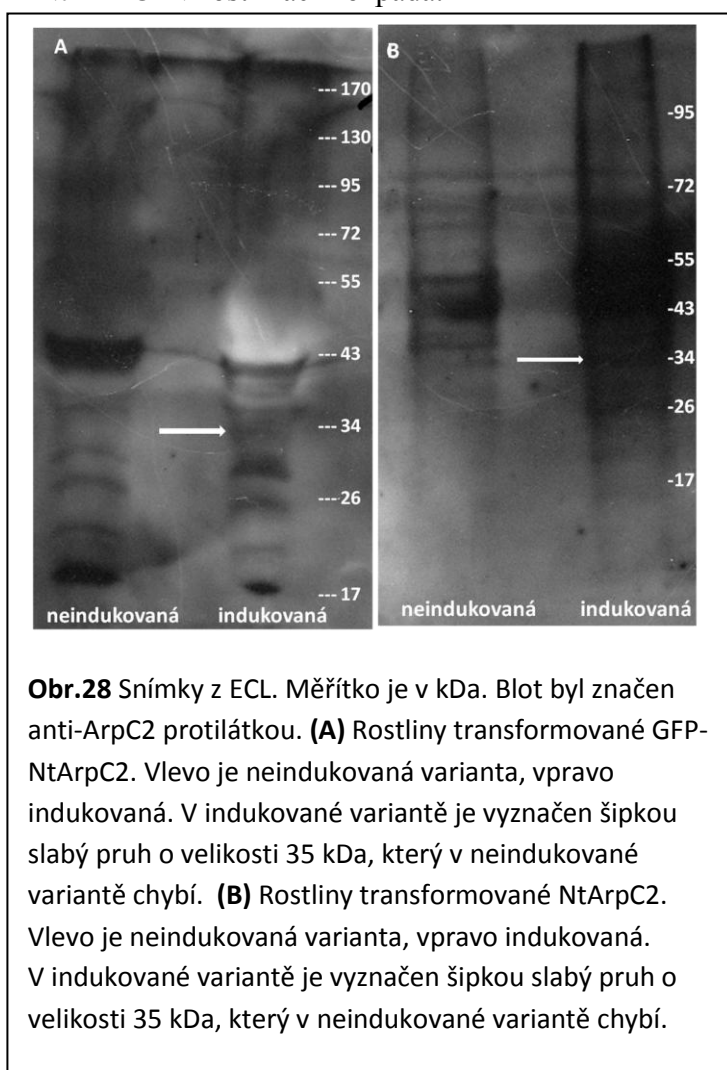
pruh ve vzorku z *dis2-1* rostlin. Jak je ovšem zřejmé z **obr. 27**, ve všech třech vzorcích byly označeny stejné pruhy, a to ve velkém množství a v neodpovídajících velikostech.

Blot byl tedy reprobován za odlišných podmínek (blokování při 4°C přes noc, primární protilátka 1:1000, 4 ml TBS, 150 mM NaCl, laboratorní teplota po dobu 1 hod, sekundární protilátka 1:1000), výsledek byl ovšem podobný, opět bylo zjištěno velké množství nespecificky značených pruhů (tentokrát ovšem díky změněným podmínkám o něco menší) které byly totožné ve všech vzorcích.

Protože z výsledků mikroskopických experimentů bylo známo, že protein se v rostlinách exprimuje, byly neuspokojivé výsledky přičteny chybě metody či nespecifitě použité anti-ARPC2 protilátky nejen *in situ*, ale i na blotech, proto byl experiment opakován, aby bylo možné zjistit, zda se protein v rostlinách rozpadá či nikoli, a zda je anti-ARPC2 protilátka opravdu nespecifická i na blotech.

6.3.2 Druhá extrakce proteinů

Byla tedy provedena další extrakce proteinů, tentokrát z rostlin transformovaných *GFP-NtARPC2* i *NtARPC2* (indukovaných i neindukovaných). Vzorky nebyly frakcionovány, byly přesráženy TCA, naneseny na gel a přeblotovány. Bylo provedeno blokování (1 hod při 37°C), inkubace s primární protilátkou (1:1000, 8 ml TBS, 150 mM NaCl, přes noc v 4°C) a se sekundární protilátkou (1:2000) a ECL. Bylo zjištěno, že tyto podmínky jsou ze všech vyzkoušených zatím neoptimálnější. Získané výsledky, viz **obr. 28A**, ukazují silný pruh v oblasti o velikosti 43 kDa. Tento pruh se nepodařilo identifikovat, zřejmě půjde o nějakou hojně exprimovanou bílkovinu. Při bližším pohledu je na indukované variantě zřetelný pruh o velikosti 35 kDa, tedy o velikosti ARPC2, bez připojeného GFP. Tento výsledek by znamenal, že se fúzní protein GFP-NtARPC2 v rostlinách rozpadá.



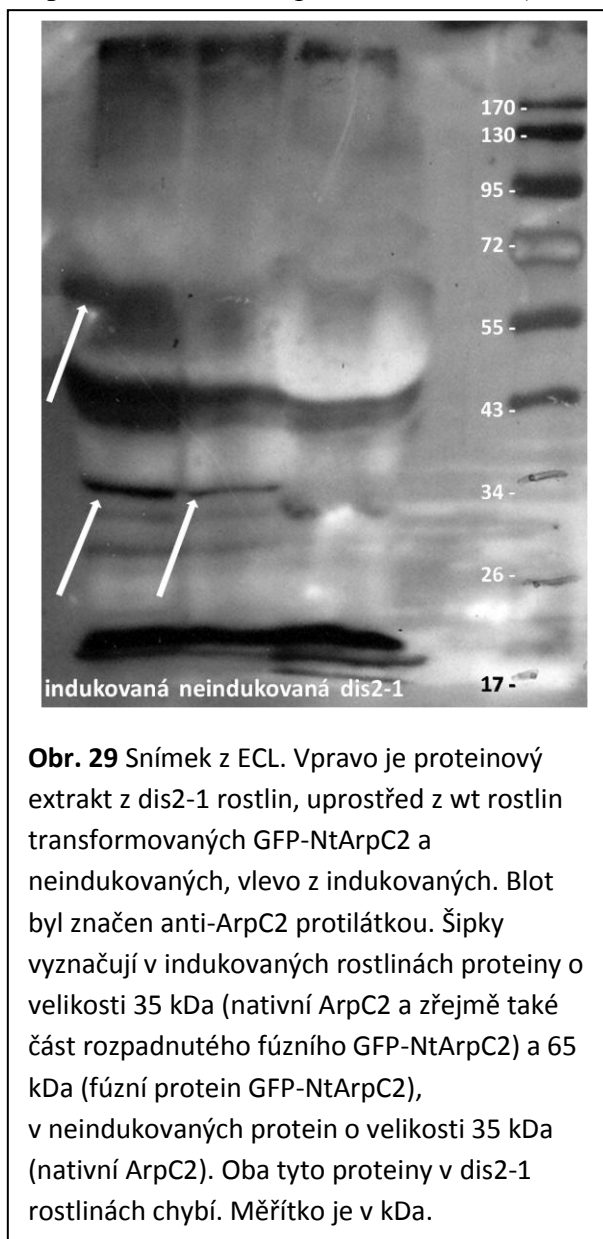
Obr. 28B pak ukazuje výsledek ECL provedeného na extraktu z rostlin transformovaných pouze NtARPC2, bez GFP. Na těchto rostlinách lze očekávat pruh o velikosti 35 kDa v indukované variantě a slabší až žádný pruh stejné velikosti v neindukované variantě. Tyto výsledky byly získány a potvrdily, že používaná protilátka je částečně funkční alespoň na blotu, i když specifita je spíše malá.

6.3.3 Třetí extrakce proteinů

Tentokrát byl proteinový extrakt z rostlin (*dis2-1*, wt transformovaný *GFP-NtARPC2*

– indukovaná i neindukovaná varianta) frakcionován na solubilní i mikrosomální frakci, aby se snížilo množství proteinů na jednotlivém blotu a ubylo nespecifických pruhů.

Solubilní frakce byla podrobena TCA precipitaci a obě frakce pak byly nanесeny na gel a přebloťovány. Na blotu byl opět detekován ARPC2 protein (blokování přes noc v 4°C, primární protilátka 1:1000 v 8 ml TBS se 150 mM NaCl po dobu 1 hod při laboratorní teplotě, sekundární protilátka 1:2000). Tento experiment poskytl dosud nejjasnější



Obr. 29 Snímek z ECL. Vpravo je proteinový extrakt z *dis2-1* rostlin, uprostřed z wt rostlin transformovaných GFP-NtArpC2 a neindukovaných, vlevo z indukovaných. Blot byl značen anti-ArpC2 protilátkou. Šipky vyznačují v indukovaných rostlinách proteiny o velikosti 35 kDa (nativní ArpC2 a zřejmě také část rozpadnutého fúzního GFP-NtArpC2) a 65 kDa (fúzní protein GFP-NtArpC2), v neindukovaných protein o velikosti 35 kDa (nativní ArpC2). Oba tyto proteiny v *dis2-1* rostlinách chybí. Měřítka je v kDa.

obrázek, viz **obr. 29**. V mikrosomální frakci jsou u indukovaných rostlin zřetelné dva pruhy, jeden o velikosti 65 kDa, jeden o velikosti 35 kDa. Větší protein je zřejmě fúzní GFP-NtARPC2, menší je částečně nativní ARPC2, částečně NtARPC2 pocházející ze zřejmě se rozpadajícího se GFP-NtARPC2. U neindukovaných rostlin je zřetelný pouze pruh o velikosti 35 kDa, který zřejmě představuje nativní ARPC2. U *dis2-1* rostlin oba proteiny chybí. Protein se vyskytuje převážně v mikrosomální frakci.

Zejména kvůli podezření, že GFP by se mohlo rozpadat vlivem vysokých teplot při rozpouštění peletu vzniklého TCA precipitací, byla provedena další extrakce z rostlin, proteiny byly frakcionovány, avšak byla použita acetonová precipitace proteinů místo TCA postupu. Výsledky byly porovnatelné s výsledky, kde byly

proteiny precipitovány TCA.

6.3.4 Detekce GFP

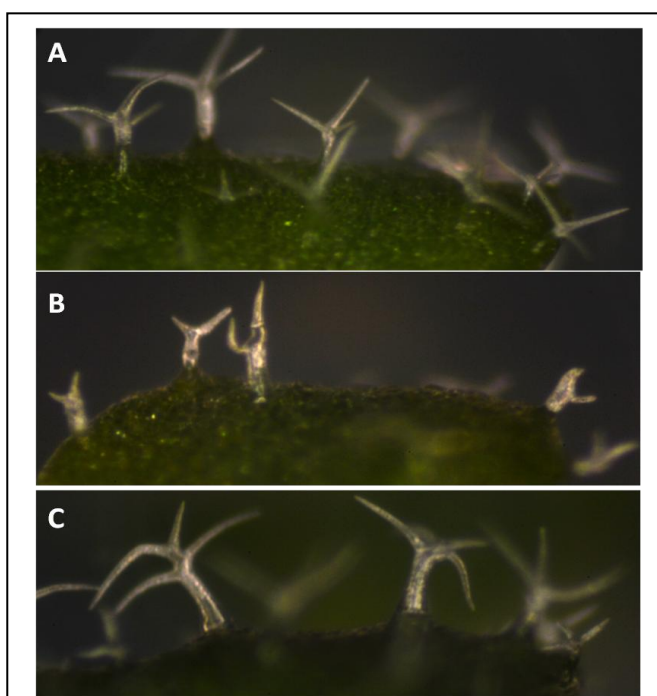
Několikrát bylo také za různých podmínek na různých blotech z různých extrakcí detekováno GFP. Nikdy se ovšem nepodařilo na takto značených blotech získat signál. Tyto výsledky lze přičíst špatné primární či sekundární protilátce proti GFP, případně porušením GFP během zahřátí při rozpouštění peletu vzniklého TCA precipitací.

Optimalizovat protokol tak, aby bylo možné GFP detekovat, se ovšem z časových důvodů nepodařilo.

6.4 Rescue experimenty

6.4.1 Trichomy

Při rescue experimentech byly *dis2-1* rostliny transformovány vektory obsahujícími GFP-NtARPC2 a NtARPC2 (detailněji viz sekce klonování). Popsaným postupem se podařilo získat 43 linií *dis2-1 Arabidopsis* s vloženým *GFP-NtARPC2* konstruktem a 38 linií *dis2-1 Arabidopsis* s vloženým *NtARPC2* konstruktem. Tyto rostliny pak byly vysévány na indukční i neindukční media a byl u nich hodnocen fenotyp listových

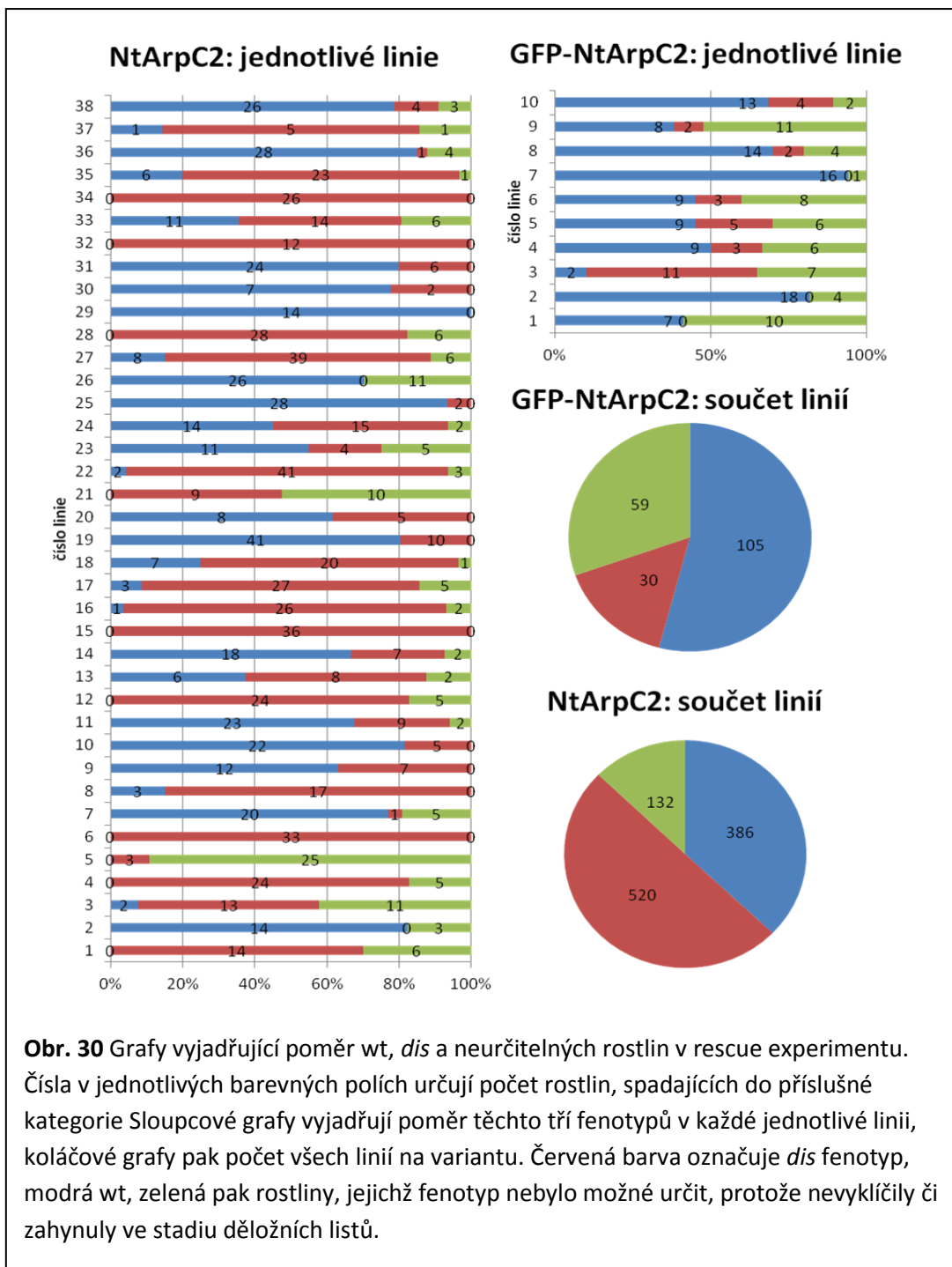


Obr. 31 (A) Snímek wt trichomů, **(B)** snímek *dis2-1* trichomů **(C)** snímek *dis2-1* trichomů, komplementovaného konstruktem GFP-NtArpC2.

trichomů. Pokud vnesený protein mutantní fenotyp komplementoval, byly trichomy podobné trichomům wt (tj. rescue), v opačném případě byly trichomy zakrnělé a deformované („*distorted*“ trichomy).

Bylo využito 10 linií *dis 2-1* transformovaných *GFP-NtARPC2* a všech 38 linií *dis2-1* transformovaných *NtARPC2*. Ze statistického zpracování záchrany fenotypu v obou liniích exprese transgenního proteinu lze uzavřít, že jak tabákový protein, tak tabákový protein fúzovaný s GFP dokáže zvrátit mutantní fenotyp *dis2-1* u rostlin *Arabidopsis thaliana*, viz **obr.**

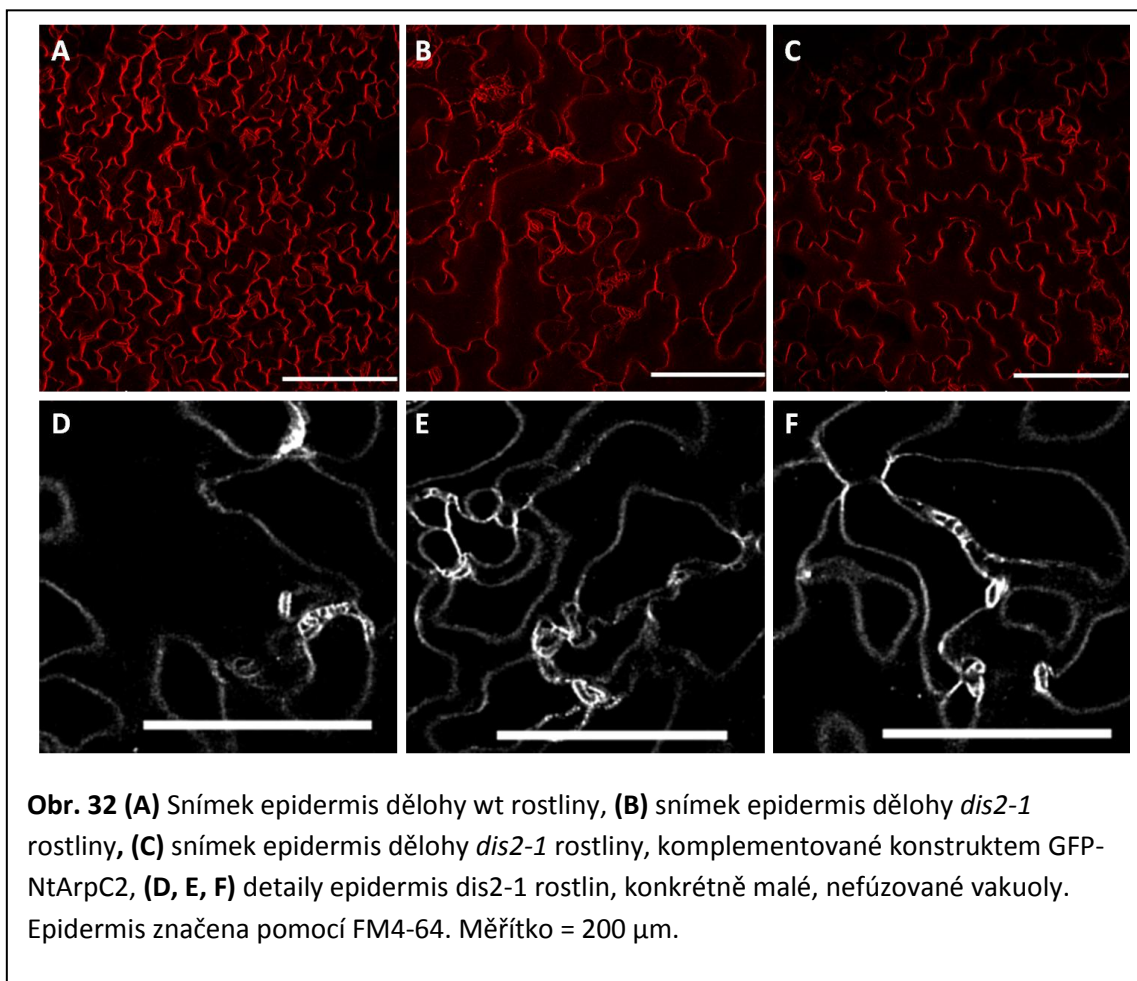
30. Snímky wt, deformovaných a rescue trichomů jsou na **obr. 31.**



Obr. 30 Grafy vyjadřující poměr wt, *dis* a neurčitelných rostlin v rescue experimentu. Čísla v jednotlivých barevných polích určují počet rostlin, spadajících do příslušné kategorie Sloupcové grafy vyjadřují poměr těchto tří fenotypů v každé jednotlivé linii, koláčové grafy pak počet všech linií na variantu. Červená barva označuje *dis* fenotyp, modrá wt, zelená pak rostliny, jejichž fenotyp nebylo možné určit, protože nevyklíčily či zahynuly ve stadiu děložních listů.

6.4.2 Listová epidermis

Protože ARP2/3 komplex hraje zřejmě významnou roli při formování laloků epidermálních buněk (Panteris and Galatis, 2005), byl porovnán tvar a celkový fenotyp epidermálních buněk děložních listů wt, *dis2-1*, a rescue rostlin, viz **obr. 32**. Bylo zjištěno, že *dis2-1* rostliny mají oproti wt rostlinám méně lalokovité a členité buňky, navíc dochází zřejmě k problémům s fúzí vakuol, protože v mutovaných rostlinách je možné pozorovat velké množství drobných vakuol při okrajích buněk a v rozích.

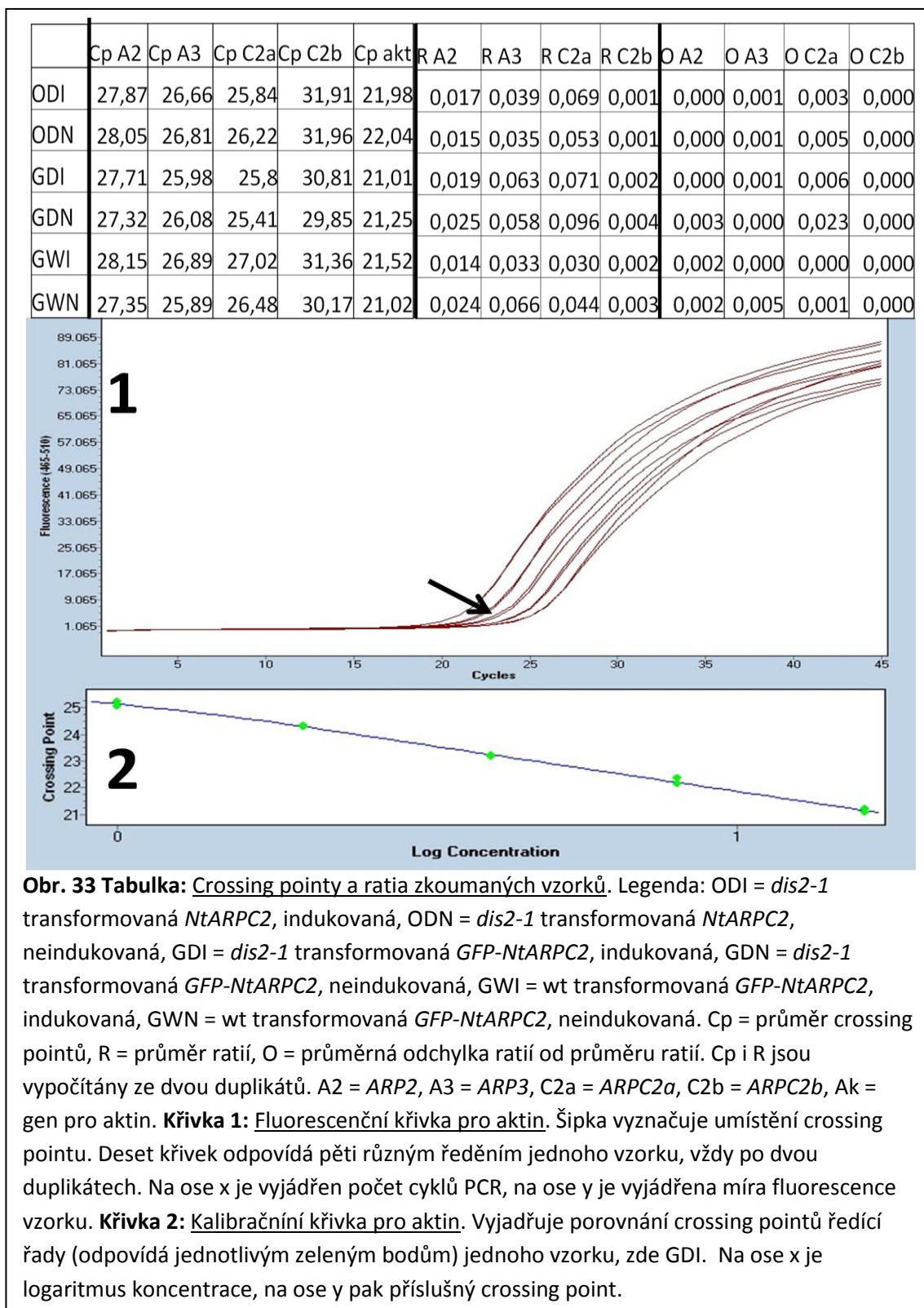


Rescue rostliny se svým fenotypem podobají spíše wt rostlinám, tedy i v oblasti fenotypu epidermálních buněk tabákový protein fúzovaný s GFP dokáže zvrátit mutantní fenotyp *dis2-1* u rostlin *Arabidopsis thaliana*.

6.5 qRT-PCR

Na šesti rostlinách (*dis2-1* exprimující *GFP-NtARPC2* i *NtARPC2*, wt transformovaná *GFP-NtARPC2*, vše v indukované i neindukované variantě) byla zkoumána míra exprese vybraných pěti genů kódujících podjednotky komplexu (*ARP2*, *ARP3*, *ARPC2a*, *ARPC2b*, aktin) v závislosti na expresi nově vneseného genu. Cílem bylo prozkoumat možné změny exprese ostatních podjednotek ARP2/3 komplexu vlivem overexprese ARPC2.

Při qRT-PCR byla v každém z šesti vzorků provedena PCR reakce s použitím fluorescenčně značených nukleotidů (podrobněji viz Materiál a metody). Na obr. 33 je



možno vidět crossing pointy a ratia zkoumaných vzorků. *ARPC2b* je exprimována odlišně, a to velmi slabě (crossing point je vysoký), a to u všech vzorků. *ARPC2b* je však minoritní

podjednotkou, která je v porovnání s *ARPC2a* exprimována slabě, proto tento výsledek není překvapivý, ačkoli potvrzuje spolehlivost experimentu. Dále, v rozporu s očekáváním je ARPC2 přítomen i v neindukovaných *dis2-1* rostlinách, které funkční protein ARPC2 vůbec nemají.

Míra exprese většiny podjednotek vyjádřená crossing pointy je srovnatelná u všech vzorků, nebylo zaznamenáno snížení/zvýšení hladiny transkriptů. Je-li však exprese podjednotek vztažena pomocí ratia (poměru) k expresi aktinu jakožto k rovnoměrně exprimovanému genu základního metabolismu, výsledky se změnil. U všech podjednotek (s výjimkou málo exprimované ARPC2b) je zřetelně vidět téměř dvakrát větší hodnota ratia (poměru) pro GWN oproti GWI, a až na výjimku ARP3 také vyšší hodnota ratia (poměru) pro GDN oproti GDI.

Reakce qRT-PCR proběhla správně, jak je zřejmé z nízkých hodnot odchylek ratií jednotlivých vzorků a z ilustrativní fluorescenční křivky, z velmi lineární kalibrační křivky a dostatečně nízkých crossing pointů.

7 Diskuse

Cílem práce bylo studovat lokalizaci jednotlivých podjednotek ARP2/3 komplexu a jejich kolokalizaci s buněčnými strukturami. Zvolený způsob vizualizace, N-terminální fúze podjednotek s GFP v indukovatelném vektoru, ovšem narazil na technické potíže s chybami v konstruktech a po necelém roce musel být tento způsob práce opuštěn. Protože bylo dále zjištěno, že polyklonální králičí protilátka proti ARPC2 je *in situ* nespecifická, valná většina práce se zaobírá výsledky, získanými při práci s tabákovým proteinem GFP-NtARPC2 v rostlině *Arabidopsis thaliana*.

7.1 Užití tabákového proteinu v rostlině *Arabidopsis thaliana*

Pomocí programu BLAST bylo zjištěno, že podobnost tabákové a huseníčkové sekvence proteinu ARPC2 je 72 % (stejně aminokyseliny), respektive 83 % (stejně či podobné aminokyseliny). Podobnost v proteinové sekvenci aktinových isotypů, které jsou mezi sebou volně zaměnitelné bez fenotypového projevu, je až 91,2-99,7 %, v živočišných aktinech je tato podobnost ještě vyšší (Šlajcherová et al., 2012).

Výsledky rescue experimentů však přesto ukazují, že komplementovat mutantní fenotyp rostliny *Arabidopsis* tabákovým proteinem je možné. Také kvasinkovou mutantu v proteinu ARPC3 (*arc3*) je možné téměř úplně „zachránit“ vložením lidského genu pro ARPC3 bez GFP (Cabrera et al., 2011), ačkoli sekvenční podobnost těchto dvou genů je dle údajů z databáze www.ncbi.nih.gov zpracovaných programem BLAST ještě menší, pouhých 53 %, respektive 69 %.

7.2 qRT-PCR

Během qRT-PCR experimentů bylo zjištěno, že ARPC2 je exprimován i v *dis2-1* rostlinách. Rozpor je však jen zdánlivý; qRT-PCR pracuje na úrovni mRNA, nikoli proteinů, a *dis2-1* rostliny jsou inzerční mutanty, které gen pro ARPC2 přepisují, transkript je sice defektní a nevzniká funkční protein (El-Assal et al., 2004), nicméně transkript je přítomen a tedy na qRT-PCR i detekován.

Dále bylo zjištěno, že wt rostliny a v menší míře i *dis2-1* rostliny exprimující GFP-NtARPC2 vykazují oproti neindukované kontrole nižší expresi testovaných podjednotek ARP2/3 komplexu. Je tedy možné, že overexprese ARPC2 pod silným 35S promotorem snižuje u indukovaných rostlin expresi ostatních podjednotek. Místy byl zaznamenaný rozdíl v expresi až dvojnásobný, ovšem v některých pravech, např. ve studii exprese genů souvisejících s metabolismem prolinu pod vlivem vodního stresu, byly stejnou metodou zaznamenány až stonásobné rozdíly (Dobrá et al., 2011). Proto existuje otázka, zda by

nebylo možné detekovat pomocí qRT-PCR výraznější rozdíly v expresi jednotlivých podjednotek. Je totiž možné, že po 14 dnech růstu na indukci byly zkoumané rostliny již k indukčnímu agens necitlivé, případně došlo k nedostatku indukčního agens. Relativně stabilní protein se v buňkách vyskytoval dál, labilní mRNA však mezitím podlehla zkáze a v qRT-PCR nebylo možné zaznamenat výraznější rozdíly. V příštích experimentech tedy bude nutné indukovat rostliny před izolací RNA krátkou dobu, řádově hodiny. Otázku, zda overexprese ARPC2 má či nemá vliv na expresi ostatních podjednotek, bude nutno podrobit dalšímu zkoumání.

7.3 Mikroskopické výsledky

Nejnápadnějším znakem všech rostlin, transformovaných *GFP-NtARPC2*, jsou malé motilní tečky na pozadí jemného difusního signálu v cytoplasmě všech pozorovaných buněk. Většina práce byla zaměřena na snahu zjistit, co jsou tyto tečky zač.

7.3.1 Jsou pozorované tečky klastry nefunkčního proteinu z důvodu overexprese?

Zpočátku bylo o tečkách uvažováno jako o klastrech ARPC2 proteinu, difusní signál v pozadí byl interpretován jako solubilní GFP-NtARPC2 proteiny. Nebylo ovšem zřejmé, zda jde o klastry funkční, tedy zda se protein takto seskupuje přirozeně, či zda jsou klastry artefaktem způsobeným nadměrnou expresí vloženého proteinu pod silným promotorem.

Pro přirozený původ teček by svědčilo pozorování, že přirozeně exprimované proteiny ARP2 a ARP3 vizualizované na fixovaných rostlinách pomocí protilátek se jevily také jako tečky, případně údaje z literatury. Fišerová et al. (2006) pozorovala na tabákových BY-2 buňkách také tečky, a to za použití podobného konstruktů jako byl použit v této práci (GFP-NtARP2), Delgado-Alvarez et al. (2010) pozoroval v houbě *Neurospora crassa* při použití obdobného experimentálního přístupu (podjednotky ARP2 a ARP3 fúzované s GFP, *in vivo* vizualizace) také tečky. Ve vznikajícím kořenovém vlásku kukuřice byl zaznamenán difusní i tečkovaný signál, a to zejména u špičky. Vizualizována byla podjednotka ARP3 pomocí heterologní protilátky z kvasinky (Van Gestel et al., 2003).

Pro vyloučení hypotézy, že tečky jsou klastry proteinu způsobené jeho silnou overexpresí, byly tedy prováděny experimenty s různou koncentrací a dobou působení indukčního činidla. Tyto experimenty byly vedeny v naději, že koncentrace/doba působení estradiolu na hraně schopnosti indukce dá vznik pouze malému množství

GFP-NtARPC2, nedojde tak k overexpresi a sledovaný obraz se v případě, že tečky jsou pouhým artefaktem, změní. Bylo možné očekávat např. tečky kolokalizující s mikrofilamenty a tvořící tím vlákna jako ve Fišerová et al. (2006).

Z výsledků je však zřejmé, že ke změně celkového obrazu nedošlo ani při snížení síly indukce, ani při snížení doby vystavení rostlin indukčnímu agens. Při nízkých koncentracích se neobjevuje jiný signál než tečky a difusní signál, s klesající koncentrací indukčního agens tečky nemizí o nic rychleji než celkový signál a při pozorování nejranějších indukčních fází (desítky minut po indukci do té doby neindukované rostliny) se tečky objevují přibližně stejně rychle jako celkový signál. Tato tři zjištění svědčí proti hypotéze, že pozorované tečky jsou artefakty způsobené overexpresí proteinu.

Ostatní pozorované změny byly drobné a vysvětlitelné jinými proměnnými, například chimerické rostliny se zřejmě vyskytují zejména při vystavení rostlin nižším koncentracím estradiolu po kratší dobu, to lze ale vysvětlit nedostatečnou distribucí indukčního agens do všech buněk kořene. Tuto teorii podporuje fakt, že nesvítící buňky bylo v chimérách možno pozorovat zejména v buňkách, umístěných dále od povrchu kořene. Dále pak, *dis2-1* rostliny sice přestávají svítit už při mnohem vyšších koncentracích než wt rostliny, to může být ovšem dáno použitou linií *dis2-1* rostlin.

Lze uzavřít, že protože omezení overexprese proteinu GFP-NtARPC2 nevede k vymizení teček ani ke změně celkového obrazu signálu, není přítomnost teček zřejmě způsobena overexpresí fúzního proteinu.

7.3.2 Jsou pozorované tečky klastry nefunkčního proteinu z důvodu přítomnosti GFP?

Klastry jako artefakty mohly být způsobeny také špatným sbalením proteinu za přítomnosti cizorodého GFP, tato hypotéza byla ovšem vyvrácena 54 % úspěšností (resp. 78 %, nepočítáme-li nevyklíčené rostliny a rostliny bez pravých listů) komplementace mutantního *dis2-1* fenotypu (rescue) trichomů vložení konstruktu GFP-NtARPC2 do *dis2-1* rostlin.

GFP je relativně malý protein, který obvykle s funkcí proteinů, k nimž je připojen, neinterferuje, přesto je překvapivé, že vyšší počet komplementovaných rostlin se nacházel mezi rostlinami transformovanými *GFP-NtARPC2*, než mezi *NtARPC2*. Lze se domnívat, že za tento rozdíl je zodpovědný způsob selekce, kdy obě varianty byly selektovány na selekčním antibiotiku, ale pouze rostliny s vloženým *GFP-NtARPC2*

mohly být a byly selektovány také opticky, což v případě kontruktu bez fluoroforu není možné.

Přesto však vysoká úspěšnost komplementaci mutantního fenotypu fúzními konstrukty GFP a ARPC2 nevyvrátila podezření, že fúzní protein je štěpen proteázami na GFP a ARPC2, a k záchraně fenotypu tedy přispívá samotný protein ARPC2.

7.3.3 Není fúzní protein štěpen?

Zbývá zodpovědět otázku, zda tečky obsahují celý fúzní protein GFP-NtARPC2, nebo je protein štěpen proteázami, čímž se stává nelokalizovatelným a pozorovaný signál patří volnému a ve váčcích uloženému GFP. Tato otázka byla zodpovězena proteinovými analýzami.

Ve frakci rozpustných proteinů jsou u indukovaných rostlin zřetelné dva pruhy, jeden o velikost 65 kDa, jeden o velikosti 35 kDa. Větší protein je zřejmě fúzní GFP-NtARPC2, menší je částečně nativní ARPC2, částečně NtARPC2 pocházející ze zřejmě se rozpadajícího se GFP-NtARPC2. U neindukovaných rostlin je zřetelný pouze pruh o velikosti 35 kDa, který zřejmě představuje nativní ARPC2. U *dis2-1* rostlin oba proteiny chybí. Protein je tedy částečně, ne ovšem zcela, v rostlinách štěpen. Tato teorie by se dala ověřit proteinovou analýzou *dis2-1* rostlin, do nichž byl transformován konstrukt GFPNtARPC2.

7.3.4 Jsou pozorované tečky membránovou organelou?

Po ošetření buněk latrunkulinem dojde k zastavení pohybu teček, lze se tedy domnívat, že mikrofilamenta zajišťují tečkám motilitu. Bylo tedy provedeno několik experimentů s cílem potvrdit kolokalizaci teček s aktinovým ani mikrotubulárním cytoskeletem pomocí různých metod vizualizace.

Během fixační procedury bylo zjištěno, že v průběhu fixace dochází k rozpadu teček. Protože fixační procedura obsahuje extrakční krok, během kterého je na buněčné membrány působeno detergentem TritonX-100, což vede k jejich rozpadu, byla přijata alternativní hypotéza, že tečky jsou membránovou organelou, do níž se GFP-NtARPC2 protein (příp. volné GFP) ukládá.

Pro hypotézu, že tečky jsou ve skutečnosti membránové organely, svědčí tyto údaje:

- Za pohyb teček je zřejmě zodpovědný aktinový cytoskelet, jsou ovšem schopny existovat i bez něj, protože latrunkulin způsobí zastavení teček, nikoli však jejich rozpad. Tento jev byl pozorován i v jiných pracích, kde

tečky představující protein GFP-ARP3 byly pohyblivé pouze při intaktním aktinovém cytoskeletu (Delgado-Alvarez et al., 2010).

- Tečky se však rozpadají působením detergentu.
- Tečky jsou viditelné i při slabé indukci, nebo při indukci po krátkou dobu, nejsou závislé na overexpresi proteinu.
- Kotchoni et al. (2009) a Zhang et al. (2013) už prokázali, že ARP2/3 komplex je membránově vázaný.
- Holtta-Vuori et al. (2005) prokázali, že tečky (protilátkami značený protein ARPC2) kolokalizují s endosomy.
- Nejnovější výsledky ukazují, že ARP2/3 komplex je zřejmě v neaktivní formě vázán na povrch mnohých organel (Zhang et al., 2013).

Cílem dalších experimentů bylo určit povahu těchto membránových organel. Velmi podobnou práci publikovali v nedávné době Zhang et al. (2013). V této práci bylo detekováno velké množství teček, představujících protein ARPC4, a autoři se domnívají, že tečky jsou vázány na povrch mnoha různých organel. V době provádění experimentů však tato práce ještě nebyla známa a výsledky, získané v této práci, jí tedy nebyly ovlivněny.

Nebyla prokázána kolokalizace mezi tečkami a aktinovým ani mikrotubulárním cytoskeletem, a to v rozporu s předchozími výsledky (Fišerová et al., 2006; Maisch et al., 2009), které předpokládají lokalizaci ARP2/3 komplexu v místech polymerace a větvení aktinu. V jiných pracích (Zhang et al., 2013) však kolokalizace tohoto typu nebyla prokázána a Zhang et al. (2013) se domnívají, že ARP2/3 komplex kolokalizuje s aktinem spíše na povrchu jednotlivých organel, což je mnohem méně nápadné. Výsledky získané v této práci takovýto závěr potvrzují.

Nebyla prokázána kolokalizace mezi tečkami a barvivem FM4-64. Barvivo FM4-64 se váže na vnější stranu plasmatické membrány, neprostupuje membránou a je internalizováno endocytoticky. Barvivo značí tedy všechny organely, jež jsou spojeny s endocytotickou drahou a žádné jiné (Griffing, 2008). Konkrétně bylo obarvení organely pomocí FM4-64 prokázáno u plasmatické membrány, endocytotických váčků, u vakuoly a prevakuolárního kompartmentu a u buněčné desky. Neznačí endoplasmatické retikulum a jadernou obálku. Otázka, zda FM4-64 značí Golgiho aparát, je sporná (Bolte et al., 2004).

Tečky by tedy mohly být váčky odvozené od endoplasmatického retikula nebo od Golgiho aparátu. Váčky Golgiho aparátu by sice s FM4-64 kolokalizovat mohly (Bolte et al., 2004), na druhou stranu však v literatuře je zmíněno, že ARPC2 kolokalizuje za určitých podmínek s pozdními endosomy (Holttavuori et al., 2005), kteréžto zjištění tato práce ovšem nebyla schopná potvrdit, proto nelze vyloučit, že výsledky získané při práci s FM4-64 nejsou tolik spolehlivé a je stále možné, že se jedná o Golgiho aparát.

Další výsledky potvrzují spíše hypotézu, že struktury značené GFP-ARPC2 jsou váčky Golgiho aparátu. Při TIRF mikroskopii byl pozorován pohyb teček s charakteristickým přetrhovaným (*stop-and-go*) pohybem, který je charakteristický právě pro váčky Golgiho aparátu. U váček Golgiho aparátu se střídají okamžiky pohybu o rychlosti až 4,2 μ m/s a okamžiky nečinnosti, během nichž se váčky jen vrtí (*wiggle*) na místě (Nebenfuhr et al., 1999). Tento pohyb byl pozorován i jinými autory (Delgado-Alvarez, 2010). V literatuře lze skutečně najít doklady o spojení ARP2/3 komplexu a Golgiho aparátu. Rho GTPasa Cdc42 v aktivované formě rekrutuje na membránu Golgiho aparátu N-WASP, jeden ze živočišných proteinů, které aktivují ARP2/3 komplex (Stamnes, 2002).

Zhang et al. (2013) se domnívají, že tečky (v jejich případě ovšem nikoli ARPC2, ale ARPC4, jakkoli jsou oba proteiny součástí stejného komplexu) jsou mnoha různými organelami, na jejichž povrchu je deponován neaktivní ARP2/3 komplex, konkrétně ve své práci mluví o jaderné obálce a dalších neupřesněných „buněčných organelách“. Na základě nejnovějších poznatků se lze tedy domnívat, že GFP-NtARPC2 tečky kolokalizují s oběma typy organel, jak s Golgiho aparátem, tak s váčky endoplasmatického retikula, případně i s nějakými dalšími, např. s endosomálními váčky. Rozřešení této otázky si žádá další experimenty.

7.3.5 Jaká je lokalizace teček?

Pozorovaná lokalizace teček byla zejména difusní v cytoplasmě. Tečky byly často pozorovány také při okrajích buněk, kam mohly být vytlačeny ostatním buněčným obsahem, zejména vakuolami, přípustné je ovšem i vysvětlení, že v kortikální oblasti interagují s aktinovým cytoskeletem a jejich lokalizace je tedy nenáhodná. Je známo, že např. proteiny SCAR1 a BRK1 (regulátory ARP2/3 komplexu) se nacházejí pod plasmatickou membránou v místech intenzivního růstu a zvyšují zde množství polymerovaného aktinu (Dyachok et al., 2008), podobné výsledky byly získány i v živočišných buňkách (Miki et al., 1998 a další). Ve špičkách rostoucích hyf se

podjednotky ARP2/3 komplexu nacházejí také v těsné blízkosti plasmatické membrány (Delgado-Alvarez et al., 2010). Některé práce se naopak přiklánějí k názoru, že ARP2/3 komplex s plasmatickou membránou kolokalizován není (Zhang et al., 2013).

Zajímavá lokalizace teček byla zaznamenána v kořenových vláscích. Ještě v okamžiku, kdy byl signál v ostatních buňkách slabý až žádný, se zejména špičky kořenových vlásků vyznačovaly velkým množstvím teček i difusního signálu, což je možné vysvětlit buď tím, že právě vlásky jsou v prvním a nejintenzivnějším kontaktu s indukčním mediem, nebo tím, že apikálně rostoucí vlásek má pečlivě organizovaný aktin a tím i velkou potřebu jeho organizátorů (pro přehled informací o organizaci mikrofilament v kořenovém vlásku např. viz Smith and Oppenheimer, 2005).

Podjednotky ARP2/3 komplexu byly vizualizovány na místech apikálního růstu mnohokrát, jmenujme hyfy houby *Neurospora crassa* (Delgado-Alvarez et al., 2010), kořenové vlásky kukuřice (Van Gestel et al., 2003), rhizoidální pól zygoty chaluhy *Silvetia* (Hable and Kropf, 2005) či rhizoidy a filamenta mechu *Physcomitrella patens* (Perroud and Quatrano, 2006). Samotný apikální růst však není v mutantách ARP2/3 komplexu narušen vůbec (Li et al., 2003), nebo jen velmi málo (Mathur et al., 2003), zdá se tedy, že lokalizace ARP2/3 komplexu v místech apikálním růstu zřejmě nebude dokladem jeho nepostradatelnosti pro tento růst.

Nejnovější výzkum v oblasti lokalizace a rolí podjednotek ARP2/3 komplexu ukazuje, že přinejmenším protein ARPC4 se v buňce zřejmě vyskytuje vázaný na membrány různých organel (Zhang et al., 2013). Tento výsledek závěry této práce nepřímo potvrzuje a vzniká tím otázka, jaká je role ARP2/3 komplexu na těchto buněčných organelách, pokud je skutečně deponován na jejich povrchu. Lze spekulovat, že ARP2/3 komplex by mohl například hrát roli prostředníka mezi organelami a aktinovým cytoskeletem, mohl by zprostředkovávat jejich interakci. Rozřešení této otázky si však vyžádá další experimenty.

8 Závěr

Studium lokalizace tabákového ARPC2 proteinu s připojeným GFP v rostlině *Arabidopsis thaliana* odhalilo, že tento protein lze v rostlině úspěšně exprimovat a *in vivo* vizualizovat. Protein komplementuje mutantní fenotyp *dis2-1* rostlin (tvar trichomů i epidermálních buněk). Z výsledků proteinových analýz se zdá, že fúzní protein se zřejmě v rostlině částečně rozpadá, zřejmě na volné GFP a NtARPC2.

Byly provedeny mikroskopické experimenty, jejichž cílem bylo charakterizovat lokalizaci proteinu ARPC2 v buňce. V souladu s literaturou byly pozorovány motilní tečky. Tyto tečky byly dále charakterizovány. Bylo zjištěno, že existence teček je nezávislá na aktinovém cytoskeletu, jejich motilita na něm však závisí. Bylo zjištěno, že tečky se rozpadají vlivem fixační procedury při imunofluorescenci. Byl pozorován pohyb teček, který připomíná charakteristický pohyb Golgiho aparátu. Byla zaznamenána specifická lokalizace ve špičkách kořenových vlásků. Tyto údaje naznačují, že tečky by mohly být membránovými organelami, což je v souladu s nejnovějšími výsledky, publikovanými v literatuře (Zhang et al., 2013). Na základě výsledků této práce se jako nejpravděpodobnější jeví, že tečky jsou přinejmenším zčásti asociované s povrchem cisteren Golgiho aparátu, tuto hypotézu je však třeba ověřit pomocí markeru na Golgiho aparát. Na základě údajů z literatury je také pravděpodobné, že ARP2/3 komplex bude asociovat s povrchem dalších membránových organel, jejichž identita je, stejně jako smysl této interakce, zatím neznámá.

Další výzkum by se tedy mohl orientovat třemi směry: je třeba znovu ověřit, zda se fúzní protein GFP-NtARPC2 v buňkách opravdu částečně rozpadá, a případně stanovit míru, v jaké k tomuto dochází. Dále by bylo vhodné potvrdit, zda pozorované tečky skutečně asociují s membránovými organelami, a určit původ těchto organel. Dále by bylo dobré zjistit, zda i ostatní podjednotky, nejen ARPC2, vypadají při vizualizaci stejně, zda také tvoří tečky asociované s organelami. Jako dlouhodobější projekt se zatím jeví odhalení smyslu této asociace.

9 Seznam citované literatury

Aga M, Bradley JM, Keller KE, Kelley MJ, Acott TS; Specialized podosome- or invadopodia-like structures (PILS) for focal trabecular meshwork extracellular matrix turnover; *Investigative ophthalmology and visual science*; 49:12:5353-5365; 2008

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P; *Molecular biology of the cell*; New York: Garland science, 4th edition; 2002

Balcer HI, Daugherty-Clarke K, Goode BL; The p40/ArpC1 subunit of Arp2/3 complex performs multiple essential roles in WASp-regulated actin nucleation; *Journal of biological chemistry*; 285:8481-8491; 2010

Bear JE, Rawls JF, Saxe CL; SCAR, a WASP-related protein, isolated as suppressor of receptor defects in late *Dictyostelium* development; *Journal of cell biology*; 142:5:1325-1335; 1998

Bolte S, Talbot C, Boutte Y, Catrice O, Read ND, Satiat-Jeunemaitre B; FM-dyes as experimental probes for dissecting vesicle trafficking in living plant cells; *Journal of microscopy*; 214:159-173; 2004

Brembu T, Winge P, Seem M, Bones AM; NAPP and PIRP encode subunit of a putative wave regulatory protein complex involved in plant cell morphogenesis; *Plant cell*; 16:9:2335-2349; 2004

Cabrera R, Suo JF, Young E, Chang EC; *Schizosaccharomyces pombe* Arc3 is a conserved subunit of Arp2/3 complex required for polarity, actin organization and endocytosis; *Yeast*; 28:6:495-503; 2011

Chesarone MA, Goode BL; Actin nucleation and elongation factors: mechanism and interplay; *Current opinion in cell biology*; 21:1:28-37; 2009

Craddock C, Lavagi I, Yang Z; New insights into Rho signalling from plant ROP/Rac GTPases; *Trends in cell biology*; 22:9:492-501; 2012

Cvrckova F, Rivero F, Bavlínka B; Evolutionary conserved modules in actin nucleation: lessons from *Dictyostelium discoideum* and plants; *Protoplasma*; 224:1-2:15-31; 2004

- Datta S, Kim CM, Pernas M, Pires ND, Proust H, Tam T, Vijayakumar P, Dolan L; Root hairs: development, growth and evolution at the plant-soil interface; *Plant and soil*; 346:1-2:1-14; 2011
- Deblaere R, Bytebier B, De Greve H, Deboeck F, Schell J, Van Montagu M, Leemans J; Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants; *Nucleic Acids Res.*; 11:13:4777-4788; 1985
- Deeks MJ, Hussey PJ; Arp2/3 and scar: Plants move to the fore; *Nature reviews molecular cell biology*; 6:12:954-964; 2005
- Delgado-Alvarez DL, Callejas-Negrete OA, Gomez N, Freitag M, Roberson RW, Smith LG, Mourino-Perez RR; Visualization of F-actin localization and dynamics with live cell markers in *Neurospora crassa*; *Fungal genetics and biology*, 47:7:573-586; 2010
- Dobrá J, Vaňková R, Havlová M, Burman AJ, Libus J, Storchová H; Tobacco leaves and roots differ in expression of proline metabolism-related genes in the course of drought stress and subsequent recovery; *Journal of plant physiology*; 168:13:1588-1597; 2011
- Dyachok J, Shao MR, Vaughn K, Bowling A, Facette M, Djakovic S, Clark M, Smith L; Plasma membrane-associated SCAR complex subunits promote cortical F-actin accumulation and normal growth characteristics in *Arabidopsis* roots; *Molecular plant*; 1:6:990-1006; 2008
- El-Assall SE, Le J, Basu D, Mallery EL, Szymanski DB; DISTORTED 2 encodes ARPC2 subunit of the putative *Arabidopsis* Arp2/3 complex; *Plant journal*; 38:3:526-538; 2004
- Firat-Karalar EN, Welch MD; New mechanisms and functions of actin nucleation; *Current opinion in cell biology*; 23:1:4-13; 2011
- Fišerová J, Schwarzerová K, Petrášek J, Opatrný Z; Arp2 and Arp3 are localized to the sites of actin filament nucleation in tobacco BY-2 cells; *Protoplasma*; 227:2-4:119-128; 2006
- Gautreau A, Ho HYH, Li JX, Steen HA, Gigi SP, Kirschner MW; Purification and architecture of the ubiquitous Wave complex; *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*; 101:13:4379-4383; 2004

Griffing LR; FRET analysis of transmembrane flipping of FM4-64 in plant cells: is FM4-64 a robust marker for endocytosis?; *Journal of microscopy*; 231:2:291-298; 2008

Guimil S, Dunand C; Cell growth and differentiation in *Arabidopsis* epidermal cells; *Journal of experimental botany*; 58:14:3829-3840; 2007

Hable WE, Kropf DL; The Arp2/3 complex nucleates actin arrays during zygote polarity establishment and growth; *Cell motility and the cytoskeleton*; 61:1:9-20; 2005

Havelková L; Úloha cytoskeletu v morfogenezi rostlinných buněk; *Disertační práce*; 2010

Heinrich D, Youssef S, Schroth-Diez B, Engel U, Aydin D, Blummel J, Spatz JP, Gerisch G; Actin-cytoskeleton dynamics in non-monotonic cell spreading; *Landes bioscience*; 2:2:58-68; 2008

Holtta-Vuori M, Alpy F, Tanhuanpaa K, Jokitalo E, Mutka AL, Ikonen E; MLN64 in involved in actin-mediated dynamics of late endocytic organelles; *Molecular biology of the cell*; 16:8:3873-3886; 2005

Huang CL, Ueno M, Liu D, Masuya D, Nakano J, Yokomise H, Nakagawa T, Miyake M; MRP-1/CD9 gene transduction regulates the actin cytoskeleton through downregulation of WAVE2; *Oncogene*; 25:49:6480-6488; 2006

Hülkamp M, Misera S, Jurgens G; Genetic dissection of trichome cell-development in *Arabidopsis*; *Cell*; 76:3:555-566; 1994

Jörgens CI, Grunewald N, Hülkamp M, Uhrig JF; A role for Abi3 in plant cell morphogenesis; *Plant journal*; 62:6:925-935; 2010

Kelley LC, Hayes KE, Ammer AG, Martin KH, Weed SA; Cortactin phosphorylated by ERK1/2 localizes to sites of dynamic actin regulation and is required for carcinoma lamellipodia persistence; *PLOS one*; 2010

Kotchoni SO, Zakharova T, Mallery EL, Le J, El-Assal SE, Szymanski DB; The association of the *Arabidopsis* actin-related protein 2/3 complex with cell membranes is linked to its assembly status but not its activation; *Plant physiology*; 151:4:2095-2109; 2009

Le J, El-Assad SED, Basu D, Saad ME, Szymanski DB; Requirements for Arabidopsis ATARP2 and ATARP3 during epidermal development; *Current biology*; 13:15:1341-1347; 2003

Le J, Mallery EL, Zhang CH, Brankle S, Szymanski DB; Arabidopsis BRICK1/HSPC300 is an essential WAVE complex subunit that selectively stabilizes Arp2/3 activator SCAR2; *Current biology*; 16:9:895-901; 2006

Li S, Blanchoin L, Yang Z, Lord EM; The putative arabidopsis Arp2/3 complex controls leaf cell morphogenesis; *Plant physiology*; 132:4:2034-2044; 2003

Li LJ, Ren F, Gao XQ, Wei PC, Wang XC; The reorganization of actin filaments is required for vacuolar fusion of guard cells during stomatal opening in Arabidopsis; *Plant cell and environment*; 36:2:484-497; 2013

Lin XY, Kaul SS, Rounsley S, Shea TP, Benito MI, Town CD, Fujii CY, Mason T, Bowman CL, Barnstead M, Feldblyum TV, Buell CR, Ketchum KA, Lee J, Ronning CM, Koo HL, Moffat KS, Cronin LA, Shen M, Pai G, Van Aken S, Umayam L, Tallon LJ, Gill JE, Adams MD, Carrera AJ, Creasy TH, Goodman HM, Somerville CR, Copenhaver GP, Preuss D, Nierman WC, White O, Eisen JA, Salzberg SL, Fraser CM, Venter JC; Sequence and analysis of chromosome 2 of the plant Arabidopsis thaliana; *Nature*; 402:6763:761+-; 1999

Loisel TP, Boujemaa R, Pantaloni D, Carlier MF; Reconstitution of actin-based motility of Listeria and Shigella using pure proteins; *Nature*; 401:6752:613-616; 1999

Machesky LM, Atkinson SJ, Ampe C, Vandekerckhove J, Pollard TD; Purification of a cortical complex containing 2 unconventional actin from Acanthamoeba by affinity chromatography on profilin agarose; *Journal of cell biology*; 127:1:107-115; 1994

Maisch J, Fišerová J, Fischer L, Nick P; Tobacco Arp3 is localized to actin-nucleation sites in vivo; *Journal of experimental botany*; 60:2:603-614; 2009

Mathur J, Mathur N, Kirik V, Kernebeck B, Srinivas BP, Hulskamp M; Arabidopsis CROOKED encodes for the smallest subunit of the Arp2/3 complex and controls cell shape by region specific fine F-actin formation; *Development*; 130:14:3137-3147; 2003

Mathur J; The ARP2/3 complex: giving plant cells a leading edge; *Bioessays*; 27:4:377-387; 2005

McCollum D, Feoktistova A, Morpew M, Balasubramanian M, Gould KL; The *Schizosaccharomyces pombe* actin-related protein, Arp3, is a component of the cortical actin cytoskeleton and interacts with profilin; *EMBO journal*; 15:23:6438-6446; 1996

McCurdy DW, Kovar DR, Staiger CJ; Actin and actin-binding proteins in higher plants; *Protoplasma*; 215:1-4:89-104; 2001

Miki H, Suetsugu S, Takenawa T; WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganisation induced by Rac; *EMBO journal*; 17:23:6932-6941; 1998

Millard TH, Sharp SJ, Machesky LM; Signalling to actin assembly via the WASP (Wiscott-Aldrich syndrome protein) family proteins and the Arp2/3 complex; *Biochemical journal*; 380:1:1-17; 2004

Moseley JB, Goode BL; The yeast actin cytoskeleton: from cellular function to biochemical mechanism; *Microbiology and molecular biology reviews*; 70:3:605-645; 2006

Munn AL, Thanabalu T; Verprolin: cool set of actin-binding sites and some very HOT prolines; *IUBMB Life*; 61:7:707-712; 2009

Nagata T, Nemoto Y, Hasezawa S; Tobacco BY-2 cell-line as the HeLa-cell in cell biology of higher-plants; *International review of cytology – a survey of cell biology*; 132:1-30; 1992

Nebenfuhr A, Gallagher LA, Dunahay TG, Frohlick JA, Mazurkiewicz AM, Meehl JB, Staehelin LA; Stop-and-go movements of plant Golgi stacks are mediated by actomyosin system; *Plant physiology*; 121:4:1127-1141; 1999

Nicholson-Dykstra SM, Higgs HN; Arp2 depletion inhibits sheet-like protrusions but not linear protrusions of fibroblasts and lymphocytes; *Cell motility and the cytoskeleton*; 65:11:904-922; 2008

Nolen BJ, Littlefield RS, Pollard TD; Crystal structures of actin-related protein 2/3 complex with bound ATP or ADP; *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*; 101:44:15627-15632; 2004

- Panteris E, Galatis B; The morphogenesis of lobed plant cells in the mesophyll and epidermis: organization and distinct roles of cortical microtubules and actin filaments; *New phytologists*; 167:3:721-731; 2005
- Pei WK, Du F, Zhang Y, He T, Ren HY; Control of the actin cytoskeleton in root hair development; *Plant science*; 187:10-18; 2012
- Perroud PF, Quatrano RS; The role of ArpC4 in tip growth and alignment of the polar axis in filaments of *Physcomitrella patens*; *Cell motility and the cytoskeleton*; 63:3:162-171; 2006
- Pollard TD, Beltzner CC; Structure and function of Arp2/3 complex; *Current opinion in structural biology*; 12:6:768-774; 2002
- Pollard TG, Borisy GG; Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments; *Cell*; 112:4:453-465; 2003
- Poukkula M, Kremneva E, Serlachius M, Lappalainen P; Actin-depolymerizing factor homology domain: a conserved fold performing diverse roles in cytoskeletal dynamics; *Cytoskeleton*; 68:9:471-490; 2011
- Reboulet JC, Kumar P, Kiss JZ; Dis1 and Dis2 play a role in tropism in *Arabidopsis thaliana*; *Environmental and experimental botany*; 67:3:474-478; 2010
- Robinson RC, Turbedsky K, Kaiser DA, Marchand JB, Higgs HN, Choe S, Pollard TD; Crystal structure of Arp2/3 complex; *Science*; 294:5547:1679-1684; 2001
- Rouiller I, Xu XP, Amann KJ, Egile C, Nickell S, Nicastro D, Li R, Pollard TD, Volkmann N, Hanein D; The structural basis of actin filament branching by the Arp2/3 complex; *Journal of cell biology*; 180:5:887-895; 2008
- Saedler R, Zimmermann I, Mutondo M, Hulskamp M; The *Arabidopsis* KLUNKER gene controls cell shape changes and encodes the AtSRA1 homolog; *Plant molecular biology*; 56:5:775-782; 2004a
- Saedler R, Mathur N, Srinivas BP, Kernebeck B, Hulskamp M, Mathur J; Actin control over microtubules suggested by DISTORTED2 encoding the *Arabidopsis* ArpC2 subunit homolog; *Plant and cell physiology*; 45:7:813-822; 2004b

- Saedler R, Jakoby M, Marin B, Galiana-Jaime E, Hulskamp M; The cell morphogenesis gene SPIRRIG in Arabidopsis encodes a WD/BEACH domain protein; *Plant journal*; 59:4:612-621; 2009
- Schwab B, Mathur J, Saedler RR, Schwarz H, Frey B, Scheidegger C, Hulskamp M; Regulation of cell expansion by the DISTORTED genes in Arabidopsis thaliana: actin controls the spatial organization of microtubules; *Molecular genetics and genomics*; 269:3:350-360; 2003
- Šljajčerová K, Fišerová J, Fischer L, Schwarzerová K; Multiple actin isotypes in plants: diverse genes for diverse roles?; *Frontiers in plant cell biology*; published online; 2012
- Small JV, Stradal T, Vignal E, Rottner K; The lamellipodium: where motility begins; *Trends in cell biology*; 12:3:112-120; 2002
- Smertenko AP, Deeks MJ, Hussey PJ; Strategies of actin reorganisation in plant cells; *Journal of cell science*; 123:17:3019-3029; 2010
- Smith LG, Oppenheimer DG; Spatial control of cell expansion by the plant cytoskeleton; *Annual review of cell and developmental biology*; 21:271-295; 2005
- Staiger CJ, Sheahan MB, Khurana P, Wang X, McCurdy DW, Blanchoin L; Actin filament dynamics are dominated by rapid growth and severing activity in Arabidopsis cortical array; *Journal of cell biology*; 184:2:269-280; 2009
- Stamnes M; Regulating the actin cytoskeleton during vesicular transport; *Current opinion in cell biology*; 14:4:428-433; 2002
- Strasser GA, Rahim NA, VanderWaal KE, Getler FB, Lanier LM; Arp2/3 is a negative regulator of growth cone translocation; *Neuron*; 43:1:81-94; 2004
- Szymanski DB, Marks MD, Wick SM; Organized F-actin is essential for normal trichome morphogenesis in Arabidopsis; *Plant cell*; 11:12:2331-2347; 1999
- Szymanski DB; Plant cells taking shape: new insights into cytoplasmic control; *Current opinion in plant biology*; 12:6:735-744; 2009

Ten Klooster JP, Evers EE, Janssen L, Machesky LM, Michiels F, Hordijk P, Collard JG; Interaction between Tiam1 and the Arp2/3 complex links activation of Rac to actin polymerization; *Biochemical journal*; 397:39-45; 2006

Van Gestel K, Slegers H, von Witsch M, Samaj J, Baluska F, Verleben JP; Immunological evidence for presence of plant homologues of actin-related protein Arp3 in tobacco and maize: subcellular localization to actin-enriched pit fields and emerging root hairs; *Protoplasma*; 222:1-2:45-52; 2003

Vartiainen MK, Machesky LM; The WASP-Arp2/3 pathway: genetic insights; *Current opinion in cell biology*; 16:2:174-181; 2004

Vincent C, Siddiqui TA, Schlichter LC; Podosomes in migrating microglia: components and matrix degradation; *Journal of neuroinflammation*; 9:190; 2012

Vosolsobě S; Charakterizace membránového proteinu DREPP; Diplomová práce; 2010

Welch MD, DePace AH, Verma S, Iwamatsu A, Mitchison TJ; The human Arp2/3 complex is composed of evolutionary conserved subunits and is localized to cellular regions of dynamic actin filament assembly; *Journal of cell biology*; 138:2:375-384; 1997

Wang JJ, Xue XH, Ren HY; New insights into the role of plant formins: regulating the organization of the actin and microtubule cytoskeleton; *Protoplasma*; 249:2:101-107; 2012

Xu YW, Moseley JB, Sagot I, Poy F, Pellman D, Goode BL, Eck MJ; Crystal structures of a formin homology-2 reveal a tethered dimer architecture; *Cell*; 116:5:711-723; 2004

Xu XP, Rouiller I, Slaughter BD, Egile C, Kim E, Unruh JR, Fan XX, Pollard TD, Li R, Hanein D, Volkman N; Three-dimensional reconstructions of Arp2/3 complex with bound nucleation promoting factors; *EMBO journal*; 31:1:236-247; 2012

Yamaguchi H, Miki H, Takenawa T; Two verprolin homology domains increase the Arp2/3 complex mediated actin polymerization of N-WASP and WAVE1 C-terminal regions; *Biochemical and biophysical research communications*; 297:2:214-219; 2002

Zhang C, Mallery EL, Szymanski DB; Arp2/3 localization in Arabidopsis leaf pavement cells: a diversity of intracellular pools and cytoskeletal interactions; *Frontiers in plant science*; 238:4; 2013

Zuo XF, Zhang J, Zhang Y, Hsu SC, Zhou DG, Guo W; Exo70 interacts with Arp2/3 complex and regulates cell migration; Nature cell biology; 8:12:1383-U38; 2006

Databáze a programy:

The Arabidopsis Information Resource (TAIR), www.arabidopsis.org, Jul 07 2013

The National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nih.gov, Jul 07 2013

Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), www.ncbi.nih.gov/blast, Jul 07 2013