

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra experimentální biologie rostlin



Role komplexu ARP2/3 v rostlinné buňce
Bc. Petra Schiebertová

Praha, 2013

Školitelka: RNDr. Kateřina Schwarzerová, Ph.D.
Konzultant: RNDr. Lukáš Fischer, Ph.D.

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

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, 15. 8. 2013

Bc. Petra Schiebertová

Poděkování

Děkuji své školitelce Kateřině Schwarzerové za pomoc s prvými experimenty, plánováním, opravami a diskusemi nad postupem práce a hlavně za poskytnutí tak úžasného nevyčerpatelného téma, jako je ARP2/3 komplex. Děkuji Honzovy Petráškoví za konzultace a nové náhledy na komplexitu komplexu. Děkuji Erice Bellinvia za rady a pomoc s PCR. Lukáši Fischerovi za cenné konzultace a pomoc s databázemi, Lence Dvořákové za to, že všechno ví, Lence Havelkové a Petrovi Jírovcovi za média, Mít'ovi Tyčovi a Janě Krtkové za vytvoření krásné tvůrčí atmosféry v laboratoři a Standovi Vosolobě pak za trpělivé vysvětlování věcí technického rázu. Děkuji Ivanu Kulichovi za všechny pochvaly a Amparo Rosero děkuji za všechny cenné metody, které mě naučila, a za všechny informace o forminech.

Děkuji Martině Benákové a Kateřině Šlajcherové za pomoc a pochopení při čemkoliv v laborce, za to, že jsme to spolu mohly všechno prožít.

Za úplně všechno děkuji mamince, Lucii a Michalovi, vždyť mě znáte.

1 Abstrakt

ARP2/3 proteinový komplex je komplex sedmi proteinů (ARP2, ARP3 a ARC1-ARPC5) s poměrně konzervovanou strukturou. ARP2/3 komplex rozvětňuje a nukleuje nová aktinová vlákna. Tato diplomová práce je zaměřena na studium role a důležitosti jednotlivých podjednotek komplexu ARP2/3 u rostlin.

Jedním ze zásadních cílů práce je zjistit, zda komplex ARP2/3 může zachovávat alespoň částečně svou funkci, pokud jedna či více podjednotek není k dispozici. Dále zda jednotlivé podjednotky nehrají další, rostlinně-specifické role a zda jsou si podjednotky navzájem funkčně rovnocenné. Hlavním způsobem dosažení výše zmíněných cílů je získání a analýza single mutantů a vícečetných mutantů rostlin *Arabidopsis thaliana* v genech pro podjednotky ARP2/3 komplexu.

Po porovnání fenotypů několika mutantních linií je zřejmé, že všechny podjednotky si funkčně rovnocenné nejsou. Nejsilnější fenotypový projev má většinou ztráta ARPC5 podjednotky. Naopak ztráta ARPC3 a ARPC2b podjednotky má pouze slabé fenotypové projevy. Protože některé fenotypy, jako např. fenotyp zkroucených trichomů, byl detekován jen v některých mutantních liniích, zatímco např. fenotyp rychlejší gravitropické reakce kořenů či fragmentace vakuolárního systému byl detekovatelný u všech analyzovaných mutantů, lze usoudit, že různé podjednotky se uplatňují v různé míře během specifických morfogenetických procesů v rostlině. To ukazuje na rostlinně-specifické funkce komplexu i samotných podjednotek.

Podjednotka ARPC3 hraje v komplexu zřejmě dosud neznámou regulační roli, jak naznačily fenotypové projevy vícečetných mutantních rostlin. Výsledky také naznačují, že komplex se může nacházet i ve stavu, kdy je jeho funkce jen částečně zachována a kdy je projev mutace výraznější, než při úplné ztrátě funkce. Toto potvrdily i opakující se výsledky, kdy dvojité mutanty měly slabší fenotypové projevy než jednoduché mutanty. Zároveň byly výsledky této diplomové práce podpořeny analýzou dat z databáze Genevestigator, čímž byla potvrzena různá exprese podjednotek v pletivech. Z těchto unikátních výsledků je zřejmé, že rostliny nesoucí mutaci v genech pro podjednotky ARP2/3 komplexu jsou jedinečným rostlinným materiálem pro výzkum nukleace a funkce aktinového cytoskeletu v eukaryotických buňkách.

Klíčová slova: ARP2/3 komplex, aktin, nukleace aktinového cytoskeletu

2 Abstract

ARP2/3 protein complex is formed from seven proteins (ARP2, ARP3 and ARC1-ARPC5) with a relatively conserved structure. ARP2/3 complex branches and nucleates new actin filaments. This thesis focuses on the study of the role and importance of the individual subunits of the complex ARP2/3 in plants.

One of the principal aims of this work is to determine whether complex ARP2/3 may at least partially maintain its role when one or more of the subunits are not available. Furthermore if the individual subunits play another, plant-specific role and if the subunits are functionally equivalent in the complex. The main way how to achieve this objective is the analysis of multiple mutants of *Arabidopsis thaliana* in subunits of ARP2/3 complex.

After comparing several phenotypes of mutant lines it is obvious that all the subunits are functionally equivalent. A loss of ARPC5 subunit usually manifests the strongest phenotypic expression. On the contrary, loss ARPC3 and ARPC2b subunits have weak phenotypic manifestations. Because some phenotypes, such as phenotype distorted trichomes was detected only in some mutant lines, whereas the phenotype of faster roots gravitropic response or vacuolar system fragmentation that was detected in all analyzed mutants suggests, that different subunits play varying roles during specific morphogenetic processes in the plant. These findings indicate plant-specific function of complex and even subunits themselves.

ARPC3 subunit in complex probably plays a previously unknown regulatory role, as indicated phenotypic manifestations of multiple mutant plants. This shows that the complex may be present in cells also in a state where the function is partially preserved, and when the "partial failure" has more pronounced symptoms than the total loss of function. This is also indicated by repetitive results where double mutants showed weaker phenotypic manifestations than single mutants. At the same time, the results of this thesis are supported by analysis of data from the database Genevestigator, which confirms different subunits expression in tissues. These unique results clearly indicate that the plants carrying mutations in the genes for the subunits of ARP2/3 complex are unique plant material for the research of nucleation and actin cytoskeleton function in eukaryotic cells.

Keywords: ARP2/3 complex, actin, nucleation of actin cytoskeleton

3 Obsah

1 Abstrakt	5
2 Abstract	6
3 Obsah	7
4 Seznam použitých zkratk	10
5 Úvod a cíle práce	12
6 Literární přehled	
6.1 Cytoskelet	14
6.2 Aktinový cytoskelet	15
6.3 Nukleace aktinových vláken <i>de novo</i>	16
6.4 ARP2/3 komplex	
6.4.1. <i>Genetická analýza komplexu</i>	17
6.4.2 <i>ARP2/3 komplex a jeho podjednotky a funkce u živočichů</i>	18
6.4.3 <i>Uspořádání a interakce podjednotek v ARP2/3 komplexu</i>	20
6.5 Regulace a funkce ARP2/3 komplexu	22
6.6 Fenotypový projev nefunkčnosti podjednotek ARP2/3 komplexu u <i>A. thaliana</i>	23
6.6.1 <i>Fenotypový projev nefunkčnosti aktivátorů ARP2/3 komplexu</i>	25
6.7 Význam výzkumu vícečetných mutantů	27
7 Materiál a metody	
7.1 Materiál	29
7.2 Metody	
7.2.1 <i>Křížení rostlin a získání F2 generace</i>	29
7.2.2 <i>Izolace DNA pro PCR</i>	30
7.2.3 <i>PCR pro účely genotypování</i>	30
7.2.4. <i>Elektroforéza</i>	31
7.2.5 <i>Kultivace rostlin in vitro, selekce rostlin s GFP-markerem</i>	31
7.3 Porovnání fenotypů mutantů <i>Arabidopsis thaliana</i>	
7.3.1 <i>Měření maturace děložních a pravých listů pěstovaných ex vitro</i>	32
7.3.2 <i>Měření maturace děložních listů pěstovaných in vitro</i>	32
7.3.3 <i>Projasnování listů - projev zkroucených trichomů</i>	33
7.3.4 <i>Hodnocení cirkularity pokožkových buněk pravých listů – obtisky</i>	33

7.3.5	<i>Hodnocení cirkularity pokožkových buněk děložních listů – FM4-64</i>	33
7.3.6	<i>Měření délky kořenů A. thaliana rostoucí in vitro</i>	34
7.3.7	<i>Měření gravitropismu kořene Arabidopsis thaliana</i>	34
7.4	Projev mutace na úrovni buněk	
7.4.1	<i>Konfokální mikroskopie - pozorování vakuolárního systému</i>	34
7.4.2	<i>Konfokální mikroskopie – počet a svazkování aktinových vláken</i>	35
7.5	Porovnání genové exprese podjednotek – in silico analýza	
7.5.1	<i>Porovnání genové exprese podjednotek – Genevestigator</i>	35
7.5.2	<i>Analýza promotorové oblasti genů podjednotek –AtcisDB</i>	36
8	Výsledky	
8.1	Získání rostlin nesoucích mutaci ve dvou genech ARP2/3 komplexu	
8.1.1	<i>Rostliny nesoucí mutaci ve dvou genech ARP2/3 komplexu</i>	37
8.1.2	<i>Dvojitě mutanty s GFP - cytoskeletálními markery</i>	38
8.2	Porovnání fenotypů mutantů Arabidopsis thaliana	
	-list	
8.2.1	<i>Maturace děložních a pravých listů rostlin pěstovaných ex vitro</i>	38
8.2.2	<i>Maturace děložních listů rostlin pěstovaných in vitro</i>	40
8.2.3	<i>Projev zkroucených trichomů</i>	42
8.2.4	<i>Cirkularita pokožkových buněk pravých listů – obtisky</i>	45
8.2.5	<i>Cirkularita pokožkových buněk děložních listů – FM4-64</i>	46
	-kořen	
8.2.6	<i>Délka kořene rostlin in vitro a závislost na složení média</i>	48
8.2.7	<i>Změny v gravitropické reakci kořene</i>	49
8.3	Projev mutace na úrovni buněk	
8.3.1	<i>Fragmentace vakuolárního systému</i>	51
8.3.2	<i>Počet a svazkování aktinových vláken</i>	53
8.4	Porovnání genové exprese podjednotek – in silico analýza	
8.4.1	<i>Genevestigator – rozdílná genová exprese podjednotek</i>	54
8.4.2	<i>Genevestigator - klastrování podjednotek</i>	57
8.4.3	<i>Analýza promotorové oblasti genů -AtcisDB</i>	58
9	Diskuse	
9.1	<i>Fenotypový projev jednoduchých mutantních linií</i>	60
9.2	<i>Cirkularita pokožkových buněk</i>	61
9.3	<i>Charakteristický projev zkroucených trichomů</i>	63
9.4	<i>Délka kořenů rostlin</i>	64
9.5	<i>Změny v gravitropické reakci kořene</i>	65

<i>9.6 Fragmentace vakuolárního systému mutantních rostlin</i>	66
<i>9.7 Struktura aktinového cytoskeletu u mutantních rostlin</i>	67
<i>9.8 Genevestigator – potvrzení rozdílné genové exprese podjednotek</i>	67
<i>9.9 Klastrování genů podjednotek, analýza jejich promotorových oblastí</i>	68
<i>9.10 Dvojitě mutanty vykazují slabší fenotyp</i>	69
10 Závěr	70
11 Seznam citované literatury	71

4 Seznam použitých zkratk

Abi2 - Abi-interactor2

ABP – actin binding protein

APC - adenomatous polyposis col

ADF-H – ADF/cofilin homology

AtcisDB - Arabidopsis cis-regulatory element database

ARP – actin-related protein

ATP – adenosintrifosfát

BRICK – plant HSPC300

bp – base pair

Cobl - Cordon bleu

CK666 – ARP2/3 complex inhibitor - CAS 442633-00-3

DMSO – dimethylsulfoxid

DNA – deoxyribonucleotide acid

T-DNA – transfer DNA

dNTP - deoxyribonucleotide triphosphates

FH1 - formin homology 1

FH2 – formin homology 2

GEF – guanine-exchange factor

GFP – green fluorescent protein

GTP – guanosintrifosfát

HSPC300 - hematopoietic stem progenitor clone 300

JMY - multifunctional actin nucleate factor

Lmod – Leiomodin

Lhc - light-harvesting complex

MS – Murashige-Skoog

NAP- Nck-associated protein

NASC - The Nottingham Arabidopsis Stock Centre

NES – nucleus export sekvence

N – number of repetition/cells

NPF – nucleation-promoting factors

qRT-PCR – kvantitativní real-time PCR
PCR – polymerase chain reaction
PCD – programmed cell death
PINs – pin formed proteins
RNA – ribonucleotide acid
RNAi - RNA interference (post transcriptional gene silencing)
RPM – otáčky za minutu
ROP – Rho of plants
SDS – sodium dodecylsulfát
SMIFH2 - small molecule inhibitor of formin homology 2
SRA1 – specifically rac1-associated
StEr – standart error
TAE pufr - mixture of Tris base, acetic acid and EDTA
TOM/TIM - mitochondria Transporter Outer Membrane, Transporter Inner Membrane
VCA - verproline homology connecting acidic domain
WH2 – WASP homology 2 domain
WASP – Wiscott-Aldrich syndrome protein
WAVE/SCAR - Wiscott-Aldrich syndrome protein family verprolin-homologous protein/suppresor of cAMP receptor of Dictyostelium
WT – wild type plant

5 Úvod a cíle práce

ARP2/3 proteinový komplex je komplex sedmi proteinů s poměrně konzervovanou strukturou. Tento proteinový komplex je asociovaný s aktinovým cytoskeletem a jeho základní funkce je spojena s dynamikou aktinové sítě v buňce. ARP2/3 komplex rozvětňuje a nukleuje nová aktinová vlákna. Tato diplomová práce je zaměřena na studium role a významu jednotlivých podjednotek komplexu ARP2/3 u rostlin.

Jedním ze zásadních cílů práce je zjistit, zda komplex ARP2/3 může zachovávat alespoň částečně svou funkci, pokud jedna a více z podjednotek není k dispozici, případně zda jednotlivé podjednotky nehrají další, rostlině-specifické role. Hlavním způsobem dosažení výše zmíněných cílů je získání a analýza single a vícečetných mutantů rostlin *Arabidopsis thaliana*. Vícečetné mutantní rostliny postrádající podjednotky ARP2/3 komplexu nejsou v současné době podle publikovaných výsledků k dispozici. Tento unikátní rostlinný materiál získaný v naší laboratoři je v této práci analyzován, a to jak na úrovni celé rostliny (plocha listu, délka kořene), tak na úrovni buněčné (tvar, velikost buněk) a sub-buněčné (struktura aktinového cytoskeletu, struktura vakuolárního kompartmentu buňky).

Zároveň s vícečetnými mutantními rostlinami jsou porovnávány mutantní rostliny s mutací ve všech známých jednotlivých podjednotkách ARP2/3 komplexu s výjimkou ARPC1 podjednotky, pro jejíž gen není dostupná mutantní linie. Práce, která by porovnávala mutantní projevy těchto rostlin, zatím nebyla publikována, všechny dosavadní studie porovnávaly mutantní rostliny ve čtyřech či méně ARP2/3 genech. Porovnáváním rostlin mutantních ve všech genech pro podjednotky ARP2/3 komplexu lze ověřit, zda jsou si podjednotky v ARP2/3 komplexu rovnocenné, nebo ne.

V případě, že fenotypy vícečetných mutantů budou podobné fenotypu jednotlivých mutantních rostlin, bude možné říci, že komplex pravděpodobně funguje, pouze pokud jsou přítomny všechny podjednotky a aktivátory. V tomto případě pak slabé fenotypové projevy, detekované na mutantních rostlinách, ukazují na spíše menší a méně důležitou roli komplexu ARP2/3 v rostlinách. V případě, že fenotypy vícečetných mutantů budou silnější (případně letální) nebo se významně odlišovat, bude možné naopak usoudit, že komplex může fungovat i v případě, že nejsou v buňce přítomny všechny podjednotky, a bude případně možné usuzovat na další role podjednotek ARP2/3 komplexu v rostlině.

Cíle práce v bodech:

1. Jsou si podjednotky ve své funkci v ARP2/3 komplexu navzájem rovnocenné?
2. Může ARP2/3 komplex alespoň částečně zachovávat svoji funkci, pokud jedna a více z podjednotek není k dispozici?
3. Nehrají jednotlivé podjednotky ještě další, rostlině-specifické role?

6 Literární přehled

6.1 Cytoskelet

Buněčný cytoskelet je vysoce dynamická trojrozměrná síť proteinů, která je základní složkou všech eukaryotických buněk. Cytoskelet zajišťuje přenos signálů, tok informací i stavebního materiálu, pohyb organel v buňce, ale i pohyb celých buněk. Cytoskeletální síť podléhá neustálým změnám. Je tvořena třemi typy vláken - mikrofilamenty, mikrotubuly a intermediálními filamenty.

Mikrotubuly jsou vlákna o průměru 25 nm vznikající polymerací podjednotek tubulinu. Jsou to dynamicky nestabilní polární struktury, podléhají neustálému růstu a degradaci. Mikrotubuly se podílejí na vnitřní organizaci buňky. Mají klíčovou funkci při dělení buněk a udávají buňkám tvar.

Intermediální filamenta jsou tvořena vláknitými proteiny o průměru asi 10 - 15 nm. Jsou stabilní, pevná, odolná, mají převážně mechanické funkce a chrání buňky proti mechanickému stresu. Nacházejí se nejen v cytoplasmě většiny buněk, ale i v jádře. U živočichů řadíme do této skupiny např. keratin, vimentin, proteiny neurofilament, laminy. U rostlinných buněk nebyla přítomnost intermediálních filament ani jejich homologů potvrzena.

Mikrofilamenta jsou tenká, pružná vlákna o průměru 8 nm, která vznikají polymerací podjednotek aktinu. Jsou dynamická a polární, váží monomery a potřebují ke své polymeraci ATP. Jsou jedním z nejhojněji zastoupených proteinů v buňkách vůbec. Aktin existuje v eukaryotických buňkách ve dvou formách, jako G-aktin a F-aktin. G –aktin tvoří globulární podjednotky aktinu, které se na sebe mohou vázat a vytvořit spletená vlákna F-aktinu (Alberts et al., 1998, Buchanan et al., 2000).

Rostlinný cytoskelet sestává ze vzájemně propojených sítí mikrotubulů a aktinových mikrofilament. Rostlinné buňky obklopené buněčnou stěnou se nepohybují a tudíž nevyužívají cytoskelet k pohybu, jak to dělá většina živočišných buněk. Aktinový cytoskelet u rostlin je důležitý hlavně pro růst a vývoj rostlinných buněk. Hraje roli v buněčných procesech, jakými jsou pohyb organel, zavírání a otevírání průduchů, buněčná polarita, vývoj a směrovaný buněčný růst a buněčné dělení (Hussey et al., 2006).

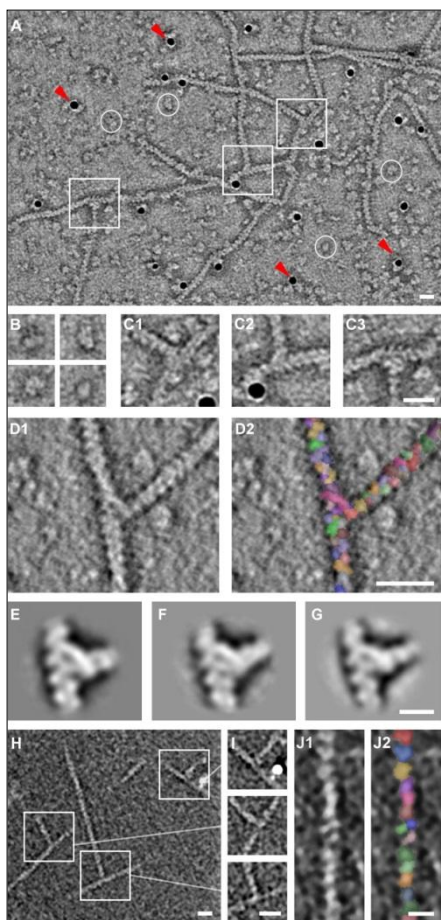
6.2 Aktinový cytoskelet

Aktin je protein, který je v eukaryotických buňkách všudypřítomný. U eukaryot hraje aktinový cytoskelet stěžejní roli v buněčném růstu či morfogenezi a u živočišných buněk a některých prvoků je stěžejní pro jejich schopnost pohybu. Existuje několik možných přístupů, kterými lze zkoumat rostlinný cytoskelet.

Důležitý nástroj při zkoumání role aktinového cytoskeletu v buňce jsou cytoskeletální drogy latrunkulin a cytochalasin. Latrunkulin i cytochalasin způsobují trvalou depolymeraci aktinového cytoskeletu (Kandasamy et al., 1999, Szymanski et al., 1999). Rostliny, které byly pěstovány na médiu s vysokou koncentrací latrunculinu B, vykazovaly pouze malé odlišnosti v organizaci a orientaci buněčného dělení, ale byla změněna buněčná elongace. Rostliny vykazovaly trpasličí fenotyp (Baluska et al., 2001). Tato data naznačují, že F-aktin je esenciální pro elongaci rostlinných buněk, ne však pro jejich morfogenezi.

Dalším způsobem, jak zkoumat roli aktinového cytoskeletu, je výzkum proteinů vážících aktin (actin-binding proteins, ABP) v rostlinách. Aktinová dynamika je ovlivňována více než 70 známými proteiny vážícími aktin (Pollard et al., 2000). Interakce aktinu s vazebnými proteiny ovlivňuje nukleaci aktinových vláken, svazkování vláken, čepičkování filament, fragmentaci, depolymeraci a dostupnost monomerního G - aktinu v buňce. Další proteiny, které interagují s aktinovými vlákny, jsou zapojeny do transportu podél F-aktinu, nebo využívají trojrozměrnou aktinovou síť jako lešení.

Pro vizualizaci aktinu je hojně využíván tradiční protokol imunodetekce aktinu. Velký pokrok ve vizualizaci dynamiky a uspořádání aktinových vláken bylo zavedení GFP technologie značení vláken a proteinů (Sheahan et al., 2004).



Obrázek 1. Elektronová tomografie vlákná aktinu s nukleací nového vlákna z boku zprostředkována ARP2/3 komplexem. (A) Centrální fotografie ukazuje několik větvení (čtverce), individuální ARP2/3 komplex (kruhy) a zlato markrů (šipky). Další fotografie ukazují přiblížený pohled na jednotlivé komplexy. Měřítko (A, C, D, H, I) 20 nm; (G, J) 10 nm. (Rouiller I et al. J Cell Biol 2008;180:887-895).

6.3 Nukleace aktinových vláken *de novo*

Nukleace aktinu znamená formování nových aktinových vláken z G-aktinu. Nukleace může probíhat spontánně, pokud je v buňce přítomná vysoká koncentrace monomerního G-aktinu. Nicméně je známo, že i když je v rostlinách velmi vysoká koncentrace G-aktinu (90% aktinu se vyskytuje v monomerní formě; u kvasinek je poměr G-aktinu a F-aktinu obrácený) (Karpova et al., 1995, Staiger a Blanchoin 2006), ke spontánní nukleaci mikrofilament nedochází. G-aktin je totiž vázán proteinem profilinem a tím je bráněno spontánní nukleaci.

V živočišných buňkách je známo více nukleátorů aktinových filament – ARP2/3 komplex, forminy (Faix a Grosse 2006, Goode a Eck 2007), Spire (Quinlan et al., 2005), Cordon bleu (Cobl; Ahuja et al., 2007), Leiomodín (Lmod; Chereau et al., 2008), JMY; (Zuchero et al., 2009) a APC; Okada et al., 2010). U rostlin jsou doposud identifikovány jen dva hlavní nukleační mechanismy – ARP2/3 komplex (Li et al., 2003) a forminy (Michelot et al., 2005). Živočišné nukleátory Spire, Cordon bleu, Leiomodín, JMY a APC zatím nebyly objeveny u rostlin, přestože rostliny v některých proteinech využívají WH2

doménu (WASP homology 2 domain). Jde o krátký motiv vázající aktinový monomer, který se vyskytuje v mnoha proteinech regulujících aktin, např. i v proteinech rodiny Scar/WAVE, rostlinných ARP2/3 aktivátorů (Rotty et al., 2013).

Nukleace aktinu v rostlinných buňkách je umožněna proteiny polymerujícími aktin, a to ARP2/3 komplexem a forminy. ARP2/3 komplex rozvětjuje síť stávajících aktinových

filament a zůstává spojen s mínus koncem nového vlákna (Obrázek 1 a 2). Forminy katalyzují vznik přímých (nevětvících se) aktinových vláken a formují různé aktinové struktury v buňce (Faix a Grosse 2006, Goode a Eck 2007). Forminová FH2 doména se udržuje na plus konci vlákna i po nukleaci a umožňuje rychlé vkládání aktinových podjednotek.

6.4 ARP2/3 komplex

6.4.1 Genetická analýza komplexu

ARP2/3 komplex je evolučně konzervovaný proteinový komplex ze sedmi podjednotek. Původně byl izolován z *Acanthamoeba castellanii* (Machesky et al., 1994).

ARP2/3 komplex je tvořen dvěma proteiny strukturně velmi podobnými aktinu, „actin related proteins“, ARP2 a ARP3 a pěti dalšími, aktinu nepříbuznými proteiny o různé velikosti - ARPC1, ARPC2, ARPC3, ARPC4 a ARPC5, kde ARPC znamená ARP2/3 complex component (Higgs a Pollard, 2001). Proteiny ATARP2 a ATARP3 z *Arabidopsis thaliana* sdílejí 50% podobnost v sekvenci aminokyselin s geny pro aktin (Li et al., 2003). Gen *ARP2* leží u *A. thaliana* na třetím chromozomu, geny *ARP3*, *ARPC2a* a *ARPC3* na prvním chromozomu, geny *ARPC1* s *ARPC2b* na druhém chromozomu a geny *ARPC4* a *ARPC5* se nacházejí na čtvrtém chromozomu.

Genom *Arabidopsis thaliana* obsahuje dva geny pro podjednotku ARPC2, geny nesou název *ARPC2a* a *ARPC2b* (Li, et al., 2003). Gen pro podjednotku ARPC2b sdílí velmi podobnou sekvenci aminokyselin s genem pro podjednotku ARPC2a, ale na C-konci má přidaných dalších 60 aminokyselin. Podobně genom rýže také kóduje dva geny podobné genům pro ARPC2 podjednotku a jeden z genů má na C-konci 60 aminokyselin podobným těm u genu *ATARPC2b*, tato sekvence a uspořádání se tedy zdají být konzervované (El-Assall et al., 2004).

Genom *A. thaliana* obsahuje vedle dvou genů pro ARPC2 podjednotku také dva geny pro podjednotku ARPC1. Geny jsou orientované v reverzní orientaci a nacházejí se v těsné blízkosti u sebe. Geny jsou označeny jako *ARPC1a* a *ARPC1b* (Li et al., 2003, Mathur et al., 2003). Geny pro ostatní podjednotky jsou v buňkách vždy v jedné kopii.

Při srovnání aminokyselinových sekvencí genů kódujících podjednotky ARP2/3 komplexu u rostlin s jejich ortology u lidí, kvasinek, hlenek a octomilek vyšlo najevo, že

nejméně konzervované složení aminokyselin má napříč druhy ARPC4 podjednotka, která sdílí pouze podobnou doménu jako proteiny blízké aktinovému molekulárnímu motoru kinesinu. Pro další podjednotky a jejich ortology u ostatních organismů se pohybuje míra podobnosti od 46% pro ARPC2 k 80% podobnosti aminokyselinových sekvencí pro podjednotku ARP2, která je nejkonzervovanější (Li et al., 2003, Mathur et al., 2003).

6.4.2 ARP2/3 komplex a jeho podjednotky a funkce u živočichů

Genetická data naznačují, že některé podjednotky ARP2/3 komplexu jsou pro živočišné buňky esenciální. Nicméně ne všechny podjednotky ARP2/3 komplexu jsou stejně potřebné. Například pro kvasinku je delece genu *c40* (ARPC) a *c35* (ARPC2) letální (Winter et al., 1999a). Pokud ale kvasinky postrádají gen pro podjednotku *c18* (ARPC3), vykazují pouze mírný fenotyp v kortikální oblasti aktinového cytoskeletu (Winter et al., 1999b). Podjednotka *c15* (ARPC5) a ARP3 je pak důležitá pro motilitu mitochondrií kvasinek (Boldogh et al., 2001). Mutace v genu pro podjednotku *p21* (ARPC3) u myši je letální (RNAi), (Harborth et al., 2001). Savčí buňky mutované v podjednotkách ARP2/3 komplexu vykazují také změněnou morfologii GA a tvoří velké množství pozdně endosomálních/lysosomálních hybridních organel (Kellye et al., 2012). U hmyzích buněk pak vede delece podjednotky *p16* (ARPC5) ke značně (85x) snížené funkci nukleace komplexu (Gournier et al., 2001). Je tedy zřejmé, že ne všechny podjednotky ARP2/3 komplexu jsou u živočichů stejně potřebné a ne všechny mutace v podjednotkách ARP2/3 komplexu jsou pro živočišné buňky letální. V tabulce 1 jsou pro přehlednost vypsány projevy mutací jednotlivých podjednotek u živočichů.

Aktin a ARP2/3 komplex u rostlin určují lokalizaci buněčného růstu, morfologii a mnoho dalších důležitých pochodů v buňce, ale ve srovnání s ostatními eukaryotními buňkami není rostlinný ARP2/3 komplex pro život buňky nepostradatelný (Hussey et al., 2006). *Arabidopsis thaliana* je tedy výborný modelový organismus při výzkumu rolí jednotlivých podjednotek ARP2/3 komplexu, neboť rostliny postrádající jednotlivé podjednotky jsou životaschopné, fertillní, a mají přitom charakteristické fenotypové projevy.

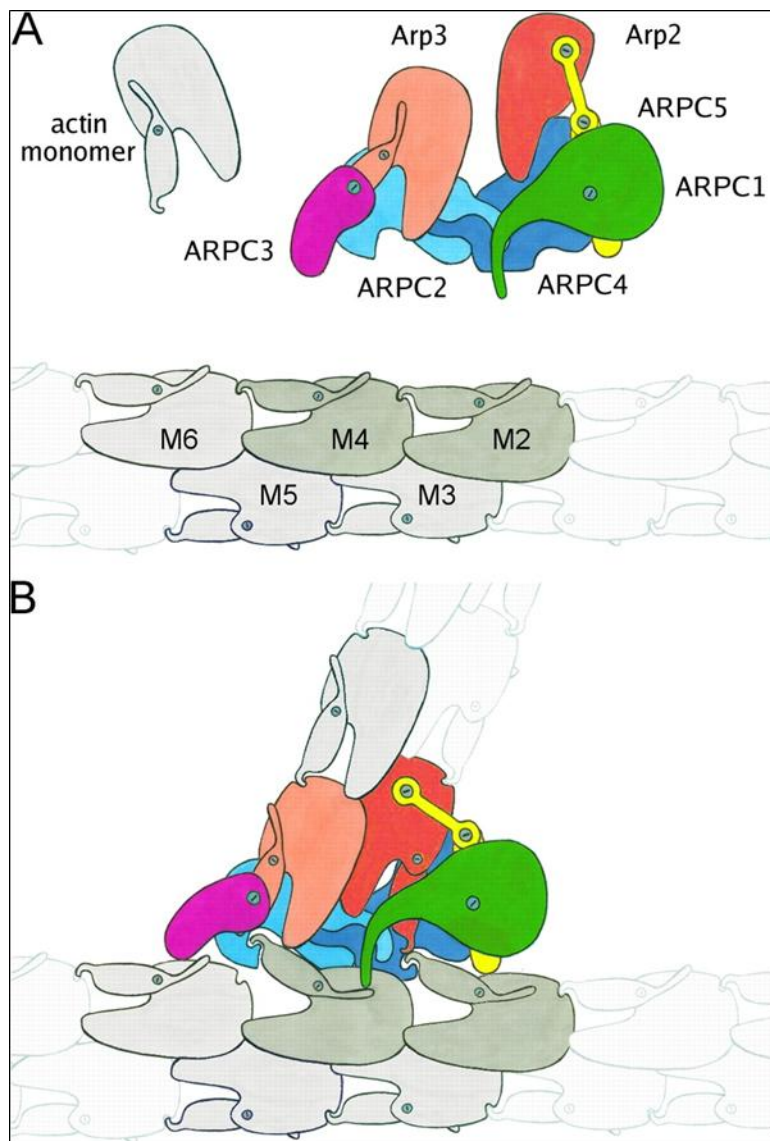
podjednotka	organismus	projev mutace	citovaná literatura
ARP2	Kvasinka	není nukleační aktivita komplexu - letální	(Rouiller et al., 2008)
	Kvasinka	esenciální pro růst, a pro endocytosu, ne pro exocytosu	(Moreau et al., 1997)
	Kvasinka	letální	(Winter et al., 1999a)
	Hlenka	není nukleační aktivita komplexu - letální	(Zaki et al., 2007)
	Hád'átko	vliv na migraci buněk při morfogenezi (hypoderm)	(Sawa et al., 2003)
ARP3	Kvasinka	esenciální pro růst	(Moreau et al., 1997)
	kvasinka	postižena motilita a distribuce mitochondrií	(Boldogh et al., 2001)
	hád'átko	vliv na migraci buněk při morfogenezi (hypoderm)	(Sawa et al., 2003)
	octomilka	změny aktinové sítě při oogenezi	(Hudson a Cooley, 2002)
	člověk	podjednotka esenciální pro funkci komplexu	(Gournier et al., 2001)
ARPC1 (p40) (c40)	kvasinka	letální	(Winter et al., 1999a)
	kvasinka	není nukleační aktivita komplexu - letální	(Kelly et al., 2006)
	octomilka	syncythium embrya	(Stevenson et al., 2002)
	octomilka	změny aktinové sítě během oogeneze	(Hudson a Cooley, 2002)
ARPC2 (p34) (c35)	kvasinka	letální	(Winter et al., 1999a)
	kvasinka	důležitá pro endocytósu	(Schaerer et al., 2000)
	hád'átko	vliv na migraci buněk při morfogenezi (hypoderm)	(Sawa et al., 2003)
	člověk	podjednotka esenciální pro funkci komplexu	(Gournier et al., 2001)
ARPC3 (p21) (c18)	kvasinka	podjednotka pro aktivitu komplexu nejméně potřebná	(Winter et al., 1999b)
	kvasinka	důležitá podjednotka pro aktivitu komplexu	(Su-Ling Liu et al., 2012)
	hád'átko	vliv na migraci buněk při morfogenezi (hypoderm)	(Sawa et al., 2002)
	myš (RNAi)	letální	(Harborth et al., 2001)
	člověk	podjednotka nejméně důležitá pro aktivaci komplexu	(Gournier et al., 2001)
ARPC4 (p20, c19)	kvasinka	letální	(Winter et al., 1999a)
	hád'átko	vliv na migraci buněk při morfogenezi (hypoderm)	(Sawa et al., 2003)
ARPC5 (p16) (c15)	kvasinka	lehčí fenotyp, neovlivňuje formaci aktinové sítě, jen distribuci	(Winter et al., 1999a)
	kvasinka	postižena motilita a distribuce mitochondrií	(Boldogh et al., 2001)
	hád'átko	vliv na migraci buněk při morfogenezi (hypoderm)	(Sawa et al., 2003)
	octomilka	snížená nukleace komplexem 85x	(Gournier et al., 2001)
	člověk	podjednotka důležitá pro aktivaci komplexu	(Gournier et al., 2001)

Tabulka 1: Projevy mutací jednotlivých podjednotek ARP2/3 komplexu u živočichů. V prvním sloupci jsou tučně názvy běžně používané u rostlin a pod nimi jejich synonyma vyjadřující jejich molekulovou hmotnost v kDa, tento způsob označení podjednotek ARP2/3 komplexu se používá u obratlovců, níže jsou uvedeny zkratky kvasinkových homologů (Pollard a Beltzner, 2002).

6.4.3 Uspořádání a interakce podjednotek v ARP2/3 komplexu

Všechny získané výsledky o uspořádání podjednotek v komplexu a jejich vzájemné interakci zatím pocházejí ze studia živočišných nebo kvasinkových podjednotek ARP2/3 komplexu (Borths et al., 2002, Rouiller et al., 2008, Liu, et al., 2013). U rostlin nejsou bližší informace k dispozici. Data získaná studiem živočišného ARP2/3 komplexu naznačují, že na interakci ARP2/3 komplexu s mateřským aktinovým filamentem se podílí hned pět aktinových podjednotek mateřského filamenta, kterého se na různých místech a v různém rozsahu dotýká všech sedm ARP2/3 podjednotek (Obrázek 2).

Jako jádro komplexu slouží heterodimer z ARPC2-ARPC4 podjednotky. Izolovaný heterodimer podjednotek ARPC2 a ARPC4 dokáže vázat aktinová filamenta (Volkman et al., 2001). Tyto podjednotky tedy tvoří funkční jádro ARP2/3 komplexu. Podjednotce ARPC4 pak podle Kotchoni et al. (2009) náleží nejdůležitější role pro vytvoření a stabilizaci komplexu. Podjednotka ARP3 tvoří první podjednotku vznikajícího sesterského filamenta, pro kterou podjednotka ARPC3 tvoří stabilnější propojení mezi ARP3 podjednotkou a mateřským filamentem. Komplex je touto vazbou pravděpodobně stabilizován. Podobně ARP2 podjednotka je druhou ARP podjednotkou, která se podílí na vzniku nového filamenta a která tvoří místo nukleace aktinu do sesterského filamenta. Tuto důležitou podjednotku stabilizuje v komplexu podjednotka ARPC5. Podjednotka ARPC1, která má pouze minimální kontakt s mateřským filamentem, má pravděpodobně i jinou než stabilizační úlohu a tou může být například vazba nukleačních faktorů (NPF), které jsou potřebné pro nukleaci nového vlákna (Rouiller et al., 2008).



Obrázek 2: Schematické znázornění prekurzorů a jednotlivých komponentů větvení aktinového vlákna pomocí ARP2/3 komplexu. (A) Nákres neaktivního ARP2/3 komplexu a standardní aktinové vlákno. (B) Model tvorby nového aktinového vlákna pomocí vazby komplexu na mateřské vlákno a růst nového dceřiného vlákna pod úhlem 70 stupňů. Změny uspořádání jednotlivých podjednotek při aktivaci komplexu a nukleaci vlákna (Rouiller I et al. *J Cell Biol* 2008;180:887-895).

6.5 Regulace funkce ARP2/3 komplexu

ARP2/3 komplex nedokáže sám nukleovat aktinová filamenta (Kelleher et al., 1995). V buňkách se nachází v neaktivním stavu a musí být aktivován specifickými proteiny, které regulují jeho nukleační vlastnosti a umožňují a řídí tak nukleaci aktinových vláken ARP2/3 komplexem. Proteiny umožňují nukleaci (nucleation promoting factors; NPFs) a mění inaktivní ARP2/3 komplex v aktivní (Welch a Mullins, 2002). Tyto proteiny se váží na podjednotku ARP3 a spolu s navázaným ATP způsobí konformační změnu ARP2/3 komplexu, která umožní nukleaci nového aktinového vlákna z boku již existujícího mateřského aktinového vlákna. Prvními proteiny, objevenými v roce 1999 patřícími mezi endogenní NPFs, byly proteiny rodiny WASP (Rohatgi et al., 1999). Další popsany aktivátor s podobnou aktivní aktin vazebnou doménou jako WASP proteiny byl WAVE a následoval aktivátor JMY (Rottner et al., 2010). U rostlin byly objeveny příbuzné proteiny proteinům WASP a WAVE a byly pojmenovány jako proteiny SCAR.

NPFs u živočichů obsahují pět rodin aktivátorů ARP2/3 komplexu, ale pouze jeden jejich isotyp – SCAR – najdeme u rostlin (Millard et al., 2004). Všechny proteiny rodiny WASP obsahují aktin vazebnou VCA doménu, která se skládá z jedné nebo dvou VPH domén (V), cofilin homology domény (C) a kyselá (acidic – A) oblasti (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 u živočichů je třeba, aby se s pomocí SCAR domény VCA navázal na rozhraní podjednotek ARP2 a ARP3 (Xu et al., 2012). Nedávno byly objeveny i inhibitory ARP2/3 komplexu, kterými jsou maturační faktor gliových buněk, coronin, cofilin, gadkin a protein interagující s C kinázou (Rotty et al., 2013). Jako nejnovější příklad výzkumu regulačního mechanismu aktivace nukleace ARP2/3 komplexu pomocí NPFs u živočišných buněk lze uvést aktivaci pomocí fosforylace ARP2 podjednotky u *Drosophily* (Chang-Hoon et al., 2013).

V rostlinných buňkách existuje relativně jednoduchá signalizace vedoucí k aktivaci ARP2/3 komplexu, ve srovnání se signalizací v živočišných buňkách. V rostlinách jde o pozitivní regulaci jediným nukleaci umožňujícím SCAR regulačním komplexem. SCAR proteiny plní roli aktivátorů a v rostlinných buňkách opakovaně váží a aktivují ARP2/3

komplex. SCAR regulační komplex je regulován pomocí malých GTPáz specifických pro rostliny-ROPs (Hussey et al., 2006).

U *A. thaliana*, kde je výzkum nejdále, jsou SCAR proteiny nejzásadnější pro aktivaci rostlinného ARP2/3 komplexu. Fungují v komplexu s proteiny SRA1, NAP1, BRK1 a ABI proteinem. Tvoří tak celý SRA1-NAP1-ABI-BRK1/HSPC300-SCAR/WAVE komplex, jehož činnost je regulována ROPs (Uhrig et al. 2007). Na základě dat, která jsou k dispozici, je však možné usuzovat, že v rostlinách funguje ještě další, zatím nerozpoznaný aktivátor ARP2/3 komplexu (Zhang et al., 2013). Zatím není známo, jak přesně a kde dochází u rostlin k aktivaci ARP2/3 komplexu.

U rostlin se spekulovalo, že aktivace může probíhat i vazbou komplexu na membránu (Kotchoni et al., 2009). Podjednotka ARP2 je totiž důležitá pro vazbu komplexu na membránu a ARP2/3 komplex silně interaguje s membránou. Vazba na membránu je ale potřebná hlavně pro sestavení komplexu, ne však pro jeho aktivaci, jak zjistil Kotchoni et al. (2009). Dalším navazujícím zjištěním je, že podjednotky ARPC5 a ARPC1 nejsou důležité pro vázání komplexu na membránu (Djakovic et al., 2006, Kotchoni et al., 2009). Podle nepublikovaných výsledků je možné, že k potenciální aktivaci může sloužit vazba komplexu k mikrotubulům pomocí ARPC2 podjednotky (Schwarzerova, nepublikovaná data). Nukleace a kontrola ARP2/3 komplexu je v současné době velmi studovaná tematika.

6.6 Fenotypový projev nefunkčnosti podjednotek ARP2/3 komplexu u *A. thaliana*

Obecně se fenotypové projevy při mutacích v genech pro podjednotky ARP2/3 komplexu týkají především těch buněk a pletiv, které mají komplexnější tvary (trichomy, buňky epidermis), a jejichž morfogeneze a růst tedy vyžadují dobrou koordinaci vnitrobuněčných procesů a modelování a růstu buněčné stěny. To ukazuje na možnost, že aktinový cytoskelet a jeho nukleace pomocí komplexu ARP2/3 jsou pro tyto procesy nepostradatelné. Většinu fenotypů lze pozorovat na buňkách, u kterých je vyžadován rychlý růst (Mathur et al., 2003). Nejlépe pozorovatelný projev mutace v genech kódujících podjednotky ARP2/3 komplexu a v proteinech regulačního komplexu SCAR je poměrně jednotný „zdeformovaný“ fenotyp trichomů. Mutanti, kteří vykazují tento fenotyp, mají typicky zkrácené, ztloustlé a minimálně větvené trichomy. Do skupiny mutantů s deformovanými trichomy patří:

- *distorted1* (Le et al., 2003, Li et al., 2003, Mathur et al., 2003a) - mutovaný v genu kódujícím *ARP2*
- *distorted2* (El-Assall et al., 2004a, Saedler et al., 2004) – mutovaný v genu pro *ARPC2*
- *wurm* (Le et al., 2003, Li et al., 2003, Mathur et al., 2003a) - mutace v genu pro *ARP3*
- *crooked* (Li et al., 2003, Mathur et al., 2003b) – mutovaný v genu pro *ARPC5*
- *distorted3* (Basu et al., 2005, Zhang et al., 2005) – mutovaný v genu pro *SCAR2*
- *gnarled* (Brembu et al., 2004, El-Assal et al., 2004b) - mutace v *NAPI*
- *pirogy* (Basu et al., 2004, Brembu et al., 2004) – mutovaný v *PIRP*
- *brick1* (Djakovic et al., 2006, Le et al., 2006) – mutovaný v *BRICK1*, rostlinném homologu *HSP300*

Dalšími projevy mutací jsou defekty v tvorbě laloků u pokožkových buněk děložních lístků, defekty v adhezi buněk hypokotylu nebo například zvlněné kořenové vlásky. Dalšíh projevů mutací v genech pro podjednotky ARP2/3 komplexu je poměrně mnoho a liší se pro jednotlivé podjednotky. Všechny projevy mutací jsou uvedené v tabulce 2.

Další důležitá data, která pojednávají o fenotypovém projevu nefunkčnosti ARP2/3 komplexu, byla získána studiem mechu *Physcomitrella patens*. ARP2/3 komplex se u *P. patens* podílí na vrcholovém růstu a buněčné morfogenezi (Finka et al., 2008). Fenotyp knock-out mutanta v genu pro ARP3 vykazuje krátké chloronemální buňky, nediferencující se rhizoidy a caulonemální buňky. Kortikální aktinový cytoskelet, který je důležitý pro lokalizovaný růst rostlinné buňky, chybí. Gen pro ARP3 podjednotku z *P. patens* komplementuje mutaci *arp3* v *A. thaliana* (Finka et al., 2008). Projevy nefunkčnosti ARP2/3 komplexu mají pro *P. patens* vážnější charakter než projevy mutace u *A. thaliana*.

6.6.1 Fenotypový projev nefunkčnosti aktivátorů ARP2/3 komplexu

Protože ARP2/3 komplex nemůže nukleovat aktinová vlákna sám o sobě, potřebuje k zahájení své činnosti nukleaci aktivující faktory. Pokud je některý z tohoto komplexu aktivujících faktorů poškozen, můžeme u *A. thaliana* pozorovat další, většinou podobné fenotypy, jako je sama nefunkčnost ARP2/3 komplexu. Všechny projevy mutací, které jsou o jednotlivých mutacích v proteinech důležitých pro aktivaci ARP2/3 komplexu známé, jsou uvedené v tabulce 3.

podjednotka	místo mutace	projev mutace	citovaná literatura
ARP2	rostlina	menší rostliny	(Li et al., 2003a)
	list	defekty ve vývoji lobů epidermálních buněk trhliny mezi pokožkovými buňkami menší buňky na děložních listech defekty v rozvětvení trichomů papily na trichomech protažené a větší narušená formace průduchů na epidermis	(Le et al., 2003) (Mathur et al., 2003) (Mathur et al., 2005) (Dyachok et al., 2008)
	hypokotyl	hypokotyl ve tmě kratší a kroutí se kratší buňky na hypokotylu narušená formace průduchů na hypokotylu	
	kořen	kratší kořeny na médiu bez sacharózy vlnité kořenové vlásky	
	buňka	kratší, neorientované svazky mikrofilament zvýšená tvorba svazků mikrofilament špatná fúze vakuol v trichomech pylová láčka normální	
ARP3	rostlina	menší rostliny	(Li et al., 2003a)
	list	defekty ve vývoji laloků epidermálních buněk trhliny mezi pokožkovými buňkami menší buňky na děložních listech defekty v rozvětvení trichomů papily na trichomech protažené a větší narušená formace průduchů na epidermis	(Le et al., 2003) (Mathur et al., 2003) (El-Assall et al., 2004) (Mathur et al., 2005) (Reboulet et al., 2009) (Dyachok et al., 2008)
	stonek	zvýšení odpovědi květního stonku na gravitropický stimul na světle	
	hypokotyl	hypokotyl ve tmě kratší a kroutí se kratší buňky na hypokotylu narušená formace průduchů na hypokotylu	
	kořen	kratší kořeny na médiu bez sacharózy	

		vlnité kořenové vlásky zvýšení odpovědi kořene na gravitopický stimul ve tmě	
	buňka	kratší, neorientované svazky mikrofilament zvýšená tvorba svazků mikrofilament narušená fúze vakuol v trichomech vakuoly vyplňují celé trichomy pylová láčka normální	
ARPC1		žádný mutantní projev nebyl dosud popsán	
ARPC2	list	defekty ve vývoji laloků epidermálních buněk trhliny mezi pokožkovými buňkami defekty v rozvětvení trichomů narušená formace průduchů na epidermis	(El-Assall et al., 2004) (Mathur et al., 2005) (Jiang et al., 2012) (Reboulet et al., 2009)
	stonek	zvýšení odpovědi květního stonku na gravitopický stimul na světle	
	hypokotyl	kratší hypokotyl narušená adheze hypokotylových buněk	
	kořen	délka a růst kořenů normální	
	buňka	regulace aktinové sítě průduchů na listech zvýšená tvorba svazků mikrofilament svazky aktinu s náhodnou orientací v buňce vakuoly vyplňují celé trichomy pylová láčka normální	
ARPC3		žádný mutantní projev nebyl dosud popsán	
ARPC4	list	defekty v rozvětvení trichomů	(Kotchoni et al., 2009)
	hypokotyl	kratší hypokotyl	
	buňka	zvýšená tvorba svazků mikrofilament	
ARPC5	list	defekty ve vývoji laloků epidermálních buněk menší buňky na děložních listech defekty v rozvětvení trichomů	(Mathur et al., 2003) (Li et al., 2003)
	hypokotyl	kratší hypokotyl stomatální komplexy na hypokotylu chybí narušená adheze hypokotylových buněk	
	kořen	zvlněné a kratší kořenové vlásky více kořenových vlásků vyrůstá z jedné buňky	
	buňka	zvýšená tvorba svazků mikrofilament v trichomech jiná distribuce a densita buněčných organel velká desita GA cisteren ve špičkách nevyvinutých trichomů pylová láčka normální	

Tabulka 2: Projevy mutací v jednotlivých podjednotkách ARP2/3 komplexu.

podjednotka	místo mutace	projev mutace	citovaná literatura
NAP1	list	defekty ve vývoji epidermálních buněk defekty v rozvětvení trichomů	(Qian et al., 2009) (Li et al., 2004)
	hypokotyl	defekty v buňkách hypokotylu	(El-Assal et al., 2004a)
	kořen	delší kořeny kratší kořenové vlásky	
	semena	snížená produkce semen menší semena	
SRA1	list	defekty ve vývoji epidermálních buněk defekty v rozvětvení trichomů	(Qian et al., 2009) (Basu et al., 2004)
	hypokotyl	defekty v buňkách hypokotylu	(Li et al., 2004)
	kořen	delší kořeny	
	semena	snížená produkce semen	
BRK1	list	defekty ve vývoji epidermálních buněk defekty v rozvětvení trichomů	(Qian et al., 2009) (Frank a Smith, 2002)
SCAR2	rostlina	etiolované rostliny	(Qian et al., 2009)
	list	defekty ve vývoji epidermálních buněk defekty v rozvětvení trichomů	(Zhang et al., 2005)
	hypokotyl	defekty v buňkách hypokotylu	
	kořen	delší kořeny	
ABIL3	list	mírné defekty ve vývoji epidermálních buněk defekty v rozvětvení trichomů	(Jörgens et al., 2010)
	kořen	delší kořeny	
WAVE4	list	defekty ve vývoji epidermálních buněk	
ROP2	list	defekty ve vývoji epidermálních buněk defekty v rozvětvení trichomů stáčejší-se listy	(Qian et al. 2009) (Fu et al., 2005) (Li et al., 2001)
	kořen	kratší hlavní kořen	
	šešule	stáčejší-se šušule	
ROP4	list	defekty ve vývoji epidermálních buněk defekty v rozvětvení trichomů	(Qian et al., 2009) (Fu et al., 2005)
	kořen	kratší hlavní kořen	
SPK1	rostlina	menší rostliny sterilní trpasličí rostliny	(Basu et al., 2008) (Qui et al., 2002)
	listy	defekty ve vývoji epidermálních buněk defekty v rozvětvení trichomů stáčejší-se listy	

Tabulka 3: Projevy mutací v jednotlivých proteinech NPFs a malých GTPázách specifických pro rostliny-ROPs.

6.8 Význam výzkumu vícečetných mutantů

I přes spíše obsáhlejší literaturu, popisující fenotypové projevy mutantních rostlin *A. thaliana* postrádajících jednu z podjednotek komplexu nebo některý z regulačních faktorů nutných pro aktivaci komplexu, vyvstává několik zásadních otázek. Zaprvé, není zřejmé, proč nejsou k dispozici mutantní rostliny postrádající podjednotku ARPC3. Je možné, že absence je pro rostlinu letální, proč však není letální ztráta i dalších podjednotek? Navazující otázkou je, zda komplex ARP2/3 funguje jako celistvý komplex, nebo zda rostlinný komplex ARP2/3 je schopen částečně fungovat i při nepřítomnosti některé z podjednotek. Druhou otázkou je, zda některé z podjednotek v rostlinách získaly další roli, nezávislou na jejich funkci v komplexu. Samotný rostlinný komplex ARP2/3 zřejmě některé specifické role opravdu má. Kotchoni et al. (2009) např. informují o tom, že rostlinný komplex ARP2/3 se váže k buněčným membránám a že tuto interakci zprostředkovává podjednotka ARP2. Naše laboratoř se zabývá výzkumem podjednotky ARPC2, u které jsme dokázali, že je schopna vazby nejen na aktinový, ale též na mikrotubulární cytoskelet. Předběžné experimenty dále ukázaly, že schopnost vazby ARPC2 na mikrotubulární cytoskelet je rostlinně-specifickou funkcí (nepublikované výsledky). U podjednotky ARPC2 Jiang et al. (2012) nedávno zjistili, že má roli v regulaci otevírání a uzavírání průduchů u *A. thaliana*. Je tedy možné, že některé z dalších podjednotek rostlinného komplexu získaly nové role.

7 Materiál a metody

7.1 Materiál

V práci byly použity rostliny *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., ekotyp Columbia jako WT rostliny a rostliny *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., ekotyp Columbia nesoucí mutaci v jedné z podjednotek ARP2/3 komplexu (T-DNA inzerční linie, The Nottingham Arabidopsis Stock Centre - NASC). Seznam T-DNA inzerčních linií se SALK označením je uveden níže v Tabulce 3. Rostliny nesoucí mutaci v genu pro *ARPC2a* podjednotku (*distorted2-1*) jsou na pozadí *Lansberg erecta* (zdroj: prof. Szymanski).

mutace	SALK označení
<i>arp2-2</i>	SALK_077920.56.00.
<i>arp3</i>	SALK_022445.34.70
<i>arpc2a</i>	<i>distorted2-1 (ler)</i>
<i>arpc2b</i>	SALK_060369.52.00.
<i>arpc3</i>	SALK_034989.54.00.
<i>arpc4</i>	SALK_013909.27.65
<i>arpc5</i>	SALK_123936.41.55.

Tabulka 3: Seznam mutantních rostlin, které byly použity v této práci.

7.2 Metody

7.2.1 Křížení rostlin a získání F2 generace

Rostliny mutantní v jedné podjednotce ARP2/3 komplexu byly pěstovány nesterilně v jiffech (rašelinové válečky od společnosti Jiffy Products International). Semena byla naseta na jiffy a kultivována při fotoperiodě 16/8 a při 23°C.

Poté, co rostliny začaly kvést, byly zkříženy rostliny mutantní v různých genech pro podjednotky ARP2/3 komplexu. Pyl byl přenášen v obou směrech. Po vytvoření a dozrání šesule byla vzniklá semena dva dny skladována a sušena v otevřené zkumavce a dále skladována v uzavřené zkumavce. Tato semena byla naseta opět na jiffy a jejich semena (F2-generace) byla použita pro další práci. Rostliny v F2 generaci byly genotypovány.

Pro další pěstování rostlin *ex vitro* byl používán soubor kultivačních pomůcek Arasystém (firma) 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.

7.2.2 Izolace DNA pro PCR

Po 14 dnech růstu byl rostlinám ustřižen zhruba 4 mm dlouhý maturovaný list, který byl vložen do zkumavky se zhruba pěti skleněnými kuličkami s průměrem 1 mm a zamražen v tekutém dusíku. Stále zmrzlé zkumavky s listy byly vloženy do homogenizátoru na 3 minuty s frekvencí kmitu 25. Do těchto zkumavek bylo pak ihned přidáno 400 μ l izolačního pufru (200 mM Tris-HCl pH=7.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5% SDS) materiál byl nechán krátce roztát. Následně probíhaly tyto kroky: centrifugace 1 minutu (16 000 g, 25°C), odebrání 300 μ l supernatantu do nové zkumavky, přidání 300 μ l isopropanolu k supernatantu, 2 minuty stání, centrifugace 5 minut (16 000 g, 25°C). Výsledný pelet byl vysušen, DNA byla rozpuštěna v 50 μ l vody a skladována v -20°C.

7.2.3 PCR pro účely genotypování

PCR byla prováděna zejména na thermocycleru MJResearch PTC-200.

Složení reakční směsi (200 μ l) pro deset 20 μ l reakcí:

voda: 173 μ l

pufr pro Dream Taq DNA Polymerázu: 20 μ l

dNTP: 2,5 μ l

primery: 2 μ l od každého primeru

Dream Taq Polymeráza: 0,5 μ l

Nakonec přidat po 1 μ l cDNA do každé reakce.

Program PCR reakce:

94°C – 2 min

(94°C – 30 s; 58°C – 1 min; 72°C – 1 min), opakovat 26x.

72°C – 10 min

Nakonec chlazení na 4°C.

Sekvence primerů (Generi Biotech) je uvedena v Tabulce 4. Velikosti vzniklých produktů jsou vypsány v Tabulce 5.

<i>ARP2-2</i>	RP	5' - TGTGGCAAGAAATAGGGTTCC - 3'
	LP	5' - ATGTTGAAGGTGATGGAATGG - 3'
<i>ARPC3</i>	RP	5' - CGAAAGCGAGACCATAGAATG - 3'
	LP	5' - GGTGATCCGTACCATTTTGTG - 3'
<i>ARPC4</i>	RP	5' - TTTTTCATTCAAACATGTCCTG - 3'
	LP	5' - AAGTCACGACTCGTCAAGACG - 3'
<i>ARPC5</i>	RP	5' - CTTTTGAAATGGTCAAATGGC - 3'
	LP	5' - TGCAAATCCACCAAATCTTC - 3'
<i>Lbbl</i>		5' - GCGTGGACCGCTTGCTGCACC - 3'

Tabulka 4: Sekvence primerů, které byly použity pro genotypování.

<i>ARP2-2</i>	SALK_077920.56.00.x velikost produktu 1274
	BP+RP_velikost produktu 596-896
<i>ARPC3</i>	SALK_034989.54.00.x velikost produktu 1103
	BP+RP_velikost produktu 582-882
<i>ARPC4</i>	SALK_013909.27.65.x velikost produktu 1280
	BP+RP_velikost produktu 606-906
<i>ARPC5</i>	SALK_123936.41.55.x velikost produktu 1068
	BP+RP_velikost produktu 479-779

Tabulka 5: Velikosti vzniklých produktů v PCR reakci.

7.2.4 Elektroforéza

Příprava 1,2 % agarózového gelu: agaróza rozvařena v 0,5×TAE pufru. TAE pufr: 2,42 g Tris base, 5,71 ml ledové kyseliny octové, 1 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0, voda do 1l. Po ochlazení na přibližně 70°C byl přidán GelRed (10 000×, Biotium) v koncentraci 10 µl /100 ml. Po utužení (cca 45 minut) byl gel přelit 0,5×TAE pufrem a do jamek byly nanášeny vzorky DNA smíchané s nanášecím pufrem 6x DNA Loading Dye (Fermentas) v poměru 5:1. Jako marker byly použity 3 µl GeneRuler 100pb (Fementas), Vzorky byly separovány 30 minut při 102 mA.

7.2.5 Kultivace rostlin *in vitro*, selekce rostlin s GFP-markérem

Rostliny s vícenásobnými mutantními homozygotními podjednotkami pro ARP2/3 komplex byly zkříženy s rostlinami, které nesly molekulární markery GFP – clathrin (zdroj: prof. J. Friml), GFP – fimbrin a GFP- tubulin (GFP-TUA6). F2-generace těchto rostlin byla nasetá sterilně *in vitro* na minimálním MS mediu (Tabulka 6) na hranatých miskách 12 cm x 12 cm uzavřených parafilmem. Tyto misky byly postaveny vertikálně pod úhlem cca 5°. Rostliny byly kultivovány při fotoperiodě 16/8 a při 23°C.

Pro pěstování rostlin *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. Dále byla semena ve vodě 2 dny stratifikována při 4°C a poté vysévána na medium pomocí 200µl pipety sterilně ve flowboxu.

Na 1000 ml: ½ MS solí (2,2g) sacharóza 10g agar 12g pH = 5.7
--

Tabulka 6:
Kultivační médium
pro *Arabidopsis thaliana* – minimální.

F2-generace rostlin byla pěstována *in vitro* cca 5 dní a následně byla snímána pod mikroskopem Olympus Provis AX 70 (Olympus Optical Co., Ltd, Tokyo, Japan), filtr U-MWIB. Byly vybrány jen ty rostliny, které vykazovaly fluorescenci GFP v kořenech. Tyto rostliny byly z misek přesazeny na jiffy a nesterilně pěstovány dalších cca 5 dní. Poté byly nechány na jiffech jen ty rostliny, které vykazovaly fenotyp zkroucených trichomů. Tyto rostliny byly následně genotypovány a vybrány pouze homozygotní mutantní rostliny pro jeden nebo dva geny, kódující podjednotky ARP2/3 komplexu.

7.3 Porovnání fenotypů mutantů *Arabidopsis thaliana*

7.3.1 Měření maturace děložních a pravých listů pěstovaných *ex vitro*

Semena rostlin byla před nasetím dva dny stratifikována a nasetá do jiffy. Rostliny byly kultivovány při fotoperiodě 16/8 a při 23°C. Po šesti dnech kultivace bylo zahájeno měření délky děložních listů a následně pravých listů. Děložní i pravé listy rostlin pěstovaných *ex vitro* byly měřeny každý druhý den po dobu 32 dní. Listy byly měřeny přiřkládáním milimetrového papíru.

7.3.2 Měření maturace děložních listů pěstovaných *in vitro*

Sterilizovaná a stratifikovaná semena byla vyseta sterilně *in vitro* na minimální MS medium (Tabulka 6) na hranaté misky 12 cm x 12 cm uzavřené parafilmem. Tyto misky byly postaveny vertikálně pod úhlem cca 5°. Rostliny byly kultivovány při fotoperiodě 16/8 a při 23°C. Po 14 dnech růstu byly rostlinám ustříženy děložní listy, uzavřeny mezi podložní a krycí sklo ve vodním prostředí, a vyfoceny fotoaparátem Nikon D 3200. Fotografie děložních listů byly pak zpracovány v programu ImageJ

(<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) pomocí funkce pro měření délky a plochy. Jako určení měřítka fotografie sloužilo pravítko vyfocené spolu s preparáty.

7.3.3 Projasňování listů - projev zkroucených trichomů

Pro pozorování zkroucených trichomů z rostlin pěstovaných *ex vitro* byl brán pátý maturovaný list a celý byl ponořen do projasňovacího roztoku (120g $C_2H_3Cl_3O_2$, 7,5ml glycerol, 50ml vody). Po třech dnech v roztoku byl list uzavřen do preparátu mezi podložní a krycí sklo v projasňovacím roztoku a preparáty byly pozorovány pod binolupou (Nikon C-0) pod zvětšením 45x, vybavené fotoaparátém Nikon D 3200.

7.3.4 Hodnocení cirkularity pokožkových buněk pravých listů – obtisky

Metoda obtisků byla přejata od prof. Doroty Kwiatkowské (Universita Śląski v Katovicích). Na maturované páté listy byla aplikována rychle tuhnoucí zubařská směs pro přípravu zubních obtisků (Take1, Kerr sybron dental specialist), čímž byl vytvořen obtisk listu. Na povrch tohoto obtisku byl nanesen průhledný lak na nehty a po zaschnutí byl sloupnut a nasnímán mikroskopem (Olympus Provis AX 70) jako vodní preparát. Nasnímané obtisky byly poslány na analýzu cirkularity pokožkových buněk prof. Dorotě Kwiatkowské.

7.3.5 Hodnocení cirkularity pokožkových buněk děložních listů – FM4-64

FM4-64 (Molecular Probes, kat. číslo T13320, N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(diethylamino)phenyl) hexatrienyl)pyridinium dibromide) je netoxické lipofilní styrylové barvivo, které je ve vodním roztoku nefluorescenční. Předpokládá se, že barvivo je inkorporováno do vnější lipidové vrstvy plazmatické membrány, čímž se stává silně fluorescenčním. Maturované 14-denní děložní listy *Arabidopsis thaliana* byly odstřiženy z rostlin pěstovaných *in vitro*. Hodinu před pozorováním byly děložní listy vloženy do 32 μ M vodného roztoku FM4-64. Použit byl 20 mM zásobní roztok v DMSO. Listy byly pozorovány a snímány konfokálním mikroskopem Leica TCS NT (Leica Microsystems Heidelberg GmbH) s nastavením excitace 514 nm a emise při 650 – 750 nm. Byl využit objektiv 20x s vodní imerzí. Snímky byly upraveny v programu ImageJ a byla změřena

plocha, obvod a cirkularita pokožkových buněk děložních listů. Cirkularitu program ImageJ počítá na základě vzorce:

$$f_{circ} = \frac{4\pi A}{P^2}$$

π = matematická konstanta, která udává poměr obvodu jakéhokoli kruhu v eukleidovské rovině k jeho průměru.

Její hodnota v desítkové soustavě je přibližně 3,14159

A (area) = plocha rovinného útvaru

P (perimeter) = obvod, délka hraniční křivky, rovinného útvaru

7.3.6 Měření délky kořenů *A. thaliana* rostoucí in vitro

Rostliny *A. thaliana* byly nasazeny (cca. 20 semen) na minimální MS medium (Tabulka 6) na hranatých miskách 12 cm x 12 cm uzavřených parafilmem. Tyto misky byly postaveny vertikálně pod úhlem cca 5°. Rostliny byly kultivovány při fotoperiodě 16/8 a při 23°C. Misky s rostlinami byly foceny fotoaparátem Nikon D 3200 14. den růstu rostlin. Snímky byly zpracovány v programu ImageJ, kde byla rostlinám změřena délka kořene.

7.3.7 Měření gravitropismu kořene *Arabidopsis thaliana*

Rostliny *Arabidopsis thaliana* byly nasazeny (cca. 20 semen) na minimální MS medium (Tabulka 6) na hranatých miskách 12 cm x 12 cm uzavřených parafilmem. Tyto misky byly postaveny vertikálně pod úhlem cca 5°. Rostliny byly kultivovány při fotoperiodě 16/8 a při 23°C. Po 4 dnech růstu rostlin byly misky zabaleny do dvou vrstev alobalu, aby byly plně ve tmě a na 12 hodin byly misky otočeny o 90°. Poté byly rostliny vyfoceny fotoaparátem Nikon D 3200. Úhel ohnutí kořene byl změřen pomocí programu ImageJ a v něm zabudovaným nástrojem – angle tool.

7.4 Projev mutace na úrovni buněk

7.4.1 Konfokální mikroskopie - pozorování vakuolárního systému

Barvivo FM4-64 je membránový marker a je inkorporováno do dalších lipidových struktur v buňce pomocí endocytotických procesů. Po dlouhodobém probarvení lze v rostlinné buňce pozorovat též systém vakuomu. Nasazeným rostlinám *in vitro* byl uštížen maturovaný děložní list a ponořen na 24 hodin do 32 μ M roztoku s FM4-64. Po 24

hodinách byly listy pozorovány pod konfokálním mikroskopem Leica TCS NT, objektiv 20x s vodní imerzí.

7.4.2 Konfokální mikroskopie – počet a svazkování aktinových vláken

Rostliny *A. thaliana* exprimující cytoskeletální marker GFP-fimbrin byly kultivovány *in vitro* po dobu 5 dní. Po pěti dnech byl z celých rostlin vytvořen vodní preparát. Pod konfokálním mikroskopem Leica TCS NT, objektiv 63x s vodní imerzí byly pozorovány pokožkové buňky děložních listů. Byl využit Ar/Kr (488 nm) laser pro pozorování GFP. Nasnímané série řezů buňkami, kde byl snímán kortikální aktinový cytoskelet, pak byly analyzovány v programu Fiji (<http://fiji.sc>). Pro analýzu je třeba vybavit program Fiji o tyto přídatné podprogramy:

MBF plugin collection (<http://rsbweb.nih.gov/ij/plugins/mbf-collection.html>), Kashiwa BioImaging plugin collection (<http://hasezawa.ib.k.u-tokyo.ac.jp/zp/Kbi/ImageJKbiPlugins>), Higaki Laboratory macros (<http://hasezawa.ib.k.u-tokyo.ac.jp/zp/Kbi/HigStomata>), a jako poslední Multiple Kymograph dostupný na stránce <http://www.embl.de/eamnet/html/kymograph.html>.

7.5 Porovnání genové exprese podjednotek - *in silico* analýza

7.5.1 Porovnání genové exprese podjednotek – Genevestigator

Při porovnávání genové exprese podjednotek byla použita data získaná z databáze Genevestigator (<https://www.genevestigator.com/gv/plant.jsp>). Genevestigator je databáze, která shromažďuje data z microarray experimentů, které byly provedeny a publikovány. V současné době databáze obsahuje a pracuje s 8 937 položkami o genové expresi v rostlině *Arabidopsis thaliana*. Zkoumané geny pro podjednotky ARP2/3 komplexu byly do databáze zadávány podle svých systematických názvů, které jim byly přiřazeny na základě jejich čtecího rámce na konkrétním chromosomu - Tabulka 7. Data pro podjednotky ARPC2b a ARPC4 databáze neobsahuje. V databázi byly použity tyto nástroje pro získání údajů o genové expresi podjednotek ARP2/3 komplexu:

1. Condition search tools – umožňuje stanovit, v jakých pletivech a s jakou intenzitou (procentuálně vyjádřeno) jsou geny přepisovány (nástroj – anatomy) a jaká je závislost

exprese jednotlivých genů na vývojových stádiích *Arabidopsis thaliana* (nástroj – development).

2. Similarity search tools – umožňuje testovat, zda set zadaných genů spolu na základě jejich exprese koreluje - vytváří shluky genů, které mají podobnou expresi (nástroj - hierarchical clustering), dále umožňuje zjistit, které geny jsou nejvíce korelovány v přepisu s jednotlivými geny pro podjednotky ARP2/3 komplexu (nástroj - Co-expression).

<i>ARP2</i> - AT3G27000
<i>ARP3</i> - AT1G13180
<i>ARPC1a</i> - AT2G30910
<i>ARPC1b</i> - AT2G31300
<i>ARPC2b</i> - AT1G30825
<i>ARPC3</i> - AT1G60430
<i>ARPC5</i> - AT4G01710

Tabulka 7: Systematické názvy genů pro podjednotky ARP2/3 komplexu.

Jako potvrzení klastrování podjednotek ARP2/3 komplexu byly podjednotky zadány do databáze spolu s dalšími náhodně vybranými 20 geny, tento postup byl opakován čtyřikrát.

7.5.2 Analýza promotorové oblasti genů podjednotek – *AtcisDB*

Byla porovnána promotorová oblast podjednotek ARP2/3 komplexu pomocí *Arabidopsis cis-regulatory element* databáze (<http://arabidopsis.med.ohio-state.edu/AtcisDB/>). Do databáze byly zadány systematické názvy genů pro podjednotky ARP2/3 komplexu (tabulka 7) a databáze vyhledala predikované vazebné motivy transkripčních faktorů regulujících přepis genu, které se nachází v jeho promotorové oblasti. Tyto oblasti byly porovnány mezi jednotlivými podjednotkami a spolu s porovnáním vůči náhodně vybraným 16 různým genům bylo určeno, jaké vazebné motivy jsou podjednotkám společné a jaké jsou rozdílné.

8 Výsledky

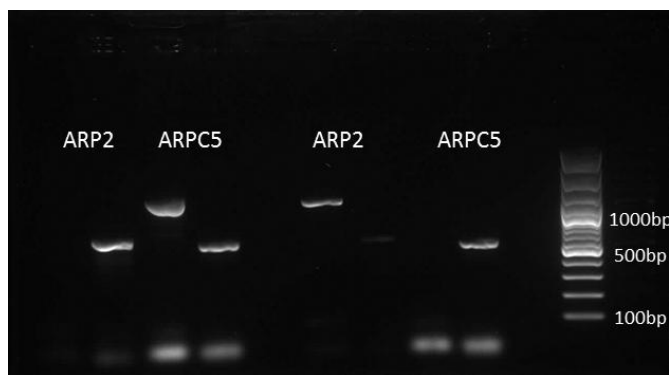
8.1 Získání rostlin nesoucích mutaci ve dvou genech ARP2/3 komplexu

8.1.1 Rostliny nesoucí mutaci ve dvou genech ARP2/3 komplexu

Na začátku práce byly vybrány čtyři rostliny *Arabidopsis thaliana*, které nesou mutaci (T-DNA inzerci) v genech pro jednotlivé podjednotky ARP2/3 komplexu - rostliny *arp2*, *arpc3*, *arpc4* a *arpc5* (ARPC5-malá stabilizační podjednotka, ARP2-jedna ze základních podjednotek ARP2/3 komplexu, která tvoří místo růstu nového aktinového vlákna, ARPC3 -podjednotka sousedící s mateřským aktinovým vláknem, stabilizační podjednotka a ARPC4-podjednotka ve středu komplexu). Tyto mutantní rostliny byly zkříženy mezi sebou. Rostliny, které vyrostly z jejich F2 generace semen, byly genotypovány (Obrázek 3) a dále jsem pracovala s homozygotními liniemi rostlin obsahujícími mutaci v jedné i ve dvou podjednotkách ARP2/3 komplexu. Dvojití homozygoti nesoucí mutaci ve dvou a více podjednotkách komplexu ARP2/3 nejsou v současné době podle publikovaných výsledků k dispozici a jedná se tedy o unikátní materiál k výzkumu. Během vypracovávání této práce ARP2/3 bylo získáno šest homozygotních dvojitých mutantů s kombinací mutací v genech pro různé podjednotky (Tabulka 8). V ani jednom případě mutace druhého genu podjednotky ARP2/3 komplexu nebyla pro rostlinu letální.

<i>arp2/arpc5</i>
<i>arp2/arpc4</i>
<i>arp2/arpc3</i>
<i>arpc3/arpc4</i>
<i>arpc3/arpc5</i>
<i>arpc4/arpc5</i>

Tabulka 8:
Homozygotní dvojití mutanti v podjednotkách ARP2/3 komplexu.



Obrázek 3: Příklad genotypování dvojitého mutantu *arp2/arpc5* pro dvě rostliny. První rostlina je homozygot *arp2* a *arpc5* heterozygot. Druhá rostlina má opačný genotyp. Marker -GeneRuler 100bp.

Tato práce se v dalších experimentech zaměřuje především na práci s dvojitými mutanty *arp2/arp4* a *arp4/arp5*. Práce se všemi šesti získanými dvojitými mutanty v podjednotkách ARP2/3 komplexu by nebyla z časových důvodů možná.

8.1.2 Dvojité mutanty s GFP - cytoskeletálními markery

Do získaných vícečetných mutantních rostlin byly nakříženy markerové linie *Arabidopsis thaliana* nesoucí standartní *in vivo* markery pro cytoskelet: – clathrin-GFP, GFP-fimbrin (GFP-FABD) a GFP-tubulin. Toto značení umožňuje pozorovat strukturu a případně dynamiku mikrotubulárního i aktinového cytoskeletu v mutovaných rostlinách *in vivo* a také pohyb endomembránového systému. Tyto markery byly již k dispozici na pracovišti. K další práci byly vybrány rostliny homozygotní pro jednu nebo dvě podjednotky ARP2/3 komplexu a s nakříženou funkční markerovou linií, získané a genotypováním ověřené rostliny jsou vypsány v Tabulce 9:

GFP-clathrin	<i>arp2, arp4, arp5</i>
	<i>arp2/arp3, arp2/arp4, arp5/arp4</i>
GFP-fimbrin	<i>arp4, arp5</i>
	<i>arp3/arp4, arp3/arp5, arp4/arp5</i>
GFP-tubulin	<i>arp2, arp5</i>
	<i>arp2/arp4, arp3/arp5</i>

Tabulka 9: Rostliny homozygotní v mutaci genu pro jednu nebo dvě podjednotky ARP2/3 komplexu s nakříženou funkční markerovou linií.

Mutantní rostliny GFP-markery neumlčovaly. S mutantními rostlinami, které nesou markery: clathrin-GFP a GFP-tubulin jsem v průběhu této práce z časových důvodů nepracovala. Experimenty byly provedeny pouze s dvojitým homozygotním mutantem *arp4/arp5* GFP-fimbrin.

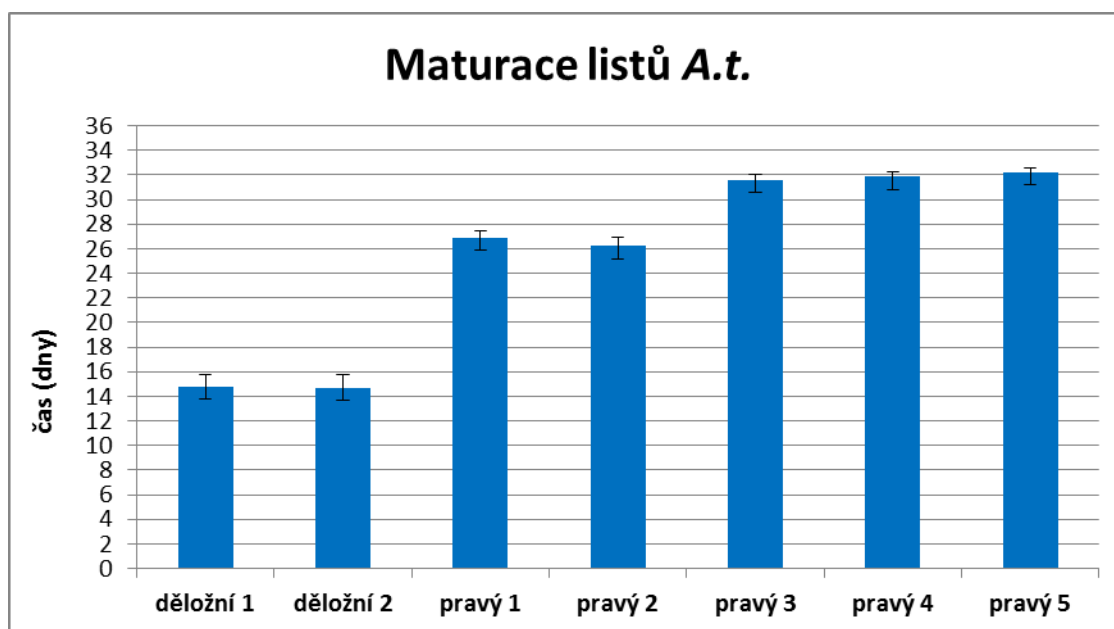
8.2 Porovnání fenotypů mutantů *Arabidopsis thaliana*

-list

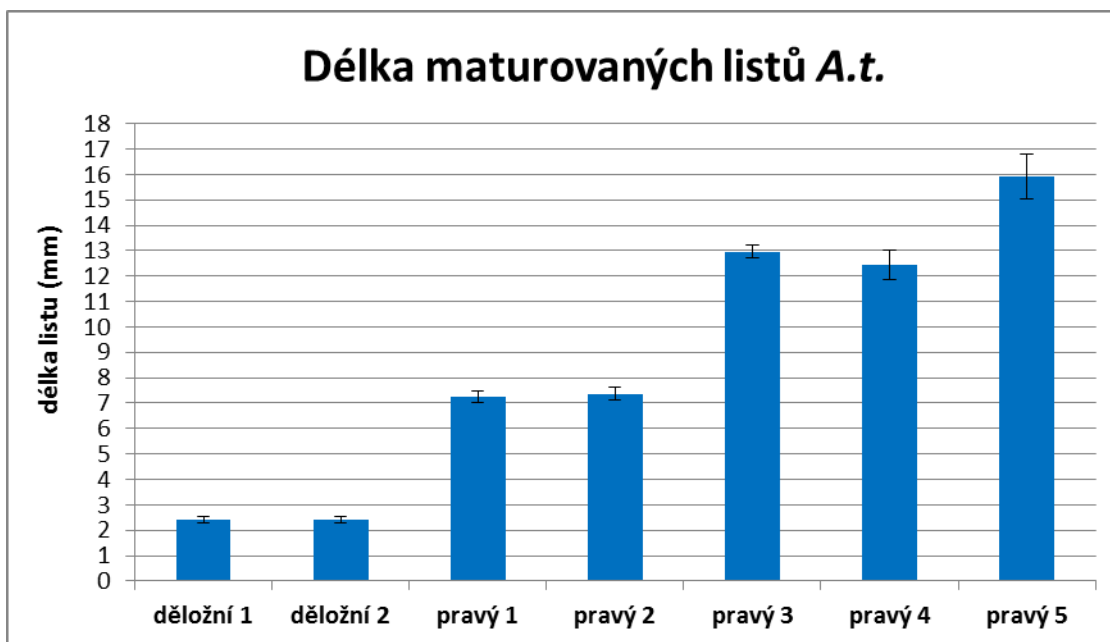
8.2.1 Maturace děložních a pravých listů rostlin pěstovaných ex vitro

Rostliny nesoucí mutace v genech kódujících podjednotky ARP2/3 komplexu vykazují nejvýraznější fenotypy při formování listů – kratší laloky pokožkových buněk, mezery

v epidermis listu, zkroucené trichomy. Z toho důvody byly nejprve provedeny experimenty, které měly za úkol ověřit a mezi jednotlivými mutantními liniemi porovnat již známé fenotypové projevy mutace právě na listech. Pro tento účel byla studována dynamika růstu a maturace (dokončení růstu) jednotlivých listů v našich kultivačních podmínkách. Pouze dobré zmapování dynamiky růstu umožní porovnávat vždy listy ve stejné fázi růstu. Fenotyp změn tvaru pokožkových buněk se zjišťuje na maturovaných listech, které již dále nezvětšují svůj povrch a u nichž je růst buňky považován za ukončený. Z Grafu 1 je patrné, že děložní listy dosáhly konečné délky okolo 14-15 dne po nasazení rostliny, právě první dva listy okolo 26 dne po vyklíčení a třetí, čtvrtý a pátý list dosáhly maturace po cca. 30 dnech po nasazení rostlin do jiffů. Graf 2 udává konečnou délku maturovaných listů. Děložní listy přestaly růst při délce 2,41 mm, první dva pravé listy dosáhly délky přes 7 mm, třetí a čtvrtý pravý list vyrostly zhruba do 14 mm a poslední měřený pátý pravý maturovaný list měl délku okolo 16 mm. Tyto výsledky byly využity při vybírání a určení maturovaných pravých pátých listů, u kterých byla měřena cirkularita pokožkových buněk.



Graf 1: Graf znázorňující čas od nasetí semene do maturace děložních a prvních pěti pravých listů rostlin *Arabidopsis thaliana* Col-0 (WT). Rostliny byly kultivovány v rašelinových válečcích při fotoperiodě 16/8 a 23°C. Chybové úsečky představují směrodatné odchylky.



Graf 2: Graf znázorňující konečné délky maturovaných listů *Arabidopsis thaliana* Col-0 (WT). Rostliny rostly *ex vitro* na jiffech při fotoperiodě 16/8 a při 23°C Chybové úsečky představují směrodatné odchylky.

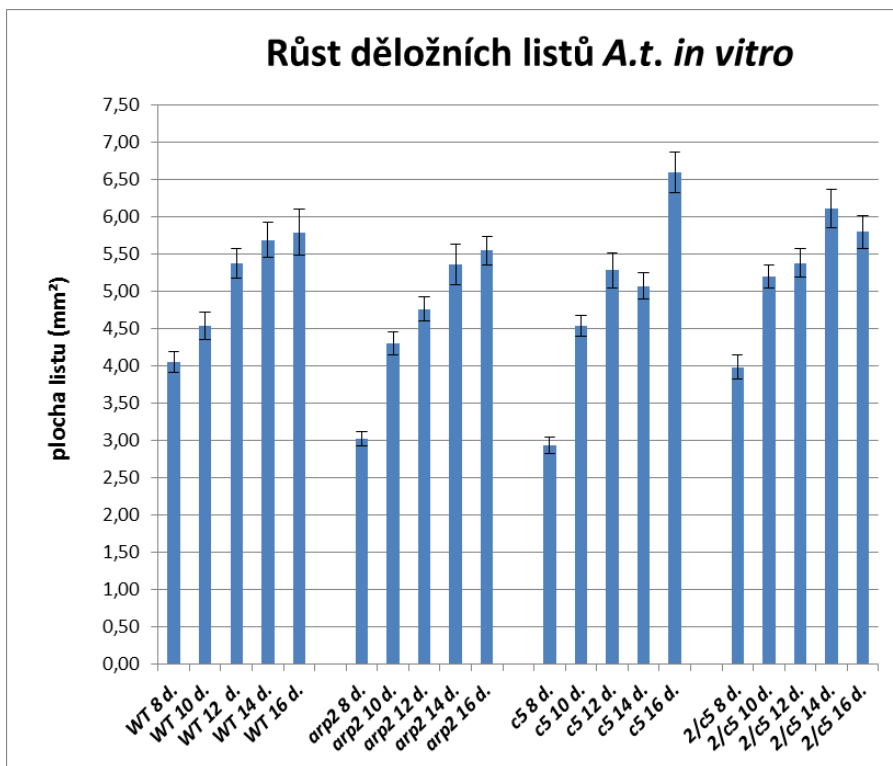
8.2.2 Maturace děložních listů rostlin pěstovaných *in vitro*

Dynamika růstu rostlin na rašelinových válečcích se liší od dynamiky růstu rostlin *in vitro*. V dalším experimentu proto bylo provedeno měření pro zjištění dynamiky růstu děložních listů, *in vitro* kultivovaných rostlin. Zároveň byla porovnávána dynamika růstu děložních listů WT rostlin a některých rostlin nesoucích mutaci v genech pro ARP2/3 komplex, konkrétně *arp2*, *arpc5* a *arp2/arpc5*.

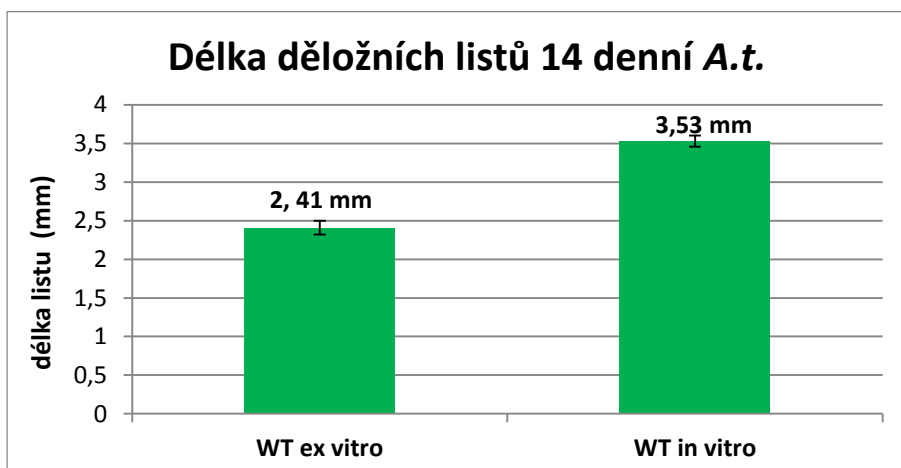
Plochy děložních listů byly měřeny 8, 10, 12, 14 a 16 dní po nasazení rostlin na poloviční MS médium (Graf 3). Je patrné, že všechny rostliny jsou maturované již 14-16 den po nasazení na médium. Největší rozdíly v růstu mezi WT rostlinami a mutovanými rostlinami jsou u rostlin *arpc5*. Zajímavé je, že rostlina, která je mutovaná ve dvou genech pro podjednotky ARP2/3 komplexu, je průběhem růstu svých děložních listů více podobná růstu WT rostlin než jednoduché mutanty.

Graf 4 shrnuje a porovnává výsledky z měření děložních listů *in vitro* a *ex vitro*. Rostliny dosáhly konečné délky děložních listů 14-15 den po nasazení do jiffu či agaru. Děložní listy WT rostlin rostoucích *ex vitro* dosáhly konečné délky cca. 2,41 mm. Ve

srovnání s touto délkou jsou děložní listy rostlin pěstovaných *in vitro* delší, délka jejich děložních listů byla cca 3,53 mm.



Graf 3: Graf 3 uvádí výsledky z měření ploch listu *A.t.* WT i mutovaných v podjednotkách ARP2/3 komplexu. Rostliny rostly na polovičním MS médiu *in vitro* při fotoperiodě 16/8 a při 23°C. Chybové úsečky představují směrodatné odchylky.

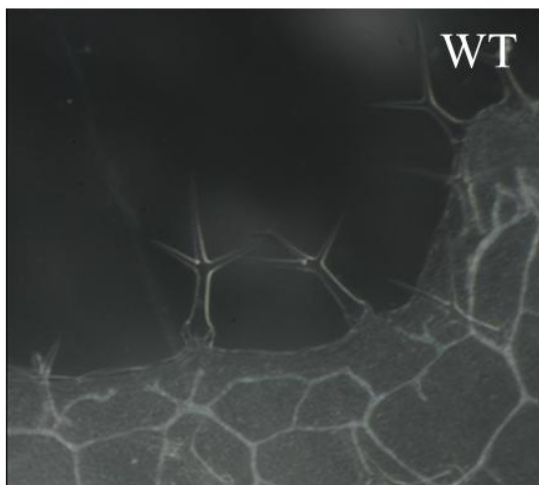


Graf 4: Rostliny rostoucí *in vitro* i *ex vitro*. Rostliny dosáhly konečné délky děložních listů 14-15 den po nasazení do jiffu či agaru. Chybové úsečky představují směrodatné odchylky.

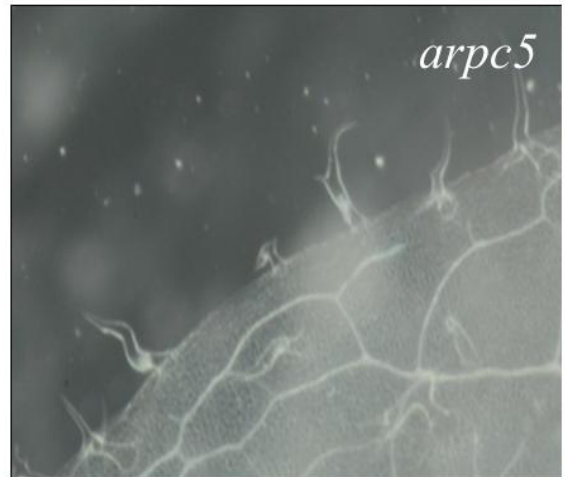
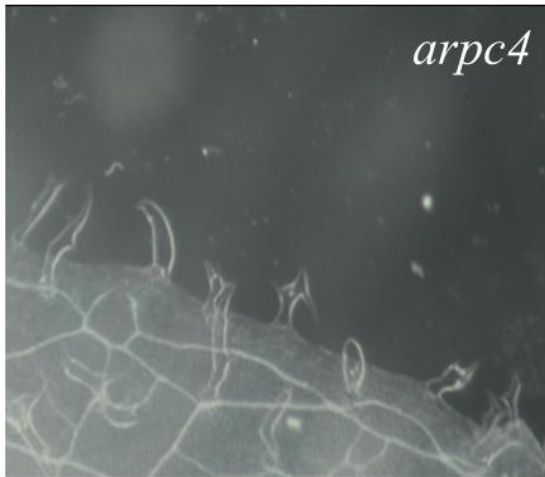
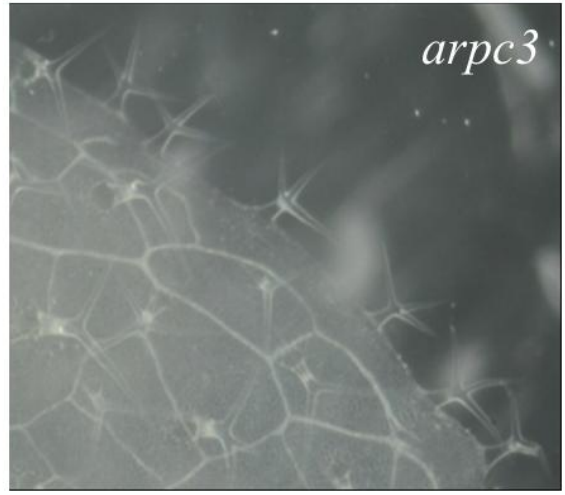
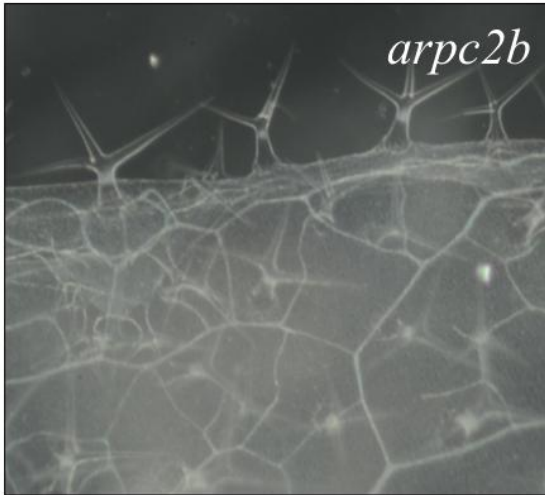
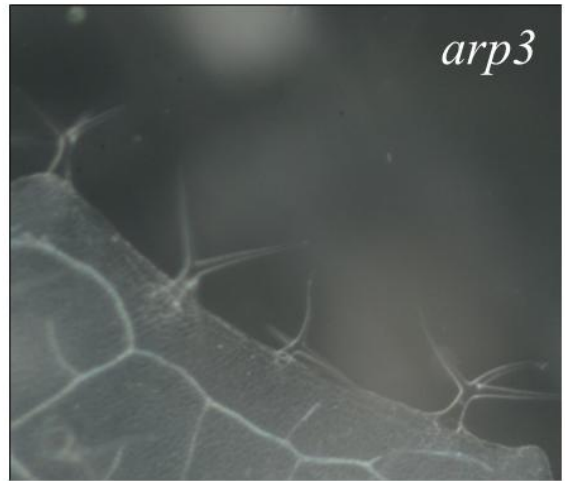
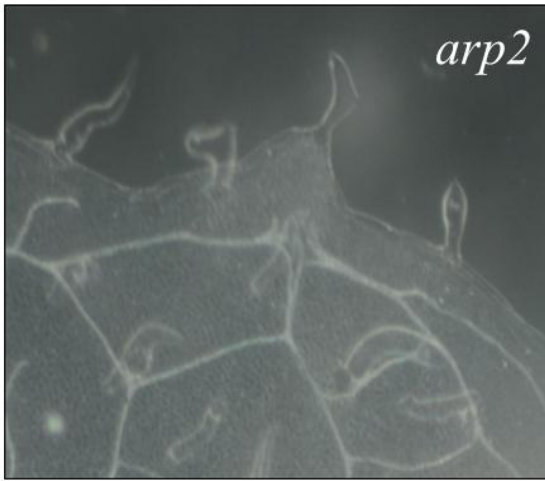
8.2.3 Projev zkroucených trichomů

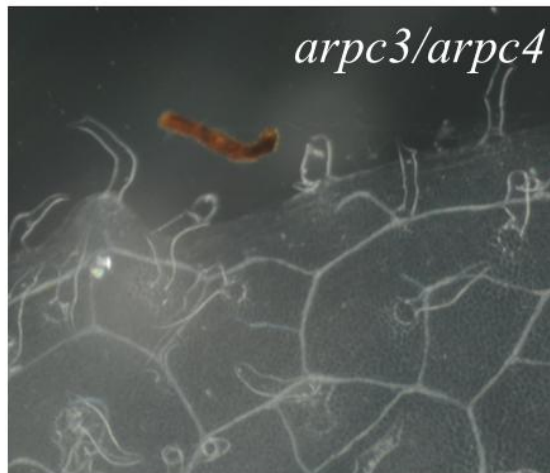
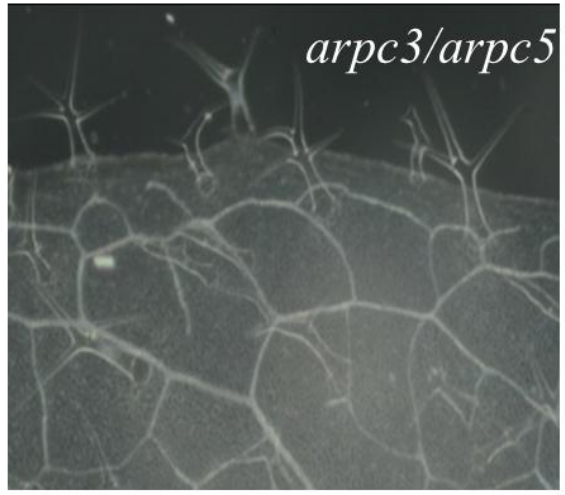
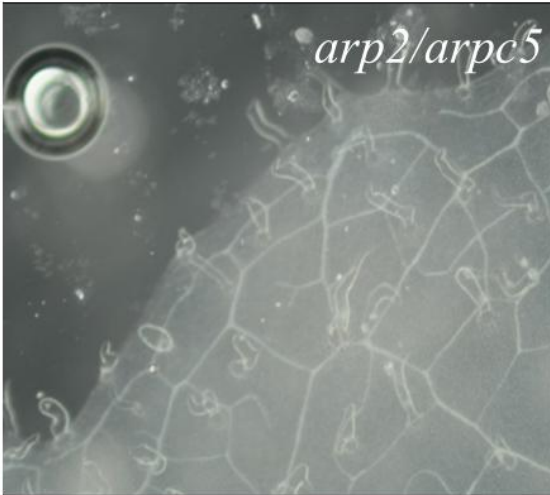
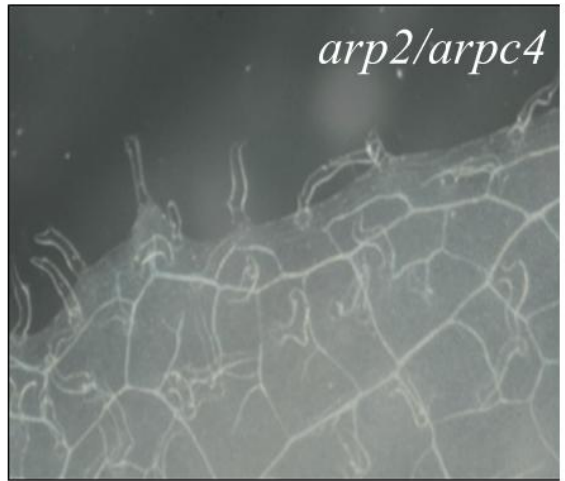
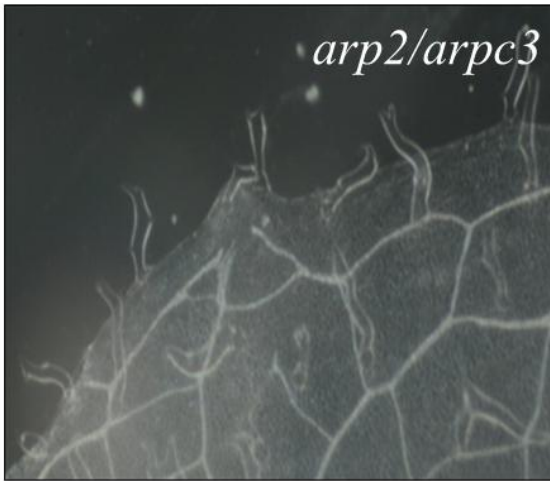
Studium role větvení a růstu trichomů u *arp2/3* mutantních rostlin je velmi zajímavé zvláště proto, že odhaluje roli ARP2/3 komplexu v kontrole buněčné polariry. Právě projev mutovaných zdeformovaných trichomů pravých listů je jedním z nejcharakterističtějších projevů mutace v podjednotkách, či v regulačních faktorech ARP2/3 komplexu (Li et al., 2003).

Na obrázku 4 je dokumentován fenotyp zkroucených trichomů všech mutantních rostlin dostupných na našem pracovišti. Prosvětlené listy byly pozorovány pod binolupou a vyfoceny fotoaparátem Nikon D3200. Z fotografií je dobře patrné, že rostliny *arp3*, *arpc2B* a *arpc3* mají stejnou stavbu trichomů jako WT rostliny. Rostliny *arp2*, *arpc4* a *arpc5* a dvojité mutanty *arp2/arpc5*, *arp2/arpc4*, *arp2/arpc3*, *arpc3/arpc4*, *arpc3/arpc5*, *arpc4/arpc5* mají podobně zdeformované trichomy, které jsou charakteristické pro mutaci v ARP2/3 komplexu. *arpc3/arpc5* rostliny vykazují překvapivý fenotyp blízký WT, ačkoliv *arpc5* rostliny vykazují silný mutantní fenotyp zkroucených trichomů. *arpc3/arpc5* rostliny vykazují dále zvýšený počet čtyřikrát větvených trichomů. Tento výsledek byl shodně pozorován na dalších cca 30 rostlinách.



Obrázek 4: Fotografie trichomů. Všechny vyfocené listy jsou z rostlin pěstovaných *ex vitro* na rašelinových koláčcích při fotoperiodě 16/8 a 23°C. Páté maturované listy byly projasněny a pozorovány pod binolupou (Nikon C-0) pod zvětšením 45x, vybavené fotoaparátem Nikon D 3200.

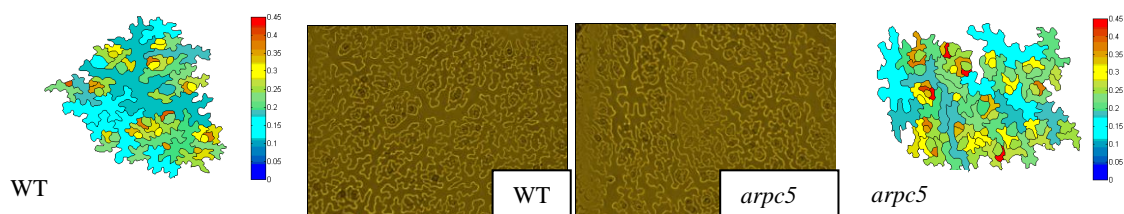




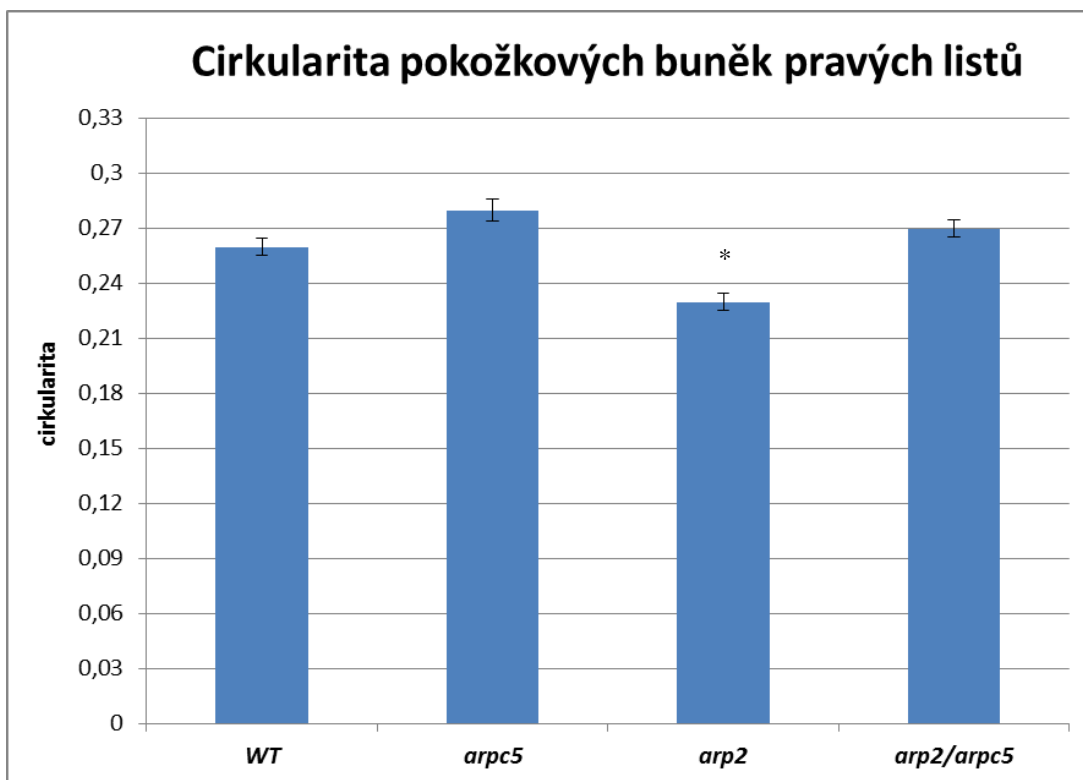
8.2.4 Cirkularita pokožkových buněk pravých listů – obtisky

Dalším charakteristickým projevem mutace v genech ARP2/3 komplexu, který se projevuje na listech, je změněný proces tvorby laloků pokožkových buněk (Li et al., 2003, Mathur et al., 2003, El-Assall et al., 2004). V této práci defekty v tvorbě laloků buněk vyjadřuje veličina zvaná cirkularita. Cirkularita je bezrozměrná veličina vyjadřující tvar na základě porovnání obvodu a plochy objektu. Základní je číslo 1, které je přiřazeno dokonalému kruhu. S narůstající komplexitou tvaru hodnota cirkularity klesá. V případě pokožkových buněk pak hodnoty blíže 1 charakterizují buňku, která vytváří spíše mělké laloky.

Doposud publikované práce dokumentující sníženou tvorbu laloků pokožkových buněk u rostlin postrádajících jednu z podjednotek ARP2/3 komplexu pomocí měření cirkularity se bez výhrad zabývaly děložními listy. S cílem zjistit, zda tento projev mutace lze identifikovat i na pravých listech, byly pořízeny obtisky a následně negativní otisky maturovaného pátého pravého listu rostlin WT, *arp2*, *arpc5* a *arp2/arpc5* (Obrázek 4). Fotografie obtisků byly poslány paní profesorce Dorotě Kwiatkowské na analýzu cirkularity. Analýza prokázala (Graf 5), že u maturovaných pravých listů *A.t.* není detekovatelné žádné signifikantní zvýšení cirkularity pokožkových buněk u mutovaných rostlin ve srovnání s WT. Jediný překvapivý výsledek je snížení cirkularity u rostlin nesoucích mutaci v genu pro podjednotku *arp2*, může to být způsobeno nejnižším počtem měřených pokožkových buněk *arp2* mutantních rostlin.



Obrázek 4: Zjišťování cirkularity pokožkových buněk pravých listů WT rostlin a rostlin mutovaných v podjednotce *arpc5*. Barevná stupnice vyjadřuje míru cirkularity buněk. Modrá barva značí nejméně cirkulární buňky, červená zase buňky, které jsou nejvíce cikulární a tedy se nejvíce blíží tvaru kruhu. K obrázku měření cirkularity je přiložena fotografie obtisku děložních buněk (zvětšení 100x), ze které byl vytvořen. Rostliny rostly *in vivo* na jiffech při fotoperiodě 16/8 a při 23°C.



Graf 5: Analýza cirkularity pokožkových buněk pravých listů (pátý maturovaný list). Rostliny rostly *in vivo* na jiffech při fotoperiodě 16/8 a při 23°C. Chybové úsečky na základě Kruskal-Wallis stats; $p=0.05$. Značení (*) znamená, že pravděpodobnost získaného výsledku je mezi 5% a 001%.

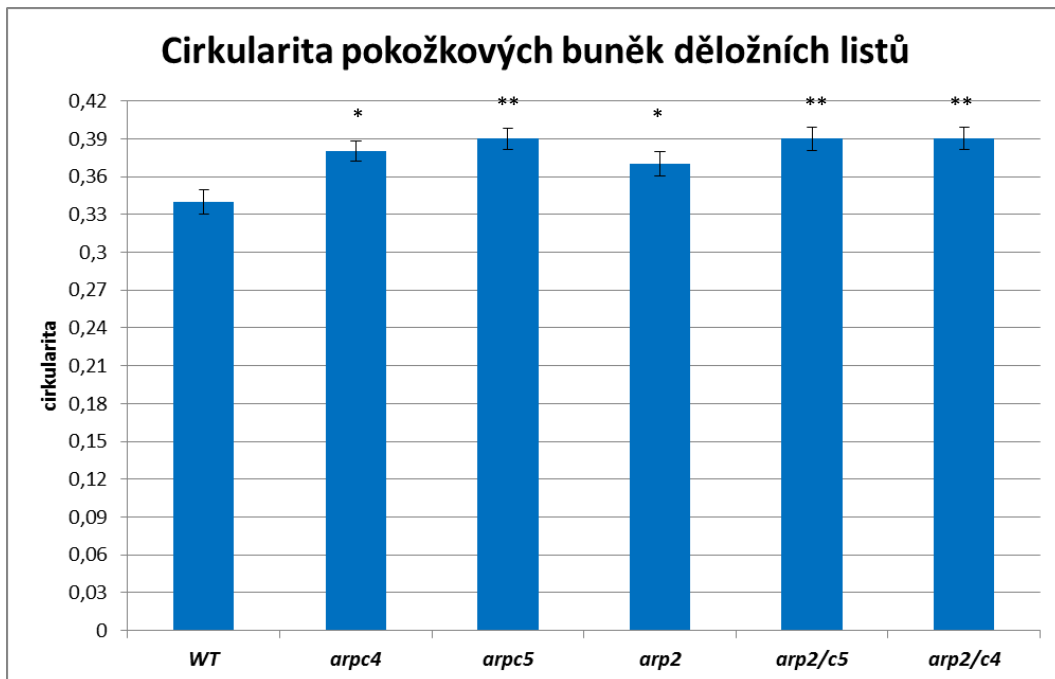
8.2.5 Cirkularita pokožkových buněk děložních listů – FM4-64

Vzhledem k odlišnému charakteru pravého listu rostlin kultivovaných *ex vitro* a děložního listu rostlin kultivovaných *in vitro* bylo nemožné použít pro hodnocení tvaru pokožkových buněk děložních listů metodu obtisků. Použita byla tedy metoda fluorescenčního značení plazmatické membrány pokožkových buněk pomocí barviva FM4-64. Obarvené listy byly pozorovány pod konfokálním mikroskopem a cirkularita byla hodnocena pomocí programu ImageJ. Hodnoceny byly rostliny WT, *arpc5*, *arpc4*, *arp2* a dvojité mutanty *arp2/arpc5* a *arp2/arpc4* (Graf 6). Výsledky prokázaly, že všechny mutantní rostliny vykazují zvětšenou hodnotu cirkularity, což znamená, že mají méně laločnaté pokožkové buňky. Cirkularita se nelišila u rostlin mutovaných v jedné, nebo dvou podjednotkách ARP2/3 komplexu (Graf 6).

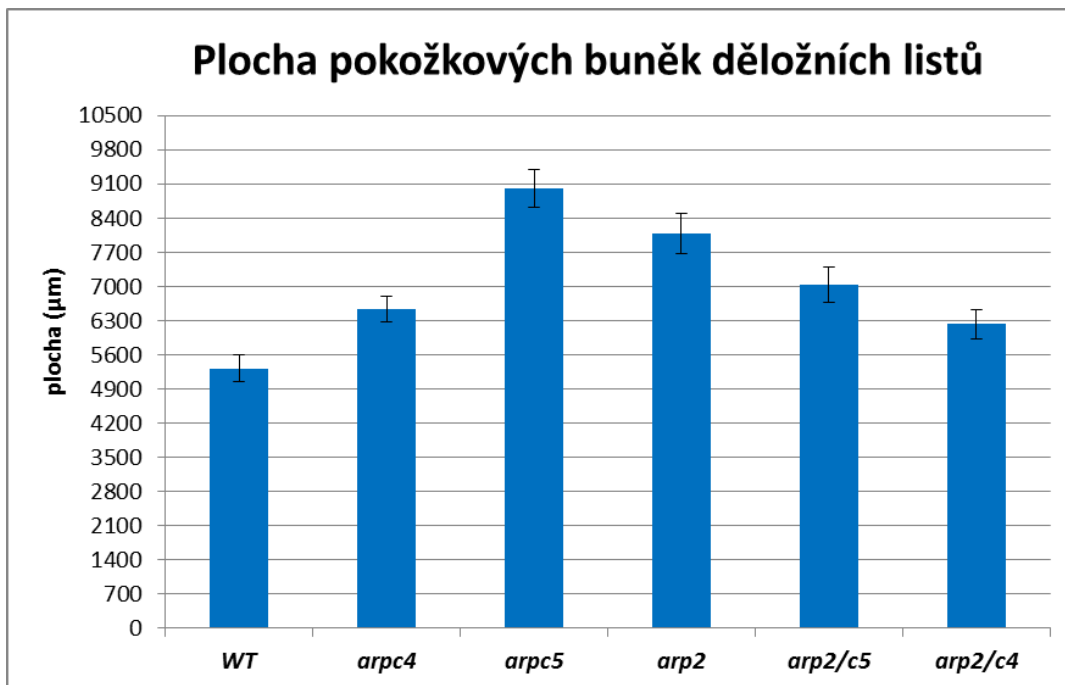
Kromě cirkularity byla hodnocena i plocha pokožkových buněk (Graf 7). Rostliny *arp2* a *arpc4* měly zřetelně větší plochy pokožkových buněk. Plocha pokožkových buněk

dvojitých homozygotů se opět překvapivě blížila více hodnotám WT rostlin, než plochám buněk jednotlivých homozygotů. Všechny mutantní rostliny nicméně shodně vykazovaly zvětšenou plochu pokožkových buněk děložních listů (Graf 7).

Lze tedy shrnout, že pokožkové buňky maturovaných děložních listů mutantních rostlin vykazovaly menší cirkularitu, což je ve shodě s publikovanými daty, a také větší plochu buněk. Naopak tento fenotyp není detekovatelný na pravých listech, kde se cirkularita všech linií nelišily od WT.



Graf 6: Graf vyjadřuje cirkularitu pokožkových buněk děložních listů. Rostliny rostly na polovičním MS médiu *in vitro* při fotoperiodě 16/8 a při 23°C. Pro ověření výsledků byl proveden t-test - značení (*) znamená, že pravděpodobnost získaného výsledku je mezi 5% a 001%, (**) znamená, že pravděpodobnost výsledku je menší než 0,01%). Chybové úsečky představují směrodatné odchytky.



Graf 7: Graf vyjadřuje plochu pokožkových buněk děložních listů. Rostliny rostly na polovičním MS médiu *in vitro* při fotoperiodě 16/8 a při 23°C. Chybové úsečky představují směrodatné odchylky.

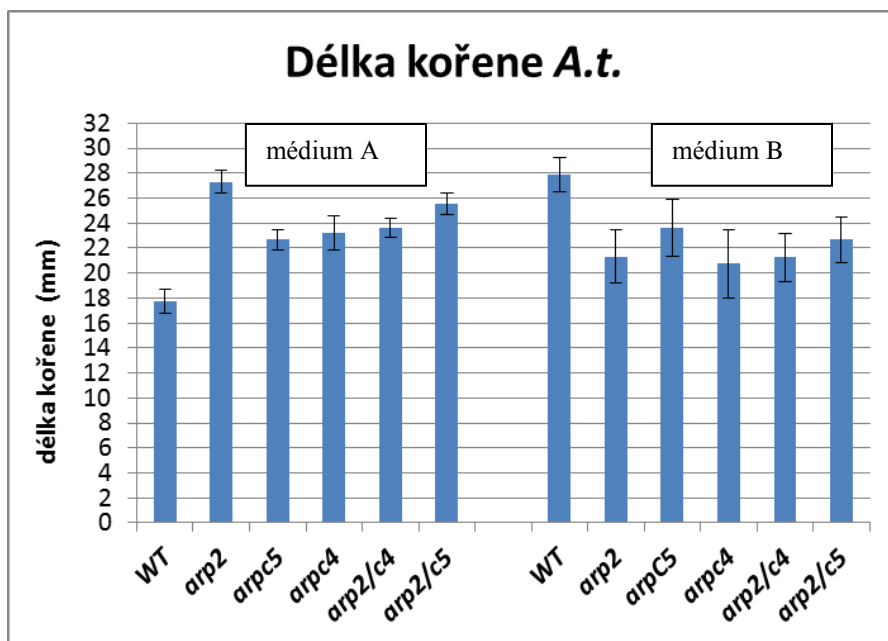
-kořen

8.2.6 Délka kořene rostlin *in vitro* a závislost na složení média

Dalším fenotypem rostlin *A. thaliana* nesoucích mutaci v genu pro *arp2* a *arp3* podjednotku ARP2/3 komplexu byla zkrácená délka hlavního kořene při růstu na médiu bez sacharózy. Kořeny mutantních rostlin také hůře pronikaly do média se zvýšenou koncentrací agarů (Dyachok et al., 2008).

Experiment, kde byl měřen hlavní kořen rostlin mutantních v podjednotkách ARP2/3 komplexu, byl proveden s MS médiem, běžně používaným na našem pracovišti (graf 7 - medium A). Experiment byl zopakován třikrát a všechny měřené mutantní rostliny - *arp2*, *arpc4*, *arpc5* a *arp2/arpc4*, *arp2/arpc5* měly vždy delší hlavní kořen, než měly WT rostliny. Tento výsledek, který je v rozporu s výsledky Dyachok a její skupiny (2008) byl způsoben tím, že v médiu byla přítomna sacharóza. Pokud médium sacharózu neobsahovalo (graf 8 - medium B), kořeny mutantních rostlin byly vždy kratší než kořeny WT rostlin. Rostliny nesoucí mutaci ve dvou genech pro podjednotky ARP2/3 komplexu

opět nevykazovaly relevantně změněné chování ve srovnání s rostlinami mutovanými v jednom genu pro podjednotku ARP2/3 komplexu.

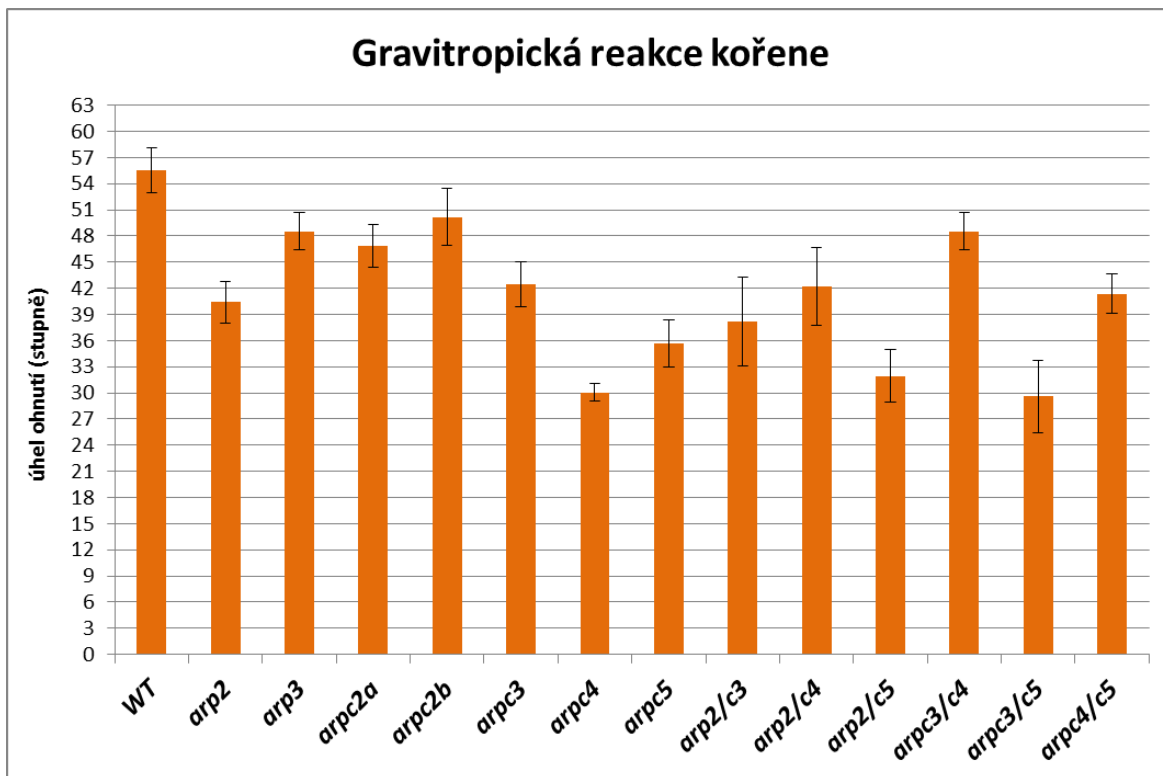


Graf 8: Graf vyjadřuje růst *A. t.* na dvou druzích média: Medium **A** obsahovalo: 1/2MS soli 2, 2 g, sach. 10 g, agar 12 g. Medium **B**: 1/2 MS soli, agar 8 g. Rostliny rostly při fotoperiodě 16/8 a při 23°C. Chybové úsečky představují směrodatné odchylky.

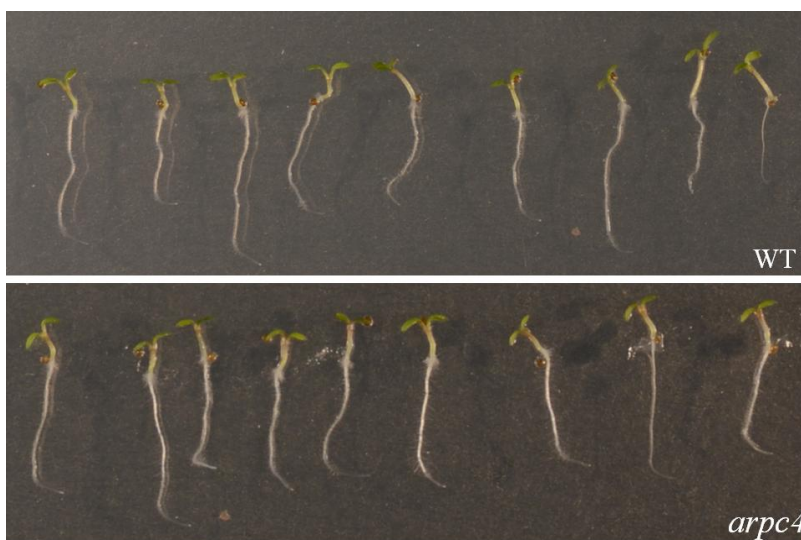
8.2.7 Změny v gravitropické reakci kořene

Po porovnání délek hlavních kořenů *A. thaliana* mutovaných v genech pro podjednotky ARP2/3 komplexu byl ověřen i další fenotyp, popsáný na kořenech mutantních rostlin. Rostliny nesoucí mutaci v genu pro podjednotku *ARP3* vykazovaly zvýšenou odpověď kořene na gravitropický stimul ve tmě - kořeny se ohýbaly v ostřejším úhlu (Reboulet et al., 2009).

Pokus, kde se sledovala odpověď kořene na gravitropický stimul byl proveden se všemi dostupnými mutantními rostlinami v podjednotkách ARP2/3 komplexu. Jak znázorňuje graf 9, všechny mutantní rostliny reagovaly na gravitropický stimul tím, že ve srovnání s WT rostlinami měly ohnutý hlavní kořen v ostřejším úhlu (Obrázek 5).



Graf 9: Graf vyjadřuje odpovědi kořene mutantních rostlin na gravitropický stimul. Kořeny všech mutantních rostlin se ohýbaly v ostřejším úhlu, než kořeny WT. Rostliny byly kultivovány při fotoperiodě 16/8 a při 23°C. Po 4 dnech růstu rostlin byly misky umístěny do tmy na 12 hodin a otočeny o 90°. Všechny rostliny v tomto grafu jsou na pozadí *A. t. Columbia*, pouze rostliny mutantní v podjednotce ARPC2A jsou na pozadí *Lansberg erecta*. Chybové úsečky představují směrodatné odchylky.



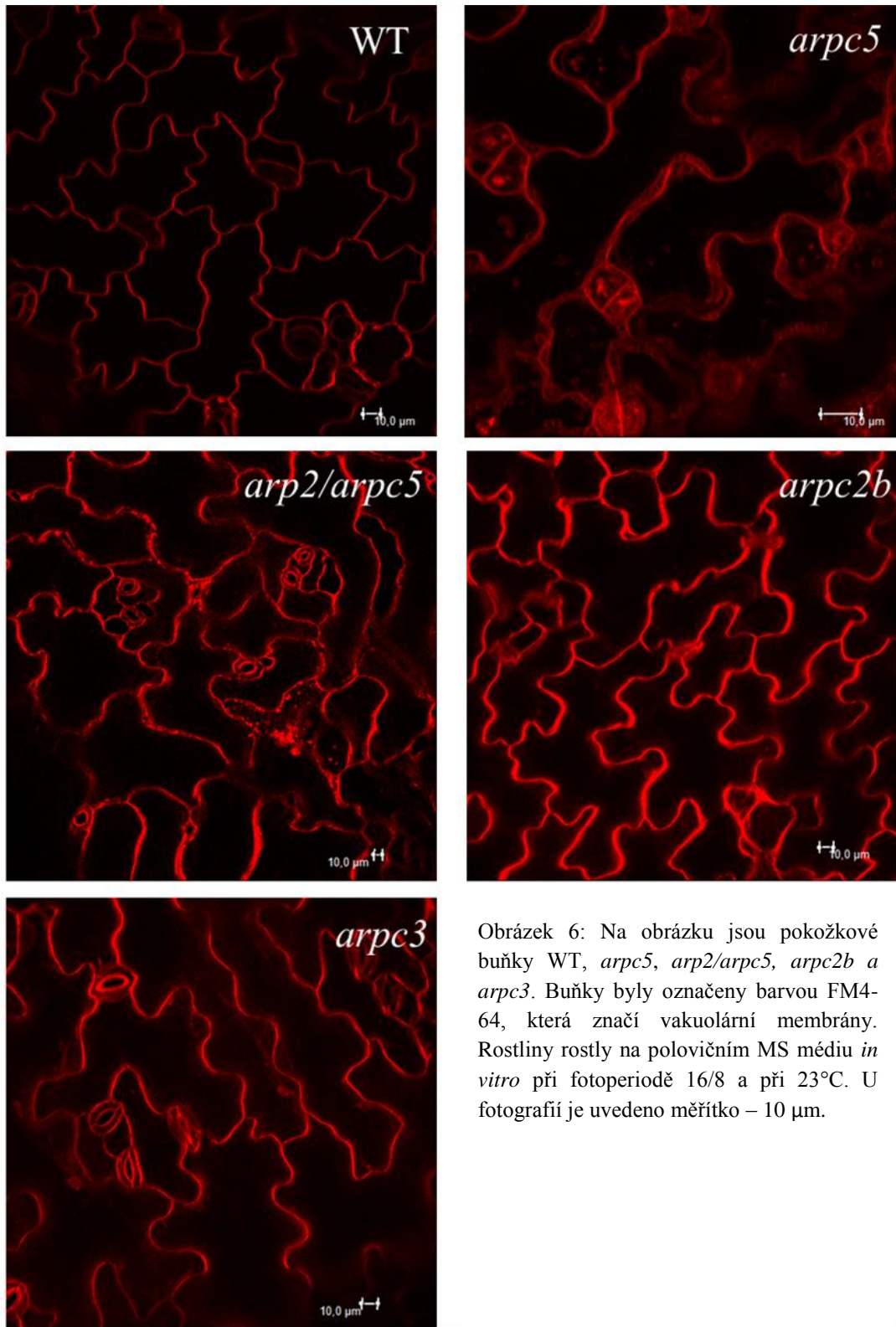
Obrázek 5: Gravitropická reakce kořenů *A. thaliana*. Rostliny byly kultivovány při fotoperiodě 16/8 a při 23°C. Po 4 dnech růstu rostlin byly misky umístěny do tmy na 12 hodin a otočeny o 90°. Na horní fotografii jsou WT rostliny a pod nimi mutantní rostliny *arpc4*.

8.3 Projev mutace na úrovni buněk

V rostlinách, které nesou mutaci v genech ARP2/3 komplexu byly pozorovány a popsány i fenotypy, které se týkají samotného uspořádání organel či dalších struktur v jednotlivých buňkách. Jedním ze základních fenotypů jsou popsány kratší, neorientované svazky mikrofilament a zvýšená tvorba svazků mikrofilament v trichomech a pokožkových buňkách mutantních rostlin. V rostlinách mutovaných v genech pro podjednotky *arp3* a *arpc2* byly nalezeny vakuoly, které vyplňovaly začátky větvení trichomů a v rostlinách s mutovaným genem pro podjednotku *arp2* a *arp3* byla popsána narušená fúze vakuol v trichomech (Mathur et al., 2003, El-Assall et al., 2004).

8.3.1 Fragmentace vakuolárního systému

V této práci je popsán fenotyp fragmentace vakuolárního systému, kdy se v pokožkových buňkách kromě jedné velké centrální vakuoly tvoří při okrajích buněk i větší množství malých blíže nespecifikovaných váčků, pravděpodobně nesfúzovaných minivakuol (Obrázek 6). Tento fenotyp, který pro pokožkové buňky děložních listů *A.t.* ještě nebyl popsán, vykazují všechny rostliny nesoucí mutaci pro geny těchto podjednotek: *arp2*, *arp3*, *arpc2a (ler)*, *arpc2b*, *arpc3*, *arpc4*, *arpc5*, *arp2/arpc5*, *arp2/arpc4*, *arp2/arpc3*, *arpc3/arpc4*, *arpc3/arpc5*, *arpc4/arpc5*. Nejvýraznější fenotyp byl pozorován pro mutantní rostliny *arpc5* a dvojité mutanty *arp2/arpc5* a nejméně byl viditelný v rostlinách mutovaných v genu pro podjednotku *arpc2b*.

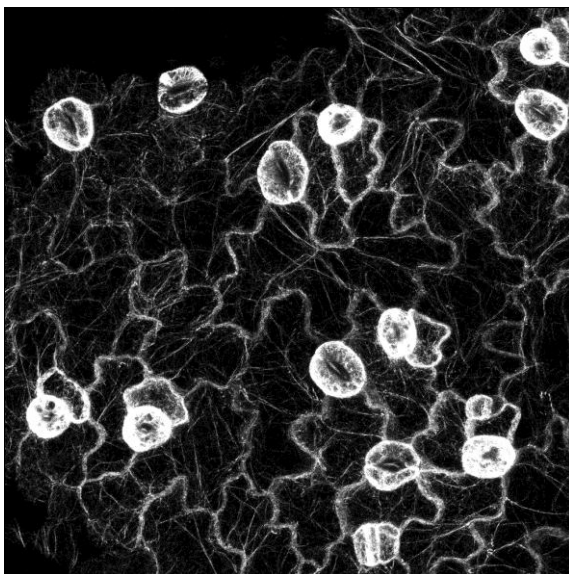


Obrázek 6: Na obrázku jsou pokožkové buňky WT, *arpc5*, *arp2/arpc5*, *arpc2b* a *arpc3*. Buňky byly označeny barvou FM4-64, která značí vakuolární membrány. Rostliny rostly na polovičním MS médiu *in vitro* při fotoperiodě 16/8 a při 23°C. U fotografií je uvedeno měřítko – 10 μm.

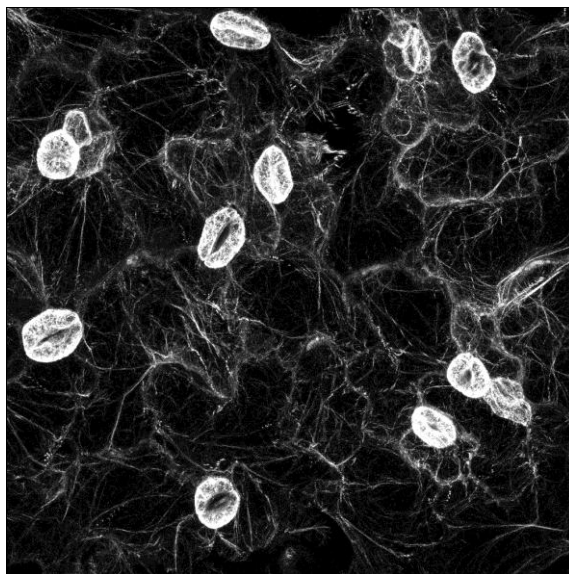
8.3.2 Počet a svazkování aktinových vláken

O mutantních rostlinách, *arp3*, *arp2*, *arp4* a *arp5* je publikováno, že vykazují mutantní fenotyp v organizaci aktinové sítě (Mathur at al., 2003, El-Assall et al, 2004, Kotchoni et al., 2009). Charakteristicky se jedná o tvorbu kratších, neorientovaných svazků mikrofilament a zvýšenou tvorbu svazků mikrofilament v buňkách. Pro ověření tohoto fenotypu v této práci byla vybrána jako zástupce rostlina *arp4/arp5* nesoucí mutaci ve dvou genech ARP2/3 komplexu. Na konfokálním mikroskopu byly pozorovány pokožkové buňky maturovaných děložních listů rostlin pěstovaných *in vitro*. Aktinový cytoskelet byl značen přikříženým markerem GFP-fimbrinem (Obrázek 7 a obrázek 8).

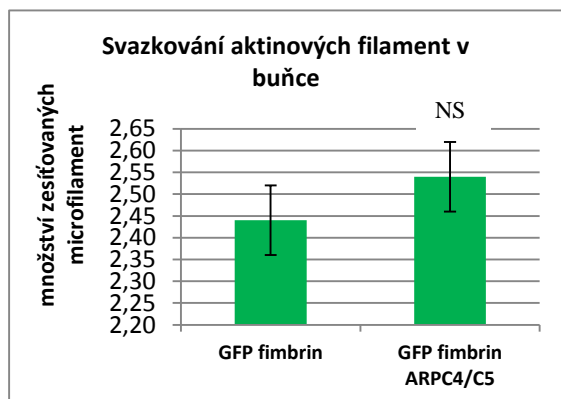
U rostlin, které nesou mutaci *arp4/arp5* byla změřena plocha aktinových filament v buňkách a jejich svazkování. Jak je vidět v grafu 10 a 11, aktinová vlákna tvoří více svazků a je jich v buňce větší množství. Výsledky z grafů se však po provedení t-testu ukázaly jako nesignifikantní. Tento experiment tedy nedokázal projev této mutace u dvojitých mutantních rostlin.



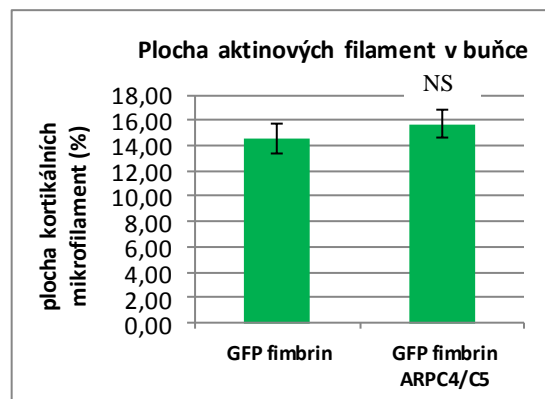
Obrázek 7: Obrázek z konfokálního mikroskopu znázorňuje aktinový cytoskelet v pokožkových buňkách WT exprimujících GFP-fimbrin.



Obrázek 8: Obrázek z konfokálního mikroskopu znázorňuje aktinový cytoskelet v pokožkových buňkách *arp4/arp5* exprimujících GFP-fimbrin.



Graf 10: Graf vyjadřuje svazkování aktinových filament v pokožkových buňkách *A. t.* Kvantifikace pomocí programu p Fiji. Rostliny rostly na polovičním MS médiu *in vitro* při fotoperiodě 16/8 a při 23°C. Značka (NS) značí, že výsledek byl po provedení t-testu nesignifikantní, čili že míra jeho pravděpodobnosti byla větší než 5%. Chybové úsečky představují směrodatné odchylky.



Graf 11: Graf vyjadřuje plochu aktinových filament v pokožkových buňkách *A. t.* Kvantifikace pomocí programu p Fiji. Rostliny rostly na polovičním MS médiu *in vitro* při fotoperiodě 16/8 a při 23°C. Značka (NS) značí, že výsledek byl po provedení t-testu nesignifikantní, čili že míra jeho pravděpodobnosti byla větší než 5%. Chybové úsečky představují směrodatné odchylky.

8.4 Porovnání genové exprese podjednotek – *in silico* analýza

8.4.1 Genevestigator – rozdílná genová exprese podjednotek

Při porovnávání genové exprese podjednotek byla použita data získaná z databáze Genevestigator. Tato data byla využita (obrázek 9) pro zjištění, v jakých pletivech rostlin *A. thaliana* a s jakou intenzitou se podjednotky ARP2/3 komplexu přepisují.

Dalšími otázkami bylo:

- 1) Koreluje přepis podjednotek komplexu mezi samotnými podjednotkami?
- 2) Je v rostlině *A. thaliana* pletivo, ve kterém jsou podjednotky ARP2/3 komplexu přepisovány specificky a kde by se tedy s největší pravděpodobností projevila ztráta funkčnosti komplexu nejvíce?

Korelace přepisu jednotlivých podjednotek ARP2/3 komplexu je podle dat z databáze Genevestigator slabá (obrázek 9). To dokumentuje i další experiment, kdy pro každou podjednotku bylo vyhledáno 50 genů s co nejpodobnější expresí. V seznamu 50 nejpodobněji exprimovaných genů nebyla nalezena další podjednotka komplexu.

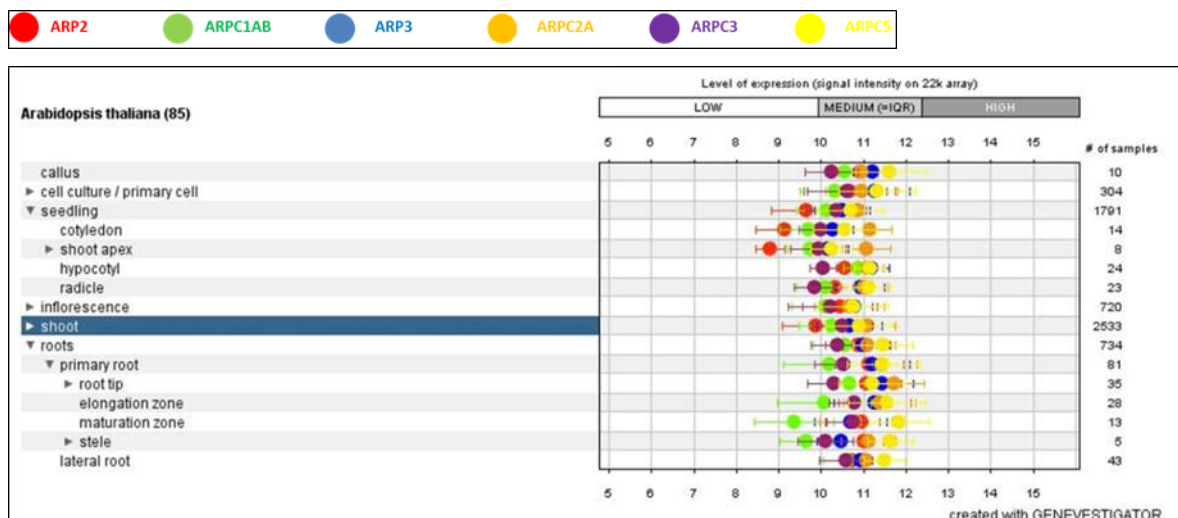
Nejvíce přepisovaným genem je *ARPC5*, dále v sestupném pořadí *ARP3*, *ARPC1ab*, *ARPC2a*, *ARP2* a nejméně se přepisuje *ARPC3* (data dostupná v Příloze 1 – Genevestigator exprese)¹. Data pro podjednotky *ARPC2b* a *ARPC4* databáze neobsahuje.

Expres podjednotek příliš nekoreluje ani v pletivech, ve kterých jsou jednotlivé podjednotky exprimovány v největší míře. V tabulce 11 je uvedeno vždy prvních pět pletiv s nejvyšší mírou exprese vybraných podjednotek. Všechny analyzované geny vyjma *ARPC5* jsou ve vysoké míře exprimovány v kořenovém xylému. *ARPC3* se obecně přepisuje v pletivech ve srovnání s ostatními podjednotkami ARP2/3 komplexu velmi málo, zato je ale velmi specificky a jako jediná z podjednotek ve zvýšené míře přepisována v pylu a v rostoucí pylové láčce. Naproti tomu *ARPC1ab* je ve zvýšené míře přepisován při mikrogametogenezi. Jako specifikum genu *ARPC5* lze uvést zvýšenou expresi při stresové zátěži rostliny a to hlavně při hypoxii, anoxii a oxidativních stresech.

Gen	pletivo s nejvyšší expresí	gen	pletivo s nejvyšší expresí
<i>ARP2</i>	spermatická buňka protfloém kořenů floém kořenů - protoplast xylém kořenů - protoplast listový protoplast	<i>ARPC2a</i>	listové primordium protoplast kořenových vlásků meristematická zóna kořenový kortex floém kořenů - protoplast
<i>ARP3</i>	xylém kořenů - protoplast spermatická buňka pokožka kořene protoplast kořenových vlásků protoplast kořenové čepičky	<i>ARPC3</i>	Pyl xylém kořenů - protoplast protoplast kořenových vlásků svěrací buňky listový protoplast
<i>ARPC1ab</i>	xylém kořenů - protoplast nody kultura ze semenáčků vzrostlý vrchol svěrací buňky	<i>ARPC5</i>	Replum zóna opadu elongační a maturační zóna listový protoplast xylém

Tabulka 11: Tabulka s prvními pěti vybranými pletivy, které mají nejvyšší míru exprese v uvedených genech kódující podjednotky ARP2/3 komplexu. Tabulka byla vytvořena pouze na základě dat z Genevestigatoru.

¹ Veškeré přílohy, na které práce odkazuje, jsou uloženy na CD, které se nachází na zadních deskách práce. Je zde uložena i celá práce ve formátu pdf.

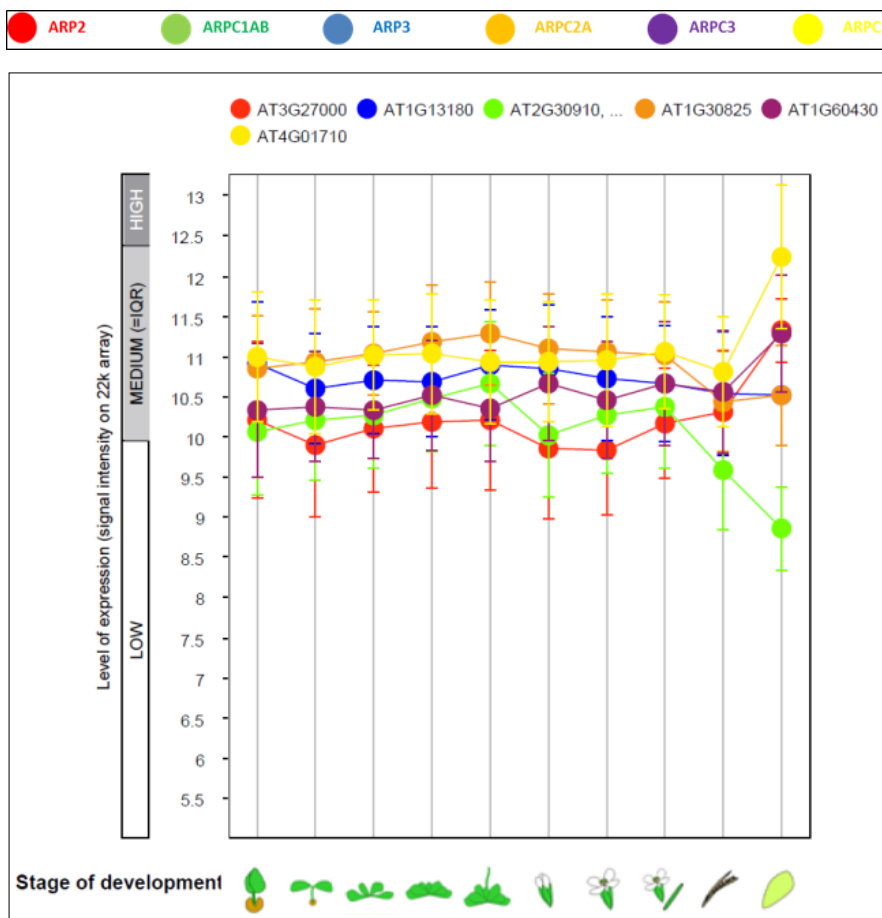


Obrázek 9: Obrázek z databáze Genevestigatoru, kde je v podobě barevných bodů vyznačena míra exprese jednotlivých podjednotek ARP2/3 komplexu. Příslušná barva k označení podjednotek je uvedena nad obrázkem. V obrázku je uveden pouze výběr ze všech pletiv *Arabidopsis thaliana* v databázi. Spolehlivost dat stoupá se stoupajícím počtem opakování experimentu (sloupec čísel vpravo).

Data pro geny podjednotek *ARPC2b* a *ARPC4* databáze Genevestigator neobsahuje. Publikované výsledky ale dovolují srovnat i expresi těchto podjednotek v pletivech *A. thaliana* spolu s ostatními podjednotkami ARP2/3 komplexu (obr. 9). Podjednotka *ARPC4* se přepisuje v děložních listech, semenáčcích, kořenech, hypokotylech, stoncích a nejvíce v květenství. Specificky, i když v malé míře se s podjednotkami *ARPC3* a *ARPC5* přepisuje ve stonku. Zajímavou informací je, že vykazuje nejnižší expresi v listech. V listech se nejvíce přepisují podjednotky *ARP2*, *ARP3* a *ARPC1*. V kořenech se nejvíce přepisují právě podjednotky *ARPC4* a *ARPC5* (Li et al., 2003). Podjednotky *ARPC2a* a *ARPC2b* jsou přepisovány ve zvýšené míře v květenství. (Li et al., 2003, El-Assall et al., 2004).

Na obrázku 10 je graficky znázorněna exprese genů podjednotek ARP2/3 komplexu v jednotlivých vývojových stádiích rostliny. Expresi *ARP2*, *ARP3*, *ARPC1ab*, *ARPC2a*, *ARPC3* a *ARPC5* na obrázku 9 vykazuje v tomto směru podobný trend. Za jediný výkyv v expresi ve srovnání s ostatními podjednotkami se dá považovat zvýšená míra exprese podjednotky *ARPC5* v posledním stádiu, kterým je senescence rostliny. Zároveň ale pro tuto fázi vývoje rostliny bylo provedeno nejméně experimentů, se kterými databáze pracuje (18), proto lze považovat spolehlivost tohoto výsledku za nízkou. K největší shodě přepisu podjednotek dochází u *Arabidopsis thaliana* ve vývojovém stádiu

semenáčku (2208 opakování experimentu). Pro správné vyhodnocení míry shodnosti exprese ve vývojových stádiích rostliny *A. thaliana*, byla data srovnána s daty míry exprese genů podjednotek vybraných komplexů. K porovnání byl vybrán komplex TOM a Lhc komplex. Jednotlivé podjednotky těchto komplexů měly rozdílnou expresi a v různých vývojových stádiích rostliny se jejich exprese měnila. Ke změně exprese podjednotek Lhc komplexu v závislosti na míře fotosyntézy v určitém vývojovém stádiu rostliny (například klíčící semeno) se přihlíželo (data dostupná v Příloze 2 – Genevestigator vývojová stádia).

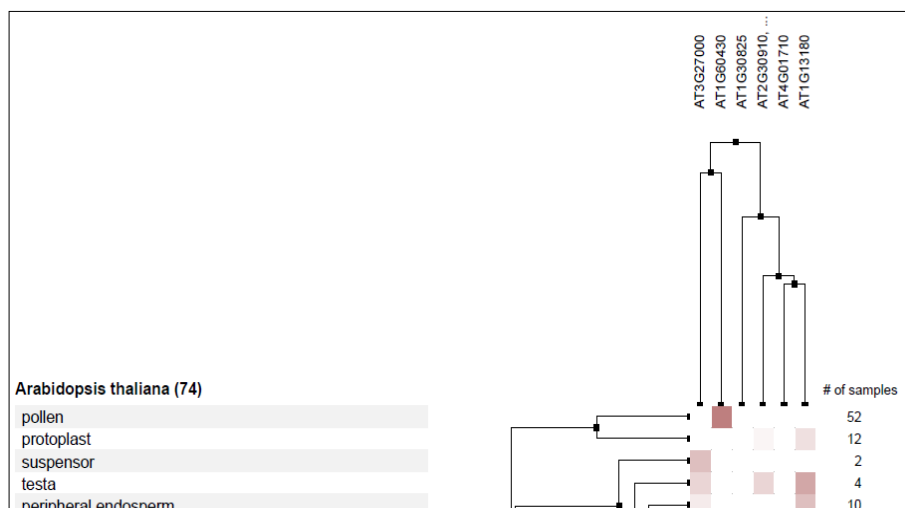


Obrázek 10: V tomto obrázku je znázorněna exprese podjednotek ARP2/3 komplexu v různých vývojových stádiích rostliny. Tato stádia jsou: klíčící semeno, semenáček, mladá rozeta, vyvinutá rozeta, nasazování na květ, rostlina začínající kvést, kvetoucí, v pozdní fázi kvetení, dozrávání šišulí, senescence rostliny. Příslušná barva k označení podjednotek je uvedena nad obrázkem.

8.4.2 Genevestigator - klastrování podjednotek

Při použití nástroje, který umožňuje v databázi Genevestigator testovat, zda soubor zadaných genů spolu na základě jejich exprese koreluje, bylo odhaleno, že *ARP3*, *ARPC5* a *ARPC1ab* tvoří shluky genů, které mají podobný expresní projev. Ostatní zadané

podjednotky komplexu podle dat neklastují (obrázek 11). Pro potvrzení klastrování genů byly jejich systematické názvy zadány do databáze spolu s dalšími náhodně vybranými dvaceti geny a opět byla zjišťována míra korelace jejich exprese. Všechny čtyři geny (databáze nerozlišuje mezi *ARPC1a* a *ARPC1b*) pro podjednotky ARP2/3 komplexu spolu opakovaně klastrovaly (data dostupná v Příloze 3 – Genevestigator klastrování). Geny *ARP3*, *ARPC5* a *ARPC1ab* mají tedy na základě této analýzy podobnou expresi. Jako další krok byla analyzována promotorová oblast těchto genů.



Obrázek 11: Klastrování podjednotek *ARP3*, *ARPC5* a *ARPC1ab*. Jejich systematické názvy: *ARP3*-AT1G13180, *ARPC5* -AT4G01710 a pro *ARPC1ab* -AT2G30910.

8.4.3 Analýza promotorové oblasti genů - AtcisDB

Pro analýzu promotorových oblastí genů pro podjednotky *ARP3*, *ARPC5* a *ARPC1ab* byla použita Arabidopsis cis-regulatory element databáze (AtcisDB - <http://arabidopsis.med.ohio-state.edu/AtcisDB/>). V databázi byly k dispozici predikované vazebné motivy transkripčních faktorů regulujících přepis genu, které se nacházejí v jeho promotorové oblasti. Tyto motivy byly porovnány mezi jednotlivými podjednotkami ARP2/3 komplexu a dalšími 16 náhodně vybranými geny. Na základě zmíněného porovnávání se zjistilo, že vazebné elementy společné a specifické pro klastující podjednotky ARP2/3 komplexu mají jeden společný rys a tím je přítomnost elementů se vztahem ke kvetení (data dostupná v Příloze 4 – AtcisDB vazebné motivy).

Obdobnou analýzou vazebných motivů všech genů podjednotek ARP2/3 komplexu v databázi (*ARP2*, *ARP3*, *ARPC1*, *ARPC2*, *ARPC3* a *ARPC5*) bylo prokázáno, že všechny

geny kódující analyzované podjednotky mají místa pro vazbu faktorů reagovalých auxinem, místa pro vazbu faktorů reagujících na environmentální stres a vazebné motivy jako světlem regulované geny.

Na základě analýzy promotorových oblastí genů podjednotek ARP2/3 komplexu byla detailně prozkoumána stavba květu u všech dostupných mutantních rostlin v ARP2/3 komplexu, nebyla ale nalezena žádná odchylka od stavby květu WT rostlin. Při společné kultivaci všech rostlin se ale ukázal jiný, do této doby neznámý fenotyp společný všem rostlinám mutovaným v genech ARP2/3 komplexu (*arp2*, *arp3*, *arpc2a (ler)*, *arpc2b*, *arpc3*, *arpc4*, *arpc5*, *arp2/arpc5*, *arp2/arpc4*, *arp2/arpc3*, *arpc3/arpc4*, *arpc3/arpc5*, *arpc4/arpc5*). Mutantní rostliny měly shodně opožděné kvetení.

9 Diskuse

9.1 Fenotypový projev jednoduchých mutantních linií

Studium rostlinných podjednotek ARP2/3 komplexu je zajímavé faktem, že ne všechny mutace v genech pro podjednotky způsobují charakteristický fenotyp. Pro geny podjednotek ARPC3 a ARPC1 není znám žádný projev mutace. Nejpravděpodobnějším důvodem, proč *arpc1* rostliny nevykazují typický *distorted* fenotyp, je skutečnost, že gen *ARPC1* je v rostlině ve dvou kopiích. Geny jsou označeny jako *ARPC1A* a *ARPC1B* (Li et al., 2003). Vzájemná redundance obou genů a jejich blízká přítomnost na chromozómu neumožňuje získat mutantu s daným fenotypem ani dvojitého mutantu v obou genech pomocí křížení. Tento problém lze v budoucnu například vyřešit použitím technologie RNAi. Důvod neexistence charakteristického fenotypu pro rostlinu *arpc3* byl dosud připisován lokalizaci ARPC3 na kraji komplexu a tudíž relativní nedůležitosti ve stavbě ARP2/3 komplexu. U živočišných buněk tato podjednotka hraje roli hlavně ve stabilizaci komplexu (Rouiller et al., 2008). Z výsledků popisovaných v této práci je ale patrné, že tato podjednotka vykazuje specifický mutantní fenotyp, a navíc pravděpodobně hraje roli v regulaci ARP2/3 komplexu (viz kapitola 8.2.3).

Genom *Arabidopsis thaliana* obsahuje dva geny pro podjednotku ARPC2 - *ARPC2A* a *ARPC2B* (Li, et al., 2003). Zatímco mutace v genu *ARPC2A* vykazuje charakteristický mutantní fenotyp, mutace genu *ARPC2B* tento fenotyp nevykazuje. Důvodem je zřejmě fakt, že gen *ARPC2B* je v rostlině přepisován v daleko menší míře než gen *ARPC2A* (El-Assall et al., 2004). V této práci byla analyzována linie *arpc2b*, protože *arpc2a* nebyla v naší laboratoři na začátku práce k dispozici. Linie *arpc2a* (*distorted 2-1*; El-Assall et al., 2004) byla použita při pozdějších experimentech, na rozdíl od všech ostatních analyzovaných linií jde ovšem o linii na pozadí *Lansberg erecta*.

arpc2b a *arpc3* rostliny podle publikovaných výsledků nevykazují žádný mutantní fenotyp charakteristický pro mutaci v ARP2/3 komplexu (například zkroucené trichomy), (Li et al., 2003). Jak je ale patrné z výsledků této práce, rostliny mutantní v genech pro tyto podjednotky vykazují shodný fenotyp, jako rostliny mutované v genech pro ostatní podjednotky ARP2/3 komplexu v reakci na gravitropický stimul a ve fragmentaci vakuolárního systému. Mutace v genu *arpc3* vykazuje silnější reakci na gravitropické

působení i míru fragmentace vakuolárního kompartmentu buňky než mutace v podjednotce *arpc2b*. Podjednotka ARPC3 má také pravděpodobně specifickou funkci v rámci komplexu, jak vyplývá z výsledků změněného projevu mutace trichomů u mutantní rostliny *arpc3/arpc5*. Z analýzy dat z databáze Genevestigatoru také vyplývá další specifita ARPC3 podjednotky a tou je vysoká a hlavně specifická exprese podjednotky v pylu a v rostoucí pylové láčce.

Pokud se porovnají výsledky všech experimentů napříč celou prací, kde se dají porovnat fenotypy mutantních rostlin v jednotlivých podjednotkách ARP2/3 komplexu, lze usuzovat, že ne všechny podjednotky mají v ARP2/3 komplexu stejnou úlohu. Je také možné, že ARP2/3 komplex funguje různě v různých buňkách (například různé sestavení podjednotek). Nebyla například detekována existence zkroucených trichomů u *arpc3*, ale naopak byla odhalena růstová reakce kořenů a přítomnost fragmentovaných vakuol u tohoto mutantu, společný znak všech mutantních linií.

9.2 Cirkularita pokožkových buněk

První experimenty měření cirkularity pokožkových buněk WT a mutantních rostlin byly provedeny na pravých listech rostlin rostoucích *ex vitro* (metoda obtisků, spolupráce s prof. D. Kwiatkowskou). Výsledky však nepotvrdily signifikantní změnu v cirkularitě u rostlin *arp2*, *arpc5* ani dvojitého homozygota *arp2/arpc5* oproti WT. Protože všechny publikované výsledky se zabývaly pouze děložními listy (Li et al., 2003, Le et al., 2003, Mathur et al., 2003, El-Assall et al., 2004), byla všechna další práce s listy mutantních rostlin zaměřena na děložní listy. V průběhu práce jsem před samotným měřením provedla mapování doby, která je nutná pro plné vyvinutí děložních listů rostlin rostoucích *ex vitro* i *in vitro*, protože mé experimenty jasně naznačily, že měření a porovnávání cirkularit na nevyvinutých, tedy stále rostoucích děložních listech, není možné pro účely porovnávání mezi mutantními liniemi a WT. Má měření ukázala, že děložní listy dosáhnou své konečné velikosti za 14 dní růstu *in vitro*, a všechna měření byla nadále prováděna pouze u 14-ti denních a starších rostlin, kde se velikost děložního listu již dále neměnila. Měření cirkularity na 14-ti denních děložních listech (metoda značení FM4-64) prokázala, že cirkularita pokožkových buněk se skutečně zvyšuje u mutantních linií oproti WT – testovány byly *arp2*, *arpc4*, *arpc5*, *arp2/arpc5* a *arp2/arpc4* linie. Experimenty prokázaly,

že hodnoty cirkularity jsou shodně zvýšené u jednoduchých i dvojitých mutantů. Dvojitá mutace tedy neprohlubuje tento fenotypový projev.

Kromě cirkularity byla měřena i plocha buněk listu. Tato měření ovšem prokázala, že jednoduché ani dvojitě mutantní linie nejsou stejnocenné. Plocha buněk byla vyšší v porovnání s plochou WT buněk u všech testovaných linií, avšak projev byl nejvyšší u *arp5* a *arp2* rostlin. Hodnoty *arp4* a dvojitých mutantů se blížily hodnotám WT. Jedním z vysvětlení zvětšené plochy pokožkových buněk může být například skutečnost, že mutantní rostlina nedokáže s poškozenou nukleací aktinového cytoskeletu plně řídit a směřovat růst buněk, což v rostlině sice vede ke zvýšenému, ale méně směřovanému (méně polárnímu) růstu buněk. Můžeme pak předpokládat, že děložní listy tvoří větší, ale méně buněk (plochy děložních listů se významně nelišily mezi WT a mutanty). Fenotyp zvětšené plochy pokožkových buněk u ARP2/3 mutant nebyl doposud popsán.

Velmi zajímavý je ovšem fakt, že dvojitě mutantní linie vykazovaly vždy fenotyp blíže WT než jednoduché linie (týká se to především *arp5* linie, která vykazovala největší plochu buněk, avšak hodnoty plochy buněk dvojitě linie *arp2/arp5* se blíží spíše WT. Může to být například proto, že pokud v buňce chybí pouze jedna a to nejmenší podjednotka ARP2/3 komplexu (ARPC5), komplex se může v buňce zformovat, navázat na aktinová vlákna, ale již nemůže efektivně nukleovat vlákna nová. Vlákna s navázanými nefunkčními komplexy pak mohou být v buňce hůře destabilizována, tvořit neorientované svazky aktinových vláken a způsobovat pozorovaný mutantní projev. Naproti tomu pokud chybí ARP2/3 komplexu hned dvě podjednotky - ARP2 a ARPC5 (ARP2 podjednotka je největší, důležitá podjednotka pro nukleaci vláken), komplex se neformuje vůbec. Pouhá nepřítomnost jednoho ze dvou aktinových nukleátorů pak může být pro buňku menší zátěží, než polofunkční „shluk šesti proteinů“ navázaný na aktinových vláknech a mutantní fenotyp se projeví slaběji.

Obecně lze shrnout, že fenotyp zvýšené cirkularity pokožkových buněk lze skutečně detekovat pouze na děložních listech, fenotyp se na pravých listech ztrácí. Děložní listy se vyvíjejí a rostou poměrně rychle, což by mohlo být jedno z vysvětlení, proč vidíme fenotyp v děložních listech a již ne na pravých listech, kde již je růst pomalejší a rostlina může zapojit další nukleátory aktinu (například forminy) a kompenzovat mutaci. Jediný fenotyp, který byl zatím detekován na pravých listech, je fenotyp zkroucených nevětvených

trichomů. Měření dále prokázala, že *arp5* linie vykazuje z testovaných linií nejhlubší fenotyp (cirkularita a plocha pokožkových buněk, velikost děložního listu). Dvojitě mutantní linie prohloubený fenotyp nevykazují.

9.3 Charakteristický projev zkroucených trichomů

Fenotyp zkroucených nevětvených trichomů je charakteristickým projevem mutace v genu kódujícím podjednotky ARP2/3 nebo aktivátory komplexu. V této práci byl s výjimkou linie *arp3*, *arp2b* a *arp3* potvrzen tento fenotyp pro všechny testované linie. Důvod neexistence charakteristického fenotypu pro rostlinu mutantní v podjednotce *arp3* je připisován její lokalizaci na kraji komplexu a tudíž relativní nedůležitosti. Geny pro podjednotku ARPC2 jsou v *A. thaliana* dva – *ARPC2a* a *ARPC2b*. Gen *ARPC2b* je v rostlině přepisován v daleko menší míře než gen *ARPC2a*, a pravděpodobně proto mutantní rostlina *arp2b* nevykazuje fenotyp zkroucených trichomů, funkční podjednotka ARPC2a mutaci kompenzuje. Zatímco výsledek nepřítomnosti fenotypu u *arp2b* a *arp3* je v souladu s literaturou, překvapením je nepřítomnost fenotypu u linie *arp3*. Mutace v genu kódujícím ARP3 má podle literatury v *A. thaliana* jasný *distorted* fenotyp (Lia et al., 2003, Le et al., 2003, Mathur et al., 2003). Li et al (2003) například uvádí, že defekt v rozvětvení trichomů je u rostlin identický při mutaci v genech *arp2*, *arp3* a *arp5*. Jako pravděpodobné vysvětlení se prozatím jeví to, že linie využívaná v této práci není linie kde je protein ARP3 skutečně nefunkční. Pro ověření tohoto faktu bude třeba testovat, zda protein v této linii vzniká a samozřejmě porovnat tuto linii s dalšími liniemi s T-DNA inzercí v genu *ARP3*, které jsou k dispozici v databázi NASC.

Mutantní vzhled trichomů byl u vícenásobných mutantních rostlin detekován v nezměněné formě a síle. Takto byly testovány linie *arp2/arp5*, *arp2/arp4*, *arp2/arp3*, *arp3/arp4* a *arp4/arp5*. Velmi zajímavý výsledek ovšem přinesla analýza rostlin *arp3/arp5*. Projev dvojitého mutantu naznačil, že fenotyp zkroucených trichomů, jasně detekovatelný v linii *arp5*, byl „zachráněn“ v rostlinách, které nesly zároveň mutaci v genu *arp3* (která však v jednoduché linii fenotyp nevykazuje). Přitom všechny ostatní rostliny, které byly mutované v jedné podjednotce, která fenotyp vykazuje a v jedné podjednotce která fenotyp zkroucených trichomů nevykazuje (*arp2b*, *arp3*), měly vždy

mutované trichomy, a to i rostliny mutantní také v podjednotce *arp3* a další podjednotce s fenotypem - *arp2/arp3*, *arp3/arp4*.

Tento výsledek naznačuje, že projevy mutací v genech pro jednotlivé podjednotky nejsou v *A. thaliana* stejnocenné. Mutace v genu pro podjednotku ARPC5, nejmenší podjednotku ARP2/3 komplexu se stabilizační úlohou u živočichů, se projevuje v pletivech *A. thaliana* nejsilnějším fenotypem, zatímco mutace v genu pro druhou stabilizační podjednotku ARPC3 nevykazuje fenotyp žádný. O důvodu můžeme prozatím pouze spekulovat. Podjednotka ARPC5 se v komplexu „dotýká“ tří podjednotek komplexu - ARPC1, ARP2 a ARPC4. Podjednotka ARPC3 zbývajících dvou podjednotek – ARP3 a ARPC2. Obě podjednotky stabilizují podjednotky ARP2 a ARPC4, které tvoří jádro komplexu. Je také možné, že podjednotky ARPC3 a ARPC5 mohou mít i jinou než stabilizační úlohu v komplexu, například vazbu faktorů NPFs, nebo mohou nést aktivační, nebo inhibiční vazebnou doménu. V rámci výsledků z této práce ale zatím nelze toto unikátní zvrácení fenotypu u *arp3/arp5* uspokojivě vysvětlit. K prokázání a potvrzení fenotypu rostlin mutantních v podjednotkách *arp3/arp5* bude křížení opakováno s jinými mutantními liniemi z databáze NASC, nesoucími mutaci v daných genech.

9.4 Délka kořenů rostlin

Mutantní rostliny *arp2* a *arp3* podle Dyachok a její skupiny vytvářejí při kultivaci *in vitro* kratší kořen než WT rostliny a hůře pronikají do média se zvýšenou koncentrací agaru (Dyachok et al., 2008). Jde tedy o další fenotyp, který by měl být společný všem mutantním liniím. V mých experimentech měly však vždy mutantní rostliny delší hlavní kořen než kontrolní WT rostliny. Jediným zásadním rozdílem provedení obou experimentů byla nepřítomnost sacharózy a jiná koncentrace agaru v médiu v experimentech Dyachok a její skupiny oproti médiu používaném v mých experimentech.

Zopakování růstových experimentů s oběma typy médií (médiem standardně používané v mých experimentech a médiem dle Dyachok et al. 2008) odhalilo, že mutantní linie prakticky na složení média nereagovaly, zatímco WT rostliny na médiu bez sacharózy a s menší koncentrací agaru rostly rychleji ve srovnání s médiem se sacharózou a vyšší koncentrací agaru. Na přítomnost sacharózy v tužším médiu tedy WT rostlina reaguje sníženým růstem, ale tato reakce je blokována v mutantních rostlinách.

Růstová reakce WT rostlin v médiu bez sacharózy může být reakce na prostředí s nižší koncentrací živin, kdy kořen v tomto prostředí elonguje tak, aby rychleji prorostl do prostředí s vyšší koncentrací živin. Mutantní rostliny neodpovídají růstem kořene ani na médium s vyšší koncentrací živin, ani na médium s nižší koncentrací živin. Tato zarážející skutečnost by mohla ukazovat na roli kompletně sestaveného ARP2/3 komplexu v buněčné signalizaci o přítomnosti či nepřítomnosti živin v médiu.

Délka hlavních kořenů u rostlin mutantních v jedné podjednotce ARP2/3 komplexu se opět příliš neliší od délky kořene u rostlin mutantních ve dvou podjednotkách ARP2/3 komplexu. Jediným signifikantním rozdílem je oproti ostatním měřeným mutantním rostlinám (*arpc4*, *arpc5* a *arp2/arpc4*, *arp2/arpc5*) delší kořen mutantní rostliny *arp2* v médiu se sacharózou. Tento výsledek bude však nutné ověřit opakováním experimentu.

Zajímavé je, že fenotypy rostlin mutantních v genech pro podjednotky v ARP2/3 komplexu vykazují mutantní rostliny s nefunkčním genem pro trehalosa-syntázu (zvýšená cirkularita pokožkových buněk, redukované větvení trichomů; Chary et al., 2008). Trehalosa je neredukující disacharid, složený ze dvou glukoz. Je přítomný v bakteriích, houbách, řasách a v nízké hladině se vyskytuje u všech rostlin. (Augier et al., 1954, Elbein et al., 1974, Goddijn a van Dun et al., 1999, Elbein et al., 2003). Role trehalosy je ochrana rostliny před stresem a to tepelným, nutričním, osmotickým, chemickým a před dehydratací. Na to, že mutantní rostliny v genech pro ARP2/3 komplex vykazují fenotyp v odpovědi na cukry poukázal již v roce 2003 Li a jeho skupina. V souvislosti s mými experimenty (necitlivost mutantních linií na přítomnost sacharidů v médiu) tedy vyvstává zajímavá otázka souvislosti cukrů a cytoskeletu v regulaci morfogeneze rostlin.

9.5 Změny v gravitropické reakci kořene

V článku z roku 2009 Reboulet a jeho skupina poukazuje na skutečnost, že u mutantních linií *arp3* a *arpc2* dochází ke zvýšení gravitropické odpovědi stonku na gravitropický stimul (stonek se ohýbá v ostřejším úhlu). Rostliny *arp3* pak vykazují i zvýšení odpovědi kořene na gravitropický stimul ve tmě (kořeny se ohýbají v ostřejším úhlu), (Reboulet et al., 2009). Podjednotka ARP3 má i vliv na fototropismus, stonek mutantních rostlin se ohýbá v širším úhlu – mutace inhibuje tropismus. Mutace v podjednotce *arp3* má tedy opačný efekt na gravitropismus a fototropismus. V protikladu

k předkládaným výsledkům o změnách v gravitropické odpovědi mutantů v podjednotkách ARP2/3 komplexu je zjištění Julie Dyachok a její skupiny (2008). Ta růstové odpovědi rostlin *arp2* a *arp3* označila za nesignifikantní.

Z výsledků mých experimentů se čtrnácti různými mutanty - jednoduchými i dvojitými mutanty (*arp2*, *arp3*, *arpc2a (ler)*, *arpc2b*, *arpc3*, *arpc4*, *arpc5*, *arp2/arpc5*, *arp2/arpc4*, *arp2/arpc3*, *arpc3/arpc4*, *arpc3/arpc5*, *arpc4/arpc5*) vyplývá, že všechny mutantní rostliny signifikantně výrazněji reagovaly na gravitropický stimul než WT a získané výsledky zásadně potvrzují výsledky z roku 2009 s mutanty *arp3* a *arpc2* (Reboulet et al., 2009). Nejméně reagovaly mutantní rostliny v podjednotce *arpc2b* a nejvíce na stimul reagovaly rostliny mutantní v podjednotce *arpc4* a *arpc3/arpc5*. Rostliny rostly na médiu, ve kterém byla sacharóza, a kde tedy podle výsledků z této práce WT rostliny rostou méně (pomaleji), než mutantní rostliny. Tato skutečnost se tedy pravděpodobně projevila i v rychlejší reakci mutantních rostlin na gravitropický stimul – zakřivení kořene v ostřejším úhlu.

9.6 Fragmentace vakuolárního systému mutantních rostlin

Vakuolární systém vykazující podobný fenotyp fragmentace vakuolárního systému byl referován v defektních trichomech *arp2* a *arp3* mutantních rostlin (Mathur et al., 2003). U vyvíjejícího se větvení trichomů je kromě cytoskeletu důležitý i tlak a fúze vakuol. V rostoucích trichomech rostlin postrádajících *arp3* a *arpc2a* podjednotky vakuoly často dosahovaly do špičky „pseudovětvi“ trichomu a buňky obsahovaly poměrně malé množství aktinových svazků (El-Assall S. E. et al., 2004). Po obvodu velké centrální vakuoly, která ale nikdy nechyběla, bylo pozorováno množství malých váčků, které byly pravděpodobně malé nesfuzované vakuoly (Mathur et al., 2003). To naznačuje, že fúze vakuolární membrány je zatím neznámým způsobem narušena a může přispívat k celkovému projevu fenotypu rostlin mutovaných v podjednotkách ARP2/3 komplexu. Tlak vakuoly je totiž hlavní složkou procesu růstu rostlinných buněk. V trichomech, na kterých je vidět nejcharakterističtější fenotyp mutace ARP2/3 komplexu, se tlak vakuoly může podílet na rychlém a směrovaném růstu buňky a i na konečném tvaru trichomu. Tato práce se ale zaměřila na potvrzení fenotypu u děložních listů. Děložní listy totiž obsahují zásobní vakuoly, jejichž dynamika může být preferenčně kontrolována ARP2/3 komplexem.

Výsledky potvrdily fenotyp fragmentace vakuolárního systému u všech zkoumaných mutantních rostlin. To, že rostliny vykazují mutantní fenotyp všechny, slabě i rostliny mutované v podjednotkách *arpc3* a *arpc2b*, ukazuje zaprvé na důležitost ARP2/3 komplexu a nukleaci aktinového cytoskeletu pro biogenezi vakuoly a zadruhé na relativní srovnatelnost rolí podjednotek ARP2/3 komplexu při biogenezi vakuolárního systému pokožkových buněk.

Při srovnání fenotypu u rostlin mutovaných v jedné či dvou podjednotkách ARP2/3 komplexu nelze pozorovat žádnou signifikantní změnu. Důležitým výsledkem experimentu je, že nejsilnější projev fragmentace vakuolárního systému se projevuje opět u rostliny mutantní v podjednotce *arpc5*.

9.7 Struktura aktinového cytoskeletu mutantních rostlin

Experimenty, ve kterých byl analyzován stav aktinového cytoskeletu, byly provedeny z časových důvodů pouze na dvojité linii *arpc4/arpc5*. Mutantní rostliny *arpc4/arpc5* GFP-fimbrin nevykazovaly signifikantní změnu plochy ani svazkování aktinového cytoskeletu ve srovnání s WT rostlinami. Protože však změněný fenotyp v oblasti aktinového cytoskeletu (zvýšený výskyt kratších a neorientovaných aktinových kabelů a svazků) je u mutantních rostlin *arp2*, *arp3*, *arpc2*, *arpc4* a *arpc5* v literatuře dobře zdokumentován (Mathur et al., 2003, El-Assall et al., 2004, Kotchoni et al., 2009), a protože v této práci byla analyzována jen jedna mutantní linie, bude třeba v budoucnosti analýzu zopakovat a především porovnat projev u jednoduchých a násobných mutantů.

9.8 Genevestigator – potvrzení rozdílné genové exprese podjednotek

Ze získaných informací z databáze Genevestigator bylo vyvozeno, v jakých pletivech a s jakou intenzitou se geny pro podjednotky ARP2/3 komplexu přepisují. Geny pro ARP2/3 komplex nemají ve zkoumaných pletivech kvantitativně stejnou expresi. Nejvíce se v pletivech přepisuje gen pro podjednotku *ARPC5*, nejméně pro *ARPC3*.

Gen *ARPC3* se obecně přepisuje v pletivech ve srovnání s ostatními podjednotkami ARP2/3 komplexu velmi málo, je ale velmi specificky a jako jediný ve zvýšené míře přepisován v pylu a v rostoucí pylové láčce, dále je přepisován už relativně méně v květenstvích, plodech a kořenech. Pletiva/buňky, kde se v rostlině uplatňuje vrcholový styl

růstu (pylová láčka, kořenové vlásky), byla v rostlinách mutovaných v ARP2/3 komplexu studována nejdříve. Víme, že rostliny mutantní v genech *arp2*, *arp3*, *arp2* a *arpc5* nemají růst pylové láčky mutací postižený. Neexistuje ale žádný experiment, kde by byl popsán růst pylové láčky u mutantních rostlin *arpc3*, ačkoliv moje výsledky ukazují, že by zde protein ARPC3 mohl hrát specifickou roli díky vysoké míře přepisu. Jako další pracovní hypotézu lze vnímat i možnost, že ARP2/3 komplex s ARPC3 podjednotkou pracuje hlavně/pouze v pylové láčce, pylu.

Při porovnání míry exprese podjednotek v různých vývojových stádiích *A. thaliana* vykazují geny pro podjednotky ARP2, ARP3, ARPC1ab, ARPC2a, ARPC3 a ARPC5 podobný trend. To by naopak naznačovalo, že rostlina potřebuje funkční komplex ARP2/3 se všemi jeho podjednotkami během celého svého vývoje.

9.9 Klastrování genů podjednotek, analýza jejich promotorových oblastí

Při použití nástroje, který umožňuje v databázi Genevestigatoru testovat, zda soubor zadaných genů spolu na základě jejich exprese koreluje, se ukázal zajímavý výsledek. Podjednotky *ARP3*, *ARPC5* a *ARPC1ab* tvoří shluky genů, které mají podobný expresní projev. Na základě tohoto zjištění byla analyzována promotorová oblast jejich genů a bylo zjištěno, že vazebné elementy společné a specifické pro klastrující podjednotky ARP2/3 komplexu mají jeden společný rys a tím je přítomnost elementů, které ovlivňují kvetení rostliny. Vzhledem ke skutečnosti, že při křížení mutantních rostlin v jednotlivých genech ARP2/3 komplexu a získávání rostlin, které nesou mutaci ve dvou genech ARP2/3 komplexu, vykazovala F2 generace charakteristický štěpný Mendelův poměr v počtu heterozygotních a homozygotních rostlin, nemohl a také podle výsledků nebyl vývin květu vážněji postižen. Při společném pěstování všech rostlin se ale ukázal do této doby neznámý fenotyp, společný všem mutantním rostlinám, a to opožděný nástup kvetení. Na určení doby kvetení u *A. thaliana* se podílí velké množství vnějších i vnitřních faktorů, proto není na základě dostupných informací upokojivě možné najít konkrétní důvod pozdějšího nástupu kvetení u mutantních rostlin. Jednou z možných příčin ale může být například změněná reakce rostlin na délku světla, nebo na rostlinný hormon auxin. I tento výsledek bude v budoucnosti podroben důkladnému ověření a zkoumání.

Všechny analyzované geny (*ARP2*, *ARP3*, *ARPC1*, *ARPC2*, *ARPC3* a *ARPC5*) mají místa pro vazbu faktorů regulovaných auxinem, místa pro vazbu faktorů reagujících na environmentální stres a mají vazebné motivy jako světlem regulované geny. Roli ARP2/3 komplexu jako efektoru účastnícího se odpovědi při signalizaci světlem či rostlinným fytohormonem auxinem potvrzují v praxi výsledky z prací o gravitropismu kořene a fototropismu stonku (Reboulet et al., 2009) a růstem kořenů na světle a ve tmě (Dyachok et al., 2011, Dyachok et al., 2008). Světlo a gravitace tedy ve výsledku ovlivňují organizaci aktinové sítě.

Obecně je třeba připomenout, že výsledky získané analýzou v databázi Genevestigator ukazují pouze jednu úroveň kontroly exprese proteinu, a to transkripční úroveň. Tyto výsledky nevypovídají nic o např. stabilitě mRNA, kontrole na úrovni samotné syntézy proteinu, či stability vzniklého proteinu. Přesto představují významný náhled do regulace exprese proteinů podjednotek ARP2/3 komplexu.

9.10 Dvojité mutanty vykazují slabší fenotyp

Ze zjištěných výsledků vyplývá, že dvojité mutanty vykazují slabší fenotypový projev než rostliny mutované v jednom genu ARP2/3 (plocha děložních listů, cirkularita pokožkových buněk děložních listů, fragmentace vakuolárního systému). Proč je mutace v jednotlivých genech ARP2/3 komplexu výraznější než mutace ve dvou genech ARP2/3 komplexu? Možným vysvětlením je, že jádro komplexu se může v buňce formovat, i když chybí jednotlivé podjednotky. Tento fragment komplexu může asociovat – vázat se – na svá vazebná místa a způsobovat vážnější fenotypové projevy ve srovnání s kompletně nefunkčním/chybějícím komplexem, který je neschopen jakékoli interakce. Tehdy mohou jiné mechanismy (např. forminy) převzít některé funkce ARP2/3 komplexu, protože vazebná místa na filamentech zůstávají volná. Velmi důležitým krokem ke správnému zodpovězení této otázky je získání mutantní rostliny ve třech podjednotkách ARP2/3 komplexu a prozkoumání jejího fenotypu. Křížení rostlin mutovaných ve dvou genech pro podjednotky ARP2/3 komplexu a získání generace rostlin, kde bude snad možné najít rostliny mutantní ve třech genech ARP2/3 komplexu, bylo již provedeno, avšak trojitý mutant nebyl doposud nalezen.

10 Závěr

Tato diplomová práce je zaměřena na studium role a důležitosti jednotlivých podjednotek komplexu ARP2/3 u rostlin.

Prvním z cílů práce bylo ověřit, zda jsou si podjednotky ve své funkci v ARP2/3 komplexu navzájem rovnocenné. Po porovnání fenotypů několika mutantních linií lze uzavřít, že všechny podjednotky si funkčně rovnocenné nejsou. Nejsilnější fenotypový projev má většinou ztráta ARPC5 podjednotky. Naopak ztráta ARPC3 a ARPC2b podjednotky mají slabé fenotypové projevy.

Na tento závěr navazuje zodpovězení druhého cíle, a to zda může neúplně složený ARP2/3 komplex alespoň částečně zachovávat svou funkci. Má data naznačují, že ARPC3 podjednotka je ve většině funkcí komplexu ARP2/3, detekovatelných na základě mutantního fenotypu (především zkroucených trichomů), postradatelná. Mé výsledky však také naznačily, že fungování komplexu je regulováno složitěji než jen prostou funkčností či nefunkčností. Především podjednotka ARPC3 hraje zřejmě dosud neznámou regulační úlohu, neboť její nepřítomnost v dvojité mutantě „zachraňuje“ *distorted* fenotyp *arpc5*. To ukazuje na to, že komplex se může nacházet též ve stavu, kdy je funkce jen částečně zachována, a kdy má tato „částečná nefunkčnost“ mnohem výraznější projevy než úplná ztráta funkce. Toto naznačily i opakující se výsledky, kdy dvojité mutanty měly slabší fenotypové projevy než jednoduché mutanty.

Třetí otázkou v úvodu této diplomové práce bylo, zda nehrají jednotlivé podjednotky další, rostlinně-specifické role. Protože některé fenotypy, jako např. fenotyp zkroucených trichomů, byl detekován jen v některých mutantních liniích, zatímco např. fenotyp rychlejší gravitropické reakce kořenů či fragmentace vakuolárního systému byl detekovatelný u všech analyzovaných mutantů, lze usoudit, že různé podjednotky se uplatňují v různé míře během specifických morfogenetických procesů v rostlině. To ukazuje na rostlinně-specifické funkce komplexu i samotných podjednotek. Dále exprese genu *ARPC3* v pylu ukazuje na specifickou roli této podjednotky, odlišnou od ostatních podjednotek.

Všechny výše uvedené výsledky budou potvrzeny v dalších experimentech. Výsledky této diplomové práce jsou základem pro rozsáhlejší projekt výzkumu role komplexu ARP2/3 v rostlinách.

11 Seznam citované literatury

Ahuja R, Pinyol R, Reichenbach N, Custer L, Klingensmith J, Kessels MM, Qualmann B (2007) Cordon-bleu is an actin nucleation factor and controls neuronal morphology. *Cell* 131:337-350.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (1998) *Molecular biology of the cell*; New York: Garland science.

Augier J (1954) The biochemistry of the North American algae, Tuomeya- fluviatillis. *Compt Rend* 239: 87–89.

Baluska F, Jasik J, Edelmann HG, Salajova T, Volkmann D (2001) Latrunculin B-induced plant dwarfism: Plant cell elongation is F-actin-dependent. *Developmental Biology* 231:113-124.

Basu D, Le J, El-Essal SED, Huang S, Zhang CH, Mallery EL, Koliantz G, Staiger CJ, Szymanski DB (2005) DISTORTED3/SCAR2 is a putative arabidopsis WAVE complex subunit that activates the Arp2/3 complex and is required for epidermal morphogenesis. *Plant Cell* 17:502-524.

Basu D, Le J, Zakharova T, Mallery EL, Szymanski DB (2008) A SPIKE1 signaling complex controls actin-dependent cell morphogenesis through the heteromeric WAVE and ARP2/3 complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:4044-4049.

Boldogh IR, Yang HC, Nowakowski WD, Karmon SL, Hays LG, Yates JR, Pon LA (2001) Arp2/3 complex and actin dynamics are required for actin-based mitochondrial motility in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:3162-3167.

Borths EL, Welch MD (2002) Turning on the Arp2/3 complex at atomic resolution. *Structure* 10:131-135.

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

Buchanan, B.B Grissem, W. and Jones, R.L (2000) *Biochemistry & Molecular biology of plants*. American society of plant physiologists, Rockville, Maryland.

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

- Dyachok J, Shao MR, Vaughn K, Bowling A, Facette M, Djakovic S, Clark L, Smith L (2008) Plasma Membrane-Associated SCAR Complex Subunits Promote Cortical F-Actin Accumulation and Normal Growth Characteristics in Arabidopsis Roots. *Molecular Plant* 1:990-1006.
- Dyachok J, Zhu L, Liao FQ, He J, Huq E, Blancaflor EB (2011) SCAR Mediates Light-Induced Root Elongation in Arabidopsis through Photoreceptors and Proteasomes. *Plant Cell* 23:3610-3626.
- El-Assal SED, Le J, Basu D, Mallery EL, Szymanski DB (2004) Arabidopsis GNARLED encodes a NAP125 homolog that positively regulates ARP2/3. *Current Biology* 14:1405-1409.
- El-Assal SE, Le J, Basu D, Mallery EL, Szymanski DB (2004) DISTORTED2 encodes an ARPC2 subunit of the putative Arabidopsis ARP2/3 complex. *Plant Journal* 38:526-538.
- Elbein AD (1974) The metabolism of α,α -trehalose. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 30: 227-256.
- Elbein AD, Pan YT, Pastuszak I, Carroll D (2003) New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology* 13: 17R-27R.
- Faix J, Grosse R (2006) Staying in shape with formins. *Developmental Cell* 10:693-706.
- Finka A, Saidi Y, Goloubinoff P, Neuhaus JM, Zryd JP, Schaefer DG (2008) The knock-out of ARP3a gene affects F-actin cytoskeleton organization altering cellular tip growth, morphology and development in moss *Physcomitrella patens*. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 65:769-784.
- Fu Y, Gu Y, Zheng ZL, Wasteneys G, Yang ZB (2005) Arabidopsis interdigitating cell growth requires two antagonistic pathways with opposing action on cell morphogenesis. *Cell* 120:687-700.
- Goddijn OJ, van Dun K (1999) Trehalose metabolism in plants. *Trends Plant Sci* 4: 315-319.
- Goode BL, Eck MJ (2007) Mechanism and function of formins in the control of actin assembly. *Annual Review of Biochemistry* 76:593-627.
- Gournier H, Goley ED, Niederstrasser H, Trinh T, Welch MD (2001) Reconstitution of human Arp2/3 complex reveals critical roles of individual subunits in complex structure and activity. *Molecular Cell* 8:1041-1052.
- Gu Y, Fu Y, Dowd P, Li SD, Vernoud V, Gilroy S, Yang ZB (2005) A Rho family GTPase controls actin dynamics and tip growth via two counteracting downstream pathways in pollen tubes. *Journal of Cell Biology* 169:127-138.

- Harborth J, Elbashir SM, Bechert K, Tuschl T, Weber K (2001) Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *Journal of Cell Science* 114:4557-4565.
- Higgs HN, Pollard TD (2001) Regulation of actin filament network formation through Arp2/3 complex: Activation by a diverse array of proteins. *Annual Review of Biochemistry* 70:649-676.
- Hudson AM, Cooley L (2002) A subset of dynamic actin rearrangements in *Drosophila* requires the Arp2/3 complex. *Journal of Cell Biology* 156:677-687.
- Hussey PJ, Ketelaar T, Deeks MJ (2006) Control of the actin cytoskeleton in plant cell growth. *Annual Review of Plant Biology* 57:109-125.
- Chary SN, Hicks GR, Choi YG, Carter D, Raikhel NV (2008) Trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase regulates cell shape and plant architecture in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 146:97-107.
- Chereau D, Boczkowska M, Skwarek-Maruszewska A, Fujiwara I, Hayes DB, Rebowski G, Lappalainen P, Pollard TD, Dominguez R (2008) Leiomodin is an actin filament nucleator in muscle cells. *Science* 320:239-243.
- Choi CH, Thomason PA, Zaki M, Insall RH, Barber DL (2013) Phosphorylation of Actin-related Protein 2 (Arp2) Is Required for Normal Development and cAMP Chemotaxis in *Dictyostelium*. *Journal of Biological Chemistry* 288:2464-2474.
- Irie F, Yamaguchi Y (2002) EphB receptors regulate dendritic spine development via intersectin, Cdc42 and N-WASP. *Nature Neuroscience* 5:1117-1118.
- Jiang K, Sorefan K, Deeks MJ, Bevan M, Hussey PJ, Hetherington AM (2012) The ARP2/3 Complex Mediates Guard Cell Actin Reorganization and Stomatal Movement in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24:2031-2040.
- Jorgens CI, Grunewald N, Hulskamp M, Uhrig JF (2010) A role for ABIL3 in plant cell morphogenesis. *Plant Journal* 62:925-935.
- Kandasamy MK, McKinney EC, Meagher RB (1999) The late pollen-specific actins in angiosperms. *Plant Journal* 18:681-691.
- Karpova TS, Tatchell K, Cooper JA (1995) Actin-filaments in Yeast are Unstable in the Absence of Capping Protein or Fimbrin. *Journal of Cell Biology* 131:1483-1493.
- Kelleher JF, Atkinson SJ, Pollard TD (1995) Sequences, Structural Models, and Cellular-Localization of the Actin-Related Proteins ARP2 and ARP3 from *Acanthamoeba*. *Journal of Cell Biology* 131:385-397.

Kelly AE, Kranitz H, Dotsch V, Mullins RD (2006) Actin binding to the central domain of WASP/Scar proteins plays a critical role in the activation of the arp2/3 complex. *Journal of Biological Chemistry* 281:10589-10597.

Kellye C. Kirkbride, Nan Hyung Hong, Christi L. French, Emily S. Clark, W. Gray Jerome, Alissa M. Weaver (2012) Regulation of late endosomal/lysosomal maturation and trafficking by cortactin affects Golgy morphology. *Cytoskeleton* 69:625-643.

Kotchoni SO, Zakharova T, Mallery EL, Le J, El-Assal SE, Szymanski DB (2009) The Association of the Arabidopsis Actin-Related Protein2/3 Complex with Cell Membranes Is Linked to Its Assembly Status But Not Its Activation. *Plant Physiology* 151:2095-2109.

Le J, El-Assal SED, Basu D, Saad ME, Szymanski DB (2003) Requirements for Arabidopsis ATARP2 and ATARP3 during epidermal development. *Current Biology* 13:1341-1347.

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

Li SD, Blanchoin L, Yang ZB, Lord EM (2003) The putative Arabidopsis Arp2/3 complex controls leaf cell morphogenesis. *Plant Physiology* 132:2034-2044.

Liu SL, May JR, Helgeson LA, Nolen BJ (2013) Insertions within the Actin Core of Actin-related Protein 3 (Arp3) Modulate Branching Nucleation by Arp2/3 Complex. *Journal of Biological Chemistry* 288:487-497.

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

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

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

Mathur J, Mathur N, Kirik V, Kernebeck B, Srinivas BP, Hulskamp M (2003b) Arabidopsis CROOKED encodes for the smallest subunit of the ARP2/3 complex and controls cell shape by region specific fine F-actin formation. *Development* 130:3137-3146.

Michelot A, Guerin C, Huang SJ, Ingouff M, Richard S, Rodiuc N, Staiger CJ, Blanchoin L (2005) The formin homology 1 domain modulates the actin nucleation and bundling activity of Arabidopsis FORMIN1. *Plant Cell* 17:2296-2313.

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

Moreau V, Galan JM, Devilliers G, Haguenaue Tsapis R, Winsor B (1997) The yeast actin-related protein Arp2p is required for the internalization step of endocytosis. *Molecular Biology of the Cell* 8:1361-1375.

Okada K, Bartolini F, Deaconescu AM, Moseley JB, Dogic Z, Grigorieff N, Gundersen GG, Goode BL (2010) Adenomatous polyposis coli protein nucleates actin assembly and synergizes with the formin mDia1. *Journal of Cell Biology* 189:1087-1096.

Pollard TD, Beltzner CC (2002) Structure and function of the Arp2/3 complex. *Current Opinion in Structural Biology* 12:768-774.

Pollard TD, Blanchoin L, Mullins RD (2000) Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 29:545-576.

Poukkula M, Kremneva E, Serlachius M, Lappalainen P (2011) Actin-Depolymerizing Factor Homology Domain: A Conserved Fold Performing Diverse Roles in Cytoskeletal Dynamics. *Cytoskeleton* 68:471-490.

Qian PP, Hou SW, Guo GQ (2009) Molecular mechanisms controlling pavement cell shape in Arabidopsis leaves. *Plant Cell Reports* 28:1147-1157.

Qiu JL, Jilk R, Marks MD, Szymanski DB (2002) The Arabidopsis SPIKE1 gene is required for normal cell shape control and tissue development. *Plant Cell* 14:101-118.

Quinlan ME, Heuser JE, Kerkhoff E, Mullins RD (2005) Drosophila Spire is an actin nucleation factor. *Nature* 433:382-388.

Rohatgi R, Ma L, Miki H, Lopez M, Kirchhausen T, Takenawa T, Kirschner MW (1999) The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell* 97:221-231.

Rottner K, Hanisch J, Campellone KG (2010) WASH, WHAMM and JMY: regulation of Arp2/3 complex and beyond. *Trends in Cell Biology* 20:650-661.

Rotty JD, Wu CY, Bear JE (2013) New insights into the regulation and cellular functions of the ARP2/3 complex. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14:7-12.

Rouiller I, Xu XP, Amann KJ, Egile C, Nickell S, Nicastro D, Li R, Pollard TD, Volkmann N, Hanein D (2008) The structural basis of actin filament branching by the Arp2/3 complex. *Journal of Cell Biology* 180:887-895.

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

Sawa M, Suetsugu S, Sugimoto A, Miki H, Yamamoto M, Takenawa T (2003) Essential role of the *C. elegans* Arp2/3 complex in cell migration during ventral enclosure. *Journal of Cell Science* 116:1505-1518.

Sheahan MB, Staiger CJ, Rose RJ, McCurdy DW (2004) A green fluorescent protein fusion to actin-binding domain 2 of Arabidopsis fimbrin highlights new features of a dynamic actin cytoskeleton in live plant cells. *Plant Physiology* 136:3968-3978.

Schaerer-Brodbeck C, Riezman H (2000) Functional interactions between the p35 subunit of the Arp2/3 complex and calmodulin in yeast. *Molecular Biology of the Cell* 11:1113-1127.

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

Stevenson, V., Hudson, A., Cooley, L., and Theurkauf, W (2002) Arp 2/3-dependent pseudocleavage furrow assembly in syncytial *Drosophila* embryos. *Curr. Biol.* 12, 705–711.

Su-Ling Liu, Jordan R. May, Luke A. Helgeson, Brad J. Nolen (2012) Insertions within the actin core of actin-related protein 3 (Arp3) modulate branching nucleation by Arp2/3 complex. *Journal of biological chemistry* 288, 487-497.

Szymanski DB, Marks MD, Wick SM (1999) Organized F-actin is essential for normal trichome morphogenesis in Arabidopsis. *Plant Cell* 11:2331-2347.

Uhrig JF, Mutondo M, Zimmermann I, Deeks MJ, Machesky LM, Thomas P, Uhrig S, Rambke C, Hussey PJ, Hulskamp M (2007) The role of Arabidopsis SCAR genes in ARP2-ARP3-dependent cell morphogenesis. *Development* 134:967-977.

Volkman N, Amann KJ, Stoilova-McPhie S, Egile C, Winter DC, Hazelwood L, Heuser JE, Li R, Pollard TD, Hanein D (2001) Structure of Arp2/3 complex in its activated state and in actin filament branch junctions. *Science* 293:2456-2459.

Welch MD, Mullins RD (2002) Cellular control of actin nucleation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 18:247-288.

Winter D, Lechler T, Li R (1999a) Activation of the yeast Arp2/3 complex by Bee1p, a WASP-family protein. *Current Biology* 9:501-504.

Winter DC, Choe EY, Li R (1999b) Genetic dissection of the budding yeast Arp2/3 complex: A comparison of the in vivo and structural roles of individual subunits.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96:7288-7293.

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

Zaki M, King J, Futterer K, Insall RH (2007) Replacement of the essential *Dictyostelium* Arp2 gene by its *Entamoeba* homologue using parasexual genetics. *Bmc Genetics* 8.

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

Zhang XG, Dyachok J, Krishnakumar S, Smith LG, Oppenheimer DG (2005) IRREGULAR TRICHOME BRANCH1 in *Arabidopsis* encodes a plant homolog of the actin-related protein2/3 complex activator Scar/WAVE that regulates actin and microtubule organization. *Plant Cell* 17:2314-2326.

Zuchero JB, Coutts AS, Quinlan ME, La Thangue NB, Mullins RD (2009) p53-cofactor JMY is a multifunctional actin nucleation factor. *Nature Cell Biology* 11:451-U198.