

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Studijní program: Experimentální biologie rostlin

Studijní obor: Buněčná a molekulární biologie rostlin



Matěj Semerák

**Vliv Arp2/3 komplexu na strukturu vakuomu,
cytoplasmatické proudění a pohyblivost diktyosomů**

**The effect of Arp2/3 complex on vacuolar structure,
cytoplasmic streaming and dictyosome motility**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitelka: RNDr. Kateřina Schwarzerová, Ph.D.

Praha 2016

PODĚKOVÁNÍ

Chtěl bych na tomto místě poděkovat své školitelce, RNDr. Kateřině Schwarzerové, Ph.D., za zadání zajímavého tématu, rady, konsultace, přátelský přístup a korektury práce před jejím odevzdáním. RNDr. Janu Petráškoví, Ph.D. děkuji za nápady, návrhy a asistenci při mikroskopii, doc. RNDr. Fatimě Cvrčkové, Dr.rer.nat. za poskytnutí semen mutanta *fh1-1*.

Dále jsem vděčný svým starším kolegům z laboratoře, jmenovitě Standovi Vosolsobě, s nímž jsem probíral zpracovávání dat, Petře Schiebertové, jež mi vždy s čímkoli nadšeně pomohla nebo mně poradila, Juditě García Gonzáles, která mne učila práci s DNA, Martině Benákové, jež projevovala obdivuhodnou snahu mě vytrvale motivovat, Janě Krtkové, která vidí věci bez obalu a v nezkreslené podobě, a Vaiduryovi Pratap Sahimu, jenž zařídil mé vysvobození při poruše dveřního mechanismu objektu Katedry genetiky a mikrobiologie. Za nezměrnou duševní podporu (a pomoc při transformacích) jsem zavázán Lence Sikorové.

Mým spolužákům (Pavlíně Miklánkové, Janu Martinkovi, Ivetě Zajícové a Radku Lefnarovi) patří dík za jejich ochotu kdykoli pomoci, Pavlíně a Ivetě pak navíc za jejich výtečné pekařské výrobky. Našemu laborantovi Petru Jírovcovi děkuji za přípravu médií, zajišťování chodu laboratoře a za humor, jež kolem sebe šíří.

Všichni zmínění si pak zaslouží dík za vytvoření příjemného ovzduší na pracovišti. Kromě toho cítím velkou úctu ke svým rodičům, kteří během uplynulých tří let snášeli soužití se mnou s nekonečnou trpělivostí.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci sepsal samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena za účelem zisku jiného nebo stejného akademického titulu. Souhlasím s jejím zapůjčováním.

V Praze dne

Poznámka k pravopisu

Při psaní slov přejatých jsem se přikláněl k původní podobě, potažmo variantě se „s“. Vedla mne k tomu skutečnost, že fonetický pravopis v některých případech svým nerespektováním etymologie slov zbytečně zastírá jejich význam (např. *diktyozom*). V zájmu jednoty jsem toto dodržel u všech výrazů, kde takové dilema* nastává, a to bez ohledu na to, zda tyto pocházejí z řečtiny, nebo latiny, a na to, v které části slova se sporné písmeno vyskytuje. Jedinými výjimkami jsou některé oficiální názvy a také slovo *fáze*, jehož podob *fase* nebo *fáse* (dle *φάση*) se v češtině takřka vůbec neuzívá.

* Jinde – např. právě ve slovech typu *dilema* – se původního pravopisu (*δίλημμα*) nedržím.

SEZNAM VÍCEKRÁT UŽITÝCH ZKRATEK

Anova	<i>analysis of variance</i> , rozptylová analýza
ARP	<i>actin-related protein</i> , bílkovina související s aktinem
ATP	adenosintrifosfát
BDM	2,3-butandionmonoxim
DMSO	dimethylsulfoxid
FH	<i>formin-homology</i> , příbuzný forminu – označení domén či proteinů
(E)GFP	<i>(enhanced) green fluorescent protein</i> , (zesílená) zeleně fluorescenční bílkovina
latB	latrunculin B
LB	Luria & Bertani (médiu)
MS	Murashige & Skoog (médiu)
(m)RFP	<i>(monomeric) red fluorescent protein</i> , (monomerní) červeně fluorescenční bílkovina
SEM	<i>standard error of the mean</i> , standardní chyba průměru
SOC	Super Optimal Broth s glukosou (médiu)
s/S	nestandardní jednotka snímkové frekvence [sekunda/snímek] = [Hz ⁻¹]
wt	<i>wild-type</i> , „divoká“, nemutovaná rostlina
YEB	Yeast Extract Broth (médiu)

ABSTRAKT

Aktinová vlákna jsou v rostlinných buňkách nukleována dvojitým způsobem: Zatímco růst jednotlivých mikrofilament nebo jejich svazků umožňují různé typy forminů, větvené sítě vznikají působením komplexu Arp2/3. Mutace v genech těchto nukleátorů vedou k rozličným fenotypovým projevům.

Tato práce zkoumá především důsledky nefunkčnosti podjednotek Arp2/3 komplexu pro nitrobuněčnou pohyblivost (cytoplasmatické proudění, *stop-and-go* skoky cisteren Golgiho aparátu), neboť tato dosud nebyla nikým rozsáhleji studována, a snaží se též kvantifikovat již známý vliv mutací genů pro podjednotky ARP2 a ARPC5 na morfogenesi vakuomu. Pro porovnání bylo při měření cytoplasmatického proudění uskutečněno také několik experimentů s rostlinami mutantními v genu pro formin FH1.

Pokusy byly prováděny s modelovou rostlinou *Arabidopsis thaliana*. Metodika zejména zahrnovala transformaci fluorescenčními markery pomocí *Agrobacterium tumefaciens* (případně použití fluorescenční barvy), mikroskopii (standardní i konfokální) a následné vyhodnocení získaných dat v počítači. Při studiu cytoplasmatického proudění bylo zkoumáno též působení cytoskeletální drogy latrunculinu B.

Výstupy neprokázaly, že by se defekty Arp2/3 komplexu projevovaly na chování diktyosomů; také nevyvolávají žádné obecné změny v toku cytoplasmy. Předběžná data naznačují, že ani absence forminu FH1 rychlost cytoplasmatického proudění průkazně neovlivňuje. Byla však potvrzena fragmentace vakuolárního systému pokožkových buněk listu mutantů *arp2* a *arpc5* a dřívější výsledky byly zpřesněny.

Klíčová slova

Arp2/3 komplex, cytoplasmatické proudění, pohyb diktyosomů, vakuolární systém

ABSTRACT

In plant cells, actin filaments are nucleated in two different ways: The growth of single filaments or their bundles is enabled by various types of formins, whereas branched meshworks emerge due to Arp2/3 complex activity. Mutations in genes of these nucleators lead to various phenotypic traits.

This thesis deals in the first place with influence of Arp2/3 complex subunits' dysfunction on intracellular motility (cytoplasmic streaming, *stop-and-go* movements of Golgi apparatus cisternae), since it had not been extensively studied before, and also attempts to quantify the already known impacts of mutations in genes for ARP2 and ARPC5 subunits on the vacuolar morphogenesis. For comparison, a few experiments with plants which carried a mutation in gene for FH1 formin were also realised when measuring the cytoplasmic streaming.

The experiments were conducted with a model plant *Arabidopsis thaliana*. The methods particularly included transformation with fluorescent markers by *Agrobacterium tumefaciens* (or usage of a fluorescent dye), microscopy (both standard and confocal) and subsequent evaluation of the acquired data using a computer. During the cytoplasmic streaming research, effects of cytoskeletal drug latrunculin B were studied, too.

The outputs did not prove that the Arp2/3 complex defects would manifest themselves on the behaviour of dictyosomes; nor do they cause any general changes of the cytoplasmic flow. Preliminary data indicate that neither the absence of FH1 formin does significantly influence the velocity of cytoplasmic streaming. However, vacuolar system fragmentation in the leaf epidermis cells of *arp2* and *arpc5* mutants was confirmed and former results were refined.

Key words

Arp2/3 complex, cytoplasmic streaming, dictyosome motility, vacuolar system

OBSAH

1. Úvod	9
2. Přehled problematiky v literatuře	10
2.1. Nukleátory aktinových vláken	10
2.1.1. Komplex Arp2/3	10
2.1.1.1. Projevy mutací, funkce komplexu	10
2.1.2. Forminy	13
2.1.2.1. Projevy mutací	13
2.2. Aktinový cytoskelet a H ⁺ -ATPasa	14
2.3. Cytoplasmatické proudění	15
2.3.1. Myosiny	16
2.3.1.1. Myosiny VIII	16
2.3.1.2. Myosiny XI	16
2.4. Pohyblivost Golgiho aparátu	18
3. Hypothesy a cíle	19
4. Metodika	20
4.1. Statistické metody	20
4.2. Materiál	20
4.3. Pěstební postup	20
4.4. Vytvoření linií s vnesenými geny	22
4.4.1. Transformace genem pro GFP	22
4.4.1.1. Selektce	22
4.4.2. Transformace genem pro čidlo pH	23
4.5. Studium pohybu váčků Golgiho aparátu	25
4.5.1. Mikroskopie a výběr diktyosomů	25
4.5.1.1. Výběrový rámeček	25
4.5.1.2. Výběr skákavých váčků	25
4.5.2. Zpracování dat	25
4.6. Pozorování cytoplasmatického proudění	27
4.6.1. Příprava rostlin a mikroskopie	27
4.6.1.1. Proudění cytoplasmy v kořenech a ošetření latrunculinem B	27
4.6.1.2. Proudění cytoplasmy v hypokotylech	27
4.6.2. Měření rychlosti proudění	28
4.7. Analýza vakuolárního systému	29
4.7.1. Barvení a mikroskopie	29
4.7.2. Zpracování a hodnocení obrázků	29
4.8. Mikroskopie rostlin transformovaných čidlem pH	29
5. Výsledky	30
5.1. Pohyblivost Golgiho aparátu	30
5.1.1. Výběr diktyosomů rámečkem	30

5.1.1.1. Grafy rozložení rychlostí	30
5.1.1.2. Průměrné rychlosti (3 s/S)	32
5.1.2. Výběr skákavých diktyosomů	33
5.1.2.1. Grafy rozložení rychlostí	33
5.1.2.2. Průměrné rychlosti (3 s/S)	33
5.2. Cytoplasmatické proudění	34
5.2.1. Kořeny	34
5.2.2. Etiolované hypokotyly	35
5.2.3. Zelené hypokotyly	36
5.3. Rozložení pH v buňce	37
5.4. Vakuolární systém	38
6. Diskuse	42
6.1. Pohyblivost Golgiho aparátu	42
6.1.1. Volba rostlinného materiálu a výběr diktyosomů	42
6.1.1.1. Výběrový rámeček	42
6.1.1.2. Výběr skákavých váčků	43
6.1.2. Snímací frekvence	43
6.1.3. Zpracování získaných dat	44
6.1.4. Výsledky	45
6.1.5. Poznámky k metodice, úvahy	45
6.2. Cytoplasmatické proudění	47
6.2.1. Volba rostlinného materiálu a místa pozorování	47
6.2.2. Výběr částic a měření rychlosti	47
6.2.3. Výsledky	48
6.2.4. Poznámky k metodice, úvahy	49
6.3. Rozložení pH v buňce	50
6.4. Vakuolární systém	51
6.4.1. Volba rostlinného materiálu	51
6.4.2. Způsob měření	51
6.4.3. Výsledky	51
6.4.4. Poznámky k metodice, úvahy	51
7. Závěrečné shrnutí	52
8. Použitá literatura	53
9. Přílohy	59
9.1. Souřadnicové grafy pohybu diktyosomů	59
9.2. Ukázky spojnicových grafů pohybu diktyosomů	66

1. ÚVOD

Cytoskelet se v rostlinné buňce podílí na plejádě procesů – od dopravy váčků či organel až po syntésu stěny nebo dělení. Mutace bílkovin, které cytoskelet tvoří, příp. se na něj vážou, vedou k poruchám růstu, morfogenese, gravitropismu, ustavování buněčné polaridy aj. Dramatický dopad mívá též aplikace cytoskeletálních drog, např. latrunculinu, cytochalasinu, oryzalinu nebo kolchicinu.

Aktin a jeho polymery, stavební kameny jednoho ze dvou hlavních typů cytoskeletu rostlinných buněk, mají nejružnější funkce: Svazky aktinových vláken plní úlohu kolejnic pro kráčivé molekuly myosinu, jež umožňují nejrychlejší známý nitrobuněčný transport nákladu. Jemnou aktinovou síť najdeme v okolí chloroplastů; v případě potřeby je schopna vyvolat jejich přesuny. Krátká aktinová filamenta hrají roli při vnímání gravitace pomocí statolitů.

Mezi mnoha proteiny, které s mikrofilamenty interagují (ARPs: *actin-related proteins*, bílkoviny související s aktinem; ABPs: *actin-binding proteins*, bílkoviny vázající se na aktin), vyniká Arp2/3 komplex a forminy; tyto se totiž dokážou účastnit nukleace – vzniku vláken *de novo*. Zatímco Arp2/3 komplex se pravděpodobně podílí hlavně na tvorbě jemnějších sítí, podstatných např. pro morfogenesi tvarově komplexních buněk (třebaže všechny jeho funkce dodnes nebyly uspokojivě objasněny), forminy nukleují nevětvená filamenta (některé hrají roli při vzniku svazků; ty mohou sloužit coby účinné dopravní tepny pro myosinové motory s náklady).

Vzhledem k tomu, že Arp2/3 komplex a forminy jsou u rostlin jedinými známými nukleátory mikrofilament, dalo by se očekávat, že jejich poškození povede k vážným potížím při nejružnějších procesech, jichž se aktinový cytoskelet účastní.

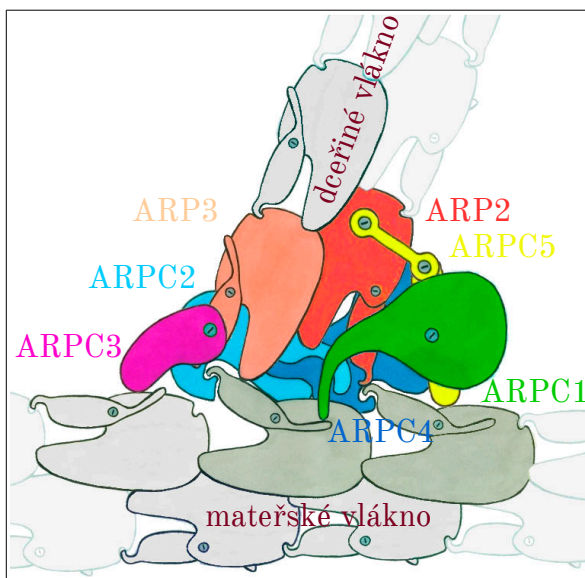
2. PŘEHLED PROBLEMATIKY V LITERATUŘE

2.1. NUKLEÁTORY AKTINOVÝCH VLÁKEN

Spontánní polymerace aktinových podjednotek v buňce za běžných podmínek neprobíhá (náhodně vzniklé oligomery se rychle rozpadají). Díky nukleačním faktorům, proteinům umožňujícím tvorbu mikrofilament *de novo*, lze tuto počáteční nestabilitu různými způsoby překonat [Chesarone & Goode 2009].

Zatímco v rostlinných buňkách byly dosud popsány pouze dva druhy nukleace (s účastí Arp2/3 komplexu a pomocí početné rodiny forminů [Staiger & Blanchoin 2006]), u živočichů v této funkci vystupují i jiné proteiny – např. Spire, Cordon Bleu nebo Leiomodin [Chesarone & Goode 2009].

2.1.1. KOMPLEX ARP2/3



Podjednotky heteroheptameru Arp2/3, dnes nazývané ARP2, ARP3 a ARPC1 až ARPC5, byly poprvé izolovány roku 1994 z měňavky [Machesky & kol. 1994]. Později se zjistilo, že tento komplex nasedá ze strany na aktinová vlákna a rovněž váže špičaté, (—) konce jiných, „dceřiných“ mikrofilament, čímž navozuje větvení aktinového cytoskeletu. Díky snímkům z elektronového mikroskopu bylo možno změřit úhel odstupujících vláken: přibližně 70 stupňů [Mullins & kol. 1998].

Obr. 1: Arp2/3 komplex podle Rouiller & kol. 2008

Na modelu struktury Arp2/3 komplexu a jeho vazby na aktinová filamenta (obrázek 1) je patrné, že proteiny ARP2 a ARP3 se velmi podobají monomerům aktinu a že tvoří první dvě podjednotky odvětvujícího se vlákna [Rouiller & kol. 2008]. Konformaci podobnou té na obrázku 1 komplex zaujímá i při svém dalším úkolu – jakožto čepičkující protein (—) konce mikrofilament [Volkman & kol. 2014]. Kosedimentace a kolokalisace podjednotky ARPC2 s mikrotubuly pak prozrazují také spojitost s mikrotubulárním cytoskeletem, čímž předjímají objevy dalších, dosud neznámých úloh Arp2/3 komplexu [Havelková & kol. 2015].

2.1.1.1. Projevy mutací, funkce komplexu

Komplex se podílí na vzniku panožek některých typů živočišných buněk [Svitkina & Borisov 1999]. Pro kvasinky jsou ztráty jednotlivých podjednotek letální, případně způsobí snížení životaschopnosti či přivede k vážným fenotypovým projevům [Winter & kol. 1999], u myši hraje

Arp2/3 komplex důležitou roli při fagocytose tuků v tenkém střevě [Zhou & kol. 2015]. V savčích vaječných buňkách zřejmě polymerace aktinu pomocí Arp2/3 komplexu vyvolává cytoplasmatické proudění specifického druhu, které je důležité ke správnému umístění meiotického vřeténka [Yi & kol. 2012].

Naproti tomu u rostlin mutace dramatické účinky nemají: Dochází sice např. ke zkroucení trichomů, změně uspořádání aktinového cytoskeletu v pokožkových buňkách listu a částečné ztrátě jejich laločnatosti, ale celkový vzrůst příliš ovlivněn nebývá [Li & kol. 2003]. K fenokopii defektního vývoje trichomů vede aplikace cytochalasinu D, což značí, že správná organizace aktinových vláken je pro jejich normální vzrůst zásadní [Szymanski & kol. 1999]. Morfologické vady při absenci podjednotek Arp2/3 komplexu tedy zjevně souvisejí s narušením aktinové sítě.

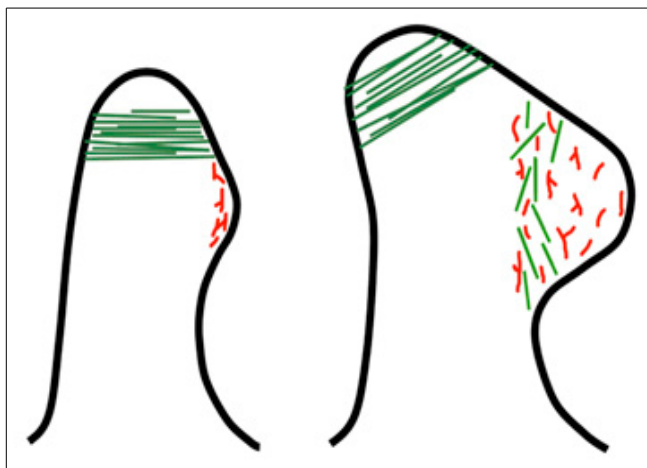
U mechu byly popsány poněkud vážnější důsledky mutací než u cévnatých rostlin: Delece podjednotky ARPC4 výrazně postihne vrcholový růst buněk, což vede ke zmenšení kolonií (čepenky odstálé), a vyústí v neschopnost správně reagovat na světelný signál [Perroud & Quatrano 2006]. Ztráta proteinu ARP3 má podobný vliv – buňky prvoklíčků se takřka neprodlužují; kromě toho se nevytvářejí pakořínky, takže se mech nemůže uchytit v podkladu. U rostlin *arp3* nebyla v místech, kde by buňky za normálních okolností měly růst, zaznamenána obvyklá hvězdicovitá aktinová síť [Finka & kol. 2008].

Třebaže huseníček vykazuje mírnější projevy mutací, cytoskelet je zda zasažen obdobně: Zatímco v buňkách *wt* (*wild-type*, divoký kmen) se zpravidla vyskytují jasně definované oblasti s jemnou sítí aktinu, nefunkční podjednotka ARPC5 způsobí chaotičnost jejich rozložení. U trichomů to zjevně vede k jejich narušené expansi, u pokožkových buněk k pozorovanému omezení vývoje laločnatých výběžků [Mathur & kol. 2003a].

V práci jsou představeny experimenty s mutanty *arp2* a *arp5*; lze tedy porovnat vliv mutace jedné podjednotky, jež je klíčová pro interakci s nově vznikajícím vláknem, a jedné, která se nachází spíše na periferii komplexu. Vybrané publikované projevy (u huseníčku) shrnuje tabulka 1:

<i>arp2</i>	<i>arp5</i>
zkroucené listové trichomy, zvlněné kořenové vlásky, pozměněná svazkovitost aktinových vláken v trichomech a buňkách hypokotylu, snížená laločnatost pokožkových buněk listů, narušená vakuolární fuse, menší vzrůst rostlin	zkroucené listové trichomy, zvlněné kořenové vlásky, pozměněná svazkovitost aktinových vláken v trichomech a shlukování diktyosomů tamtéž, snížená laločnatost pokožkových buněk listů, tvarové změny buněk hypokotylu

Tab. 1: fenotypové projevy mutací podjednotky ARP2 nebo ARPC5 podle Mathur 2005



Obr. 2: model vývoje trichomu dle Sambade & kol. 2014; nejdříve je v oblasti vznikající větve přítomna aktinová síť (červeně), pak se utváří mikrotubulární prstenec (zeleně)

Pro normální vzrůst trichomů je patrně nezbytná souhra jak aktinového, tak mikrotubulárního cytoskeletu (jak ukazuje obrázek 2), a také cisteren Golgiho aparátu [Sambade & kol. 2014]. Důležitou roli hraje i buněčná stěna – hlavně gradienty její mocnosti a strukturní různorodost, (ne)dovolující difusní růst v daném místě.

Síťovina vláken nukleovaných Arp2/3 komplexem zřejmě ovlivňuje uspořádání aktinových svazků, po nichž jsou dopravovány váčky obsahující materiál právě pro stavbu stěny; ta má u trichomů mutantů *arpc2* v průměru téměř dvojnásobnou tloušťku ve srovnání s wt, a tato navíc se vzdáleností od špičky příliš neroste, jak tomu u nemutovaných rostlin bývá. Spřažení tvorby stěny a růstu trichomu zde tedy plně nefunguje – možná není sladěna syntéza celulosy s dodávkou dalších stavebních složek, případně rozvolňujících faktorů. Navíc bylo zjištěno, že velikost MDZ (*microtubule-depleted zone*, zóna prostá mikrotubulů), ve wt trichomech zabírající vrcholy větví, u mutantů *arpc2* méně koreluje s tvarem větve. Posice této oblasti v mutantních trichomech také není tak přesná [Yanagisawa & kol. 2015].

Arp2/3 komplex a vakuoly

Ve většině rostlinných buněk zaujímá (při dobrém zásobení vodou) centrální vakuola značnou část objemu, leckdy až 90 %. Aktinový cytoskelet (spolu s myosiny) má na morfogenesi vakuolárního systému značný vliv; podílí se např. na tvorbě a udržení cytoplasmatických provazců [Higaki & kol. 2006].

Jak už bylo zmíněno v tabulce 1, některé mutace Arp2/3 komplexu vedou ke změnám v utváření vakuomu. Nefunkčnost podjednotek ARP2 nebo ARP3 zapříčiní výskyt malých, periferních vakuol v trichomech, kdežto u wt rostlin tyto zpravidla nejsou pozorovány. Tento fakt může rovněž přispět k narušenému tvaru trichomů [Mathur & kol. 2003b]. Také ve svěracích buňkách průduchů mají mutace obdobný důsledek: U rostlin *arp2* i *arp3* vzroste oproti wt 3× až 4× podíl těch, jejichž vakuom je fragmentovaný [Li-Chuan & kol. 2013].

Podobný fenotypový projev (v pokožkových buňkách děložních listů) popsala ve své diplomové práci Petra Schiebertová, a to u všech dostupných linií mutantních v Arp2/3 komplexu – zvláště pak u rostlin *arpc5* a *arp2/arpc5* [Schiebertová 2013].

2.1.2. FORMINY

Kromě Arp2/3 komplexu mají rostliny pro nukleaci aktinu k dispozici konservovanou rodinu forminů. Jejich FH1 (*formin-homology*, forminu příbuzná) doména váže profilin, FH2 doménou jsou připojeny k voutsatému, (+) konci mikrofilamenta [Kovar & Pollard 2004]. FH2 doména má dimerický charakter a tvoří prstencovou strukturu pro vazbu dvou aktinových podjednotek [Otomo & kol. 2005]. Rostoucí vlákno je nevětvené.

Během evoluce docházelo ke ztrátám i získům genů pro různé forminy; huseníček jich má 21 (FH1 až FH21), řazených do dvou tříd [Cvrčková & kol. 2004]. Jednotlivé isoformy bezpochyby plní nejrůznější funkce; např. formin FH4 váže (prostřednictvím GOE domény) i mikrotubuly [Deeks & kol. 2010], některé také propojují cytoskelet s endomembránami [Cvrčková & kol. 2015].

V práci byly používány rostliny defektní v genu pro FH1; tento je tzv. neprocesivním forminem – nezůstává na (+) konci filamenta, nýbrž se po jeho nukleaci přesune na bok a účastní se vzniku silných svazků vláken [Michelot & kol. 2006]. Kromě toho proniká molekula tohoto forminu skrz membránu a svou *N*-koncovou doménou je kotvena v buněčné stěně. Tím zajišťuje pevné propojení aktinových vláken s extracelulárním prostorem [Martinière & kol. 2011].

2.1.2.1. Projevy mutací

Poprvé byly fenotypové projevy spojené s nefunkčností forminů popsány u myší; jednalo se o závažné poruchy vývoje ledvin nebo srůsty končetin [Kleinebrecht & kol. 1982]. Rostliny mutantní v genech pro jednotlivé forminy často vykazují např. změny množství nebo uspořádání aktinových vláken či poruchy buněčného dělení a růstu pylových láček [van Gisbergen & Bezanilla 2013].

Huseníček postrádající funkční formin FH1 má v buňkách pozměněnou svazkovitost mikrofilament; tvar buněk kořene a vrcholový růst je narušený. Citlivěji reaguje na působení cytoskeletální drogy latrunculinu (lat) B [Rosero & kol. 2013].

2.2. AKTINOVÝ CYTOSKELET A H^+ -ATPasa

Nejnámější funkcí H^+ -ATPasy (enzymu štěpícího ATP, adenosintrifosfát) v buňkách bude nepochybně okyselování obsahu (nejen) vakuol, nicméně výzkumy svědčí také o jejích dalších, nekanonických rolích. Tento proteinový komplex, na první pohled nesouvisející s cytoskeletem, totiž interaguje s aktinovými vlákny [Lee & kol. 1999].

Vazebná místa pro aktin byla objevena na jeho podjednotce B [Holliday & kol. 2000]; posléze vyšlo najevo, že podjednotka C je vazby schopna rovněž [Vitavska & kol. 2003], a to na monomerní aktin i na filamenta, a že navíc vlákna stabilisuje a dokonce se účastní jejich svazkování [Vitavska & kol. 2005].

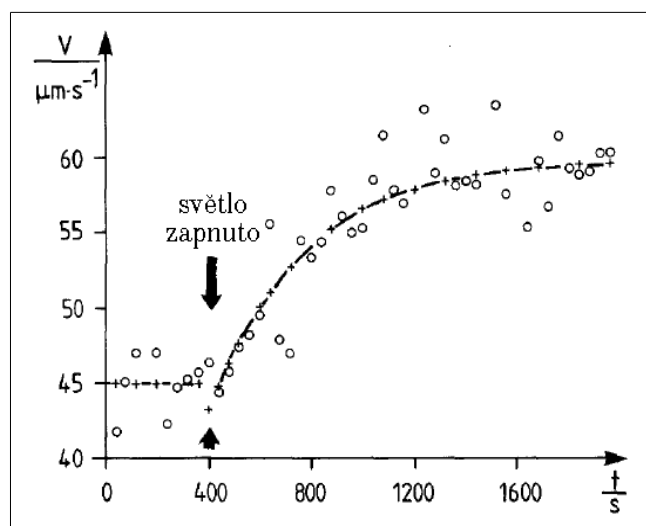
Třebaže uvedené skutečnosti byly zprvu zjištěny u živočišných buněk, ukázalo se, že také všechny tři isoformy H^+ -ATPasové podjednotky B kódované huseníčkem nasedají na (+) konce aktinových vláken a podílejí se na tvorbě svazků [Ma & kol. 2012].

Fakt, že aktinový cytoskelet má spojitost s komplexem, jenž se významně podílí na udržování rozdílných hodnot pH v různých buněčných kompartmentech, podněcuje úvahy, zda mutace aktinu nebo bílkovin, které se na něj vážou, nemohou buněčnou „mapu pH“ změnit. V dnešní době existuje řada látek, jichž se dá použít jakožto sensorů pH. Pro použití v buněčné biologii se nabízí elegantní řešení spočívající v transformaci geny, jejichž produkty v závislosti na kyselosti prostředí mění barvu (např. pHusion, viz podkapitolu 4.4.2), příp. jiné vlastnosti.

2.3. CYTOPLASMATICKÉ PROUDĚNÍ

Již italský botanik 18. století Bonaventura Corti pozoroval tzv. cyklosu v obřích, až 10 cm dlouhých buňkách internodií parožnatek [Corti 1774]. A právě některé druhy zelených řas vykazují jeden z nejrychlejších toků cytoplasmy (desítky $\mu\text{m/s}$) ze všech studovaných organismů [Kamiya & Kuroda 1956], pročež bývají oblíbeným modelem pro studium tohoto děje. U huseníčku dosahuje jeho rychlost v buňkách hypokotylu hodnot kolem $4,8 \mu\text{m/s}$ [Holweg 2007]. Coby funkce cyklosy bývá tradičně uváděn rovnoměrný rozvoz látek po velkých buňkách eukaryot.

Proudění pronikavě reaguje na podmínky (následující údaje platí opět pro buňky řas, a to parožnatek, příp. skleněnek): Carl Wilhelm von Nägeli zjistil kolem poloviny 19. století, že např. při zvýšení teploty z 1°C na 10°C se zrychlí více než $7\times$ [Hertwig 1920]; za fyziologických teplot je závislost přibližně lineární – na 1°C činí přírůstek cca $3 \mu\text{m/s}$ [Plieth & Hansen 1992].



Graf 1: křivka zrychlování cytoplasmatického proudění v buňkách řasy, jež byla po 2,5hodinové tmavé periodě ozářena modrou složkou světla 16W žárovky (tzn. přes filtr), podle Plieth & Hansen 1992

Také už se dlouho ví o komplexním vlivu záření různých vlnových délek a intenzit [Bünning 1939]; po osvětlení temnotně adaptované řasy modrým světlem běžné intenzity se za 15 minut rychlost proudění zvýší cca o 30 % [Plieth & Hansen 1992], jak je vidět na grafu 1.

Cytoplasma proudí podél svazků aktinových vláken [Palevitz & kol. 1974]; jednotlivá mikrofilamenta v nich mají shodnou orientaci. Narušení aktinového cytoskeletu aplikací latB v koncentraci stovek mol/l tok zastaví [Gibbon & kol. 1999], ale po vymytí drogy se tento (často v jiných pásech, než kde k němu docházelo předtím) díky znovuvytvoření svazků rychle obnoví [Foissner & Wasteneys 2000]. Modelování hydrodynamiky tenké vrstvy cytoplasmy buněk řas, vymezené dvěma válcovými plochami (plasmatickou a vakuolární membránou), odhalilo samouspořádací vlastnosti mikrofilament, díky nimž k takové regeneraci může dojít [Woodhouse & Goldstein 2013].

Na cytoplasmatické proudění má vliv též narušení činnosti forminů; důsledkem RNA interference proti forminu FH3 je (v pylových láčkách huseníčku) částečná ztráta jeho směrovanosti a snížení rychlosti cca o 45 % [Ye & kol. 2009]. Proudění se znatelně zpomaluje i působením obecného myosinového inhibitoru 2,3-butandionmonoximu (BDM) v koncentracích přes 10 mmol/l [Funaki & kol. 2004].

2.3.1. MYOSINY

Cytoplasmatický pohyb je vyvolán myosiny, kráčejičými vždy k (+) koncům aktinových vláken [Kersey 1976]. Myosiny ($\mu\text{v}\text{s}$, sval) byly extrahovány ze svalové hmoty žab již v 19. století [Kühne 1864]; dnes tyto motorické bílkoviny třídíme do rodin I až XVIII. Cévnaté rostliny kódují výhradně myosiny rodin VIII a XI, konkrétně huseníček 4 a 13 zástupců [Reddy & Day 2001].

Bývají to homodimerické proteiny s několika základními doménami: hlavovou (která se váže na aktinové vlákno a štěpí ATP) na *N*-konci, krční (obsahující motivy bohaté na sekvence IQ, schopné vazby regulačních ligandů – např. calmodulinu), šroubovitou (dimerisační) a ocasní (interagující s nákladem) na *C*-konci [Sparkes 2010].

2.3.1.1. Myosiny VIII

Myosin VIII-1 byl vůbec prvním, který se u rostlin podařilo popsat [Knight & Kendrick-Jones 1993]. Kromě něj dnes známe ještě podobný myosin VIII-A a dále myosin VIII-B, který si je zase blízký s posledním příslušníkem rodiny VIII, dnes nazývaným VIII-2 [Golomb & kol. 2008].

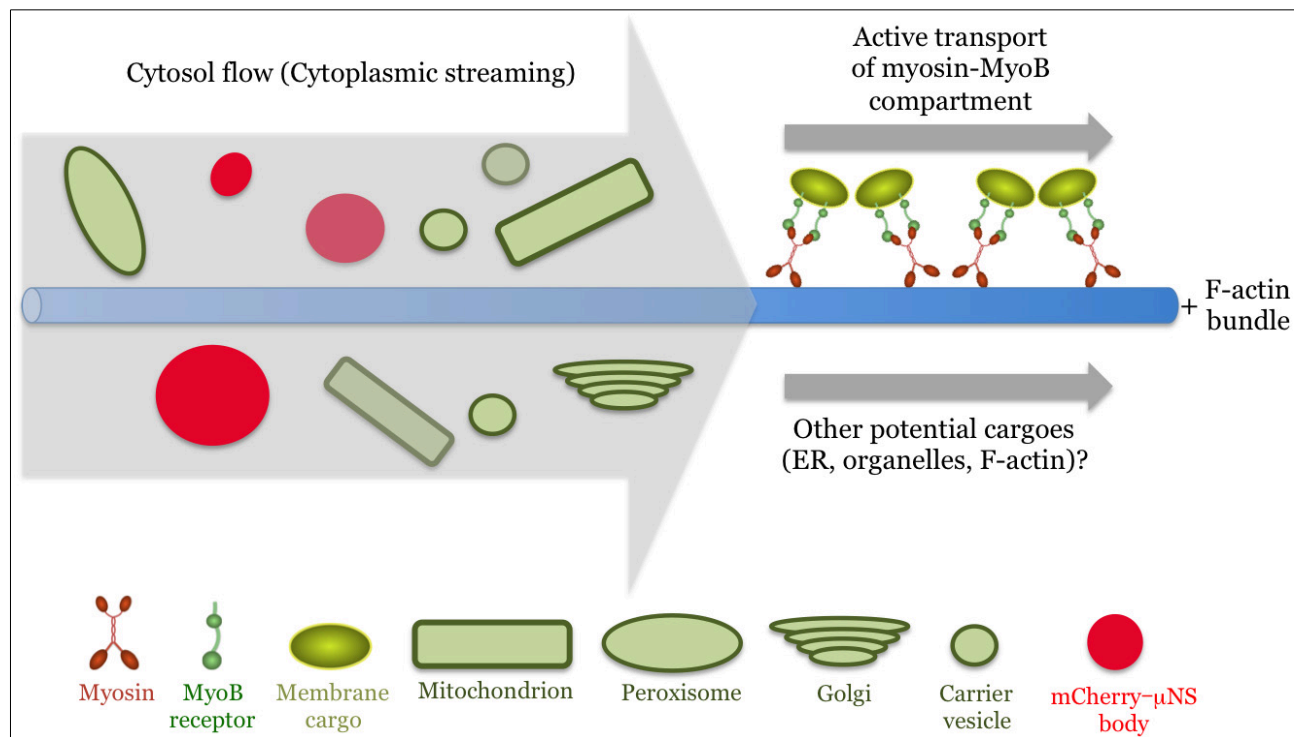
Kromě účasti při endocytose [Sattarzadeh & kol. 2008] patrně regulují propustnost plasmodesmů [Radford & White 1998], zajišťují správný růst fragmoplastu [Wu & Bezanilla 2014] a hrají roli při vzniku nové buněčné stěny [Reichelt & kol. 1999].

2.3.1.2. Myosiny XI

Do rodiny XI patří nejrychlejší známé motorické proteiny. Výše zmíněné zelené řasy kódují myosin kráčejičící rychlostí až 60 $\mu\text{m/s}$ [Rivolta & kol. 1995], z tabáku byl izolován myosin s 35nm krokem a výslednou rychlostí 7 $\mu\text{m/s}$ [Tominaga & kol. 2003]. Celkově nalézáme u vyšších rostlin myosiny XI-A až XI-K a dále XI-1 a XI-2 [Sparkes 2010].

Přítomnost myosinů XI je pro normální chod nitrobuněčných pohybů nezbytná. Zdá se ovšem, že na ně zpravidla nejsou napojeny třeba přímo organely, nýbrž zvláštní druh dopravních váčků, nesoucích ve své membráně receptor MyoB. Ten obsahuje vysoce konservovanou doménu DUF593 (*domain of unknown function*, doména s neznámou funkcí), jež se váže k ocasu myosinu [Peremyslov & kol. 2013]. Aktivním transportem těchto vesikulů je cytoplasmatické proudění zřejmě poháněno (obrázek 3).

Vypadá to však, že otázka, který z myosinů XI je pro tento proces nejdůležitější, stále nebyla uspokojivě zodpovězena. Směřovaný tok cytoplasmy se totiž vůči hledě zpomaluje při mutaci myosinu XI-2 [Tominaga & kol. 2013], zatímco rychlých přesunů mitochondrií, peroxisomů nebo částí Golgiho aparátu se účastní myosin XI-K [Avisar & kol. 2008]. Ve své úloze se tento nicméně s dalšími členy třídy XI, přinejmenším XI-1 [Hachikubo & kol. 2007] a právě XI-2, patrně vzájemně překrývá a doplňuje [Prokhnevsky & kol. 2008].



Obr. 3: model cytoplasmatického proudění podle Peremyslov & kol. 2015; mCherry-μNS = virový protein označený fluoroforem, použitý autory ke stanovení rychlosti proudění

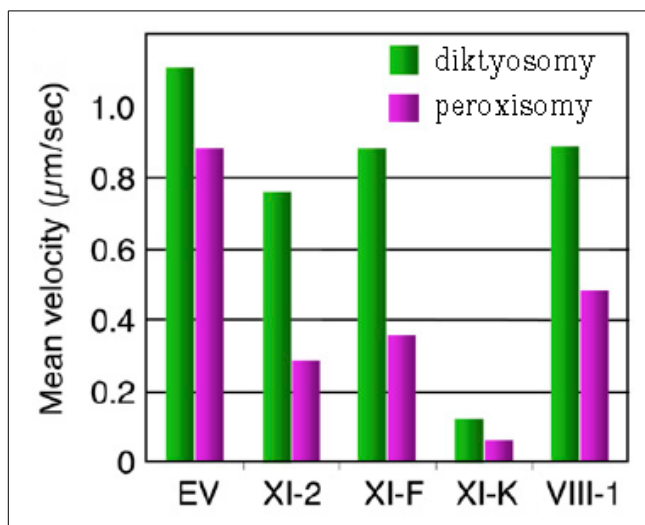
Každopádně myšlenka, že motorisovaný pohyb jednotlivých váčků k ustavení celkového cytoplasmatického proudění – zejm. díky tenkosti kortikální vrstvy a značné vazkosti cytoplasmy – plně postačuje, byla podpořena i počítačovou simulací nitrobuněčné hydrodynamiky [Wolff & kol. 2012].

Jak již bylo řečeno, rychlost cytoplasmatického proudění se u rostlin mezidruhově značně liší. Bylo zjištěno, že exprese chimerického myosinu XI-2 s motorovou doménou z parožnatky vyvolá v buňkách huseníčku zrychlení toku cytoplasmy a navodí též prodloužení řápků, zvětšení listových čepelí a vyšší vzrůst rostlin [Tominaga & kol. 2013].

2.4. POHYBLIVOST GOLGIHO APARÁTU

Rostlinný a živočišný Golgiho aparát se svým charakterem značně liší. Zatímco v buňkách živočichů obvykle tvoří stužkovitou strukturu v těsném sousedství centrosomu [Sütterlin & Colanzi 2010], u rostlin pozorujeme také malé, velmi motilní cisterny – diktyosomy (*δίκτυο*, síť + *σώμα*, tělísko), jak je roku 1910 nazval italský patolog Aldo Perroncito [Mollenhauer & Morré 1994]. Tyto částice vykazují notné interakce s tubuly endoplasmatického retikula [Boevink & kol. 1998], avšak dodnes nebylo objasněno, jestli se s nimi přechodně propojují, či s nimi komunikují výhradně prostřednictvím váčků [Robinson & kol. 2015]. Neví se ani, zda mají kontaktní místa na endoplasmatickém retikulu pevné umístění, nebo se mohou tvořit po celém jeho povrchu [Vildanova & kol. 2014].

Diktyosomy se po buňce přesouvají jednak spolu s cytoplasmatickým prouděním (viz předchozí podkapitulu), jednak příznačnými *stop-and-go* skoky, rovněž poháněnými myosiny. Nezřídka se též po delší dobu třepotají zhruba na místě [Nebenführ & kol. 1999]. V okrcích buňky s jemnou aktinovou sítí se pohybují převážně nesměrovaně, a to rychlostí $< 2 \mu\text{m/s}$, kdežto v oblastech (atrachoblastu huseníčku) se silnými svazky vláken dosahují rychlosti až $7 \mu\text{m/s}$ [Akkerman & kol. 2011].



Graf 2: průměrná rychlost cca 400 diktyosomů pokožkových buněk listů *Nicotiana Benthamiana* a její srovnání s hodnotami pro peroxisomy podle Avisar & kol. 2008; EV = kontrola, XI-2 až VIII-1 = rostliny overexprimující ocasní doménu příslušného myosinu

Průměrnou rychlost diktyosomů v buňkách tabáku uvádí graf 2. Výsledek pro wt je zde porovnán s hodnocením pohybu u mutantů s overexpresí myosinových ocasů – ty totiž vysytí vazebná místa na diktyosomech, takže příslušné funkční myosiny už se navázat nemohou [Avisar & kol. 2008].

Nejen zásahy do myosinového systému ovlivní chování Golgiho aparátu; k výraznému omezení pohyblivosti diktyosomů dojde též při overexpresi forminu FH1. Zcela ochromena je pak při aplikaci latB [Martinière & kol. 2011]. Jisté odchylky oproti wt byly pozorovány též v trichomech mutantů *arpc2* [Yanagisawa & kol. 2015], což asi – vzhledem k tomu, jak výrazně jsou jejich trichomy změněné a pokroucené – moc nepřekvapí.

3. HYPOTHESY A CÍLE

Tato krátká kapitola stručně nastiňuje několik hypotéz o vlivu mutací dotčených proteinů na jednotlivé studované děje nebo jevy a stanovuje cíle práce.

Pohyblivost Golgiho aparátu v buňkách pokožky listu

- Mutace Arp2/3 komplexu mají za následek změny v organizaci aktinového cytoskeletu – možná i těch vláken, jež se podílejí na pohybech Golgiho aparátu
⇒ diktyosomy se budou chovat jinak.
- Cílem je vhodným způsobem zhodnotit pohyblivost diktyosomů u wt a mutantů.

Cytoplasmatické proudění v buňkách kořene/hypokotylu

- Mutace Arp2/3 komplexu mají za následek změny v organizaci aktinového cytoskeletu – možná i těch vláken, po nichž jsou dopravovány váčky přispívající k proudění cytoplasmy – a navíc ovlivní i velikost centrální vakuoly (síla kortikální vrstvy je změněná, pohyb váček na ni má jiný účinek)
⇒ rychlost proudění bude změněna.
- Mutace forminu FH1 způsobí změnu ve svazkovitosti mikrofilament
⇒ nevzniká tolik silných kabelů vláken, proudění bude pomalejší.
- Cílem je porovnat rychlost cytoplasmatického proudění u wt a mutovaných rostlin.

Rozložení hodnot pH v rámci buňky

- Mutace Arp2/3 komplexu vyvolají snížení množství volných (+) konců aktinových vláken v buňce
⇒ méně H^+ -ATPas se váže na aktinový cytoskelet; jejich rozmístění bude změněno, což ovlivní pH v různých kompartmentech.
- Cílem je zavést metodu měření nitrobuňčného pH a použít ji pro wt rostliny i mutanty.

Vakuolární systém

- Mutace Arp2/3 komplexu způsobí fragmentaci vakuolárního systému a relativní zmenšení centrální vakuoly.
- Cílem je dosavadní výsledky zpřesnit a kvantifikovat.

4. METODIKA

4.1. STATISTICKÉ METODY

Statistických testů se z principu nedalo uplatnit na všechna data. Tam, kde to možné je, byla vypočítána standardní chyba průměru (SEM, *standard error of the mean*), a v případech, kdy to mělo smysl, bylo pro zjištění významnosti rozdílů mezi výsledky použito statistických testů: Rozptylové analýsy (Anovy) v případě, že se vzájemně porovnávaly všechny výsledky mezi sebou, a Studentova *t*-testu tehdy, vztahovalo-li se několik hodnot postupně k jedné referenční – týká se situací, kdy bylo třeba porovnat výsledek pro wt rostliny s výsledkem pro mutanty v témže proteinovém komplexu (*arp2* a *arp5*), ale ne tyto mutanty navzájem.

4.2. MATERIÁL

K výzkumu byly použity jednak wt rostliny huseníčku *Arabidopsis thaliana* (ekotyp *Columbia*), jednak rostliny téhož druhu nesoucí T-DNA inserční mutace v genech uvedených tabulkou 2:

ARP2	gen č. At3G27000; označení mutanta SALK_077920.56.00
ARPC5	gen č. At4G01710; označení mutanta SALK_123936.41.55
<i>FH1-1</i>	gen č. At3G25500; označení mutanta SALK_032981
<i>FH1-1/ARPC5</i>	zkřížené SALK_032981 × SALK_123936.41.55
<i>XI-K/XI-1/XI-2</i>	geny č. At5G20490, At1G17580 a At5G43900; zkřížené SALK_067972 × SALK_019031 × SALK_055785

Tab. 2: geny, jejichž mutace nesly rostliny používané při výzkumu

4.3. PĚSTEBNÍ POSTUP

Nejdříve byla semena (po krátkém odmaštění v 96% ethanolu) 15 minut sterilisována 50% roztokem Sava a následně čtyřikrát propláchnuta sterilní vodou. V ní se alespoň dva dny stratifikovala při 4 °C, poté byla vyseta na šikmé Petriho misky s polovičním médiem Murashigeho a Skooga (složení všech médií uvádí tabulka 3) a umístěna do kultivační místnosti s teplotou 23 °C a fotoperiodou 16 hodin.

Tyto *in vitro* rostliny byly po několika dnech používány k pozorování a měření, případně byly přesazeny do rašelinových tablet Jiffy a dopěstovány v sadbovačích, aby se získala semena pro další generaci.

1/2 MS (Murashige & Skoog) pH upraveno pomocí KOH, příp. H ₃ PO ₄ na 5,7; sterilováno při 120 °C a 1,5 kPa po dobu 20 minut	10,0 g sacharosy 844 mg NH ₄ NO ₃ 3,17 mg H ₃ BO ₃ 170 mg CaCl ₂ 0,01 mg CoCl ₂ • 6H ₂ O 0,01 mg CuSO ₄ • 6H ₂ O 19,1 mg disodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové 14,2 mg FeSO ₄ • 7H ₂ O 92,5 mg MgSO ₄ 8,65 mg MnSO ₄ • H ₂ O 0,01 mg Na ₂ MoO ₄ • 2H ₂ O 0,43 mg KI 972 mg KNO ₃ 87,0 mg KH ₂ PO ₄ 4,40 mg ZnSO ₄ • 7H ₂ O 8,00 g agaru
LB (Luria & Bertani) sterilováno autoklávováním	10,0 g peptonu 5,00 g kvasničného výtažku 10,0 g NaCl 17,5 g agaru
YEB (Yeast Extract Broth) sterilováno autoklávováním	5,00 g sacharosy 5,00 g peptonu 5,00 g masného výtažku 1,00 g kvasničného výtažku 1,00 g MgSO ₄ • 7H ₂ O 17,5 g agaru
SOC (Super Optimal Broth s glukosou) sterilováno filtrací; uchováno při — 20 °C	3,60 g glukosy 20,0 g peptonu 5,00 g kvasničného výtažku 0,50 g NaCl 0,19 g KCl 0,95 g MgCl ₂ 2,47 g MgSO ₄ • 7H ₂ O

Tab. 3: používaná média - roztoky uvedených látek v destilované vodě (na 1 litr celkového objemu)

4.4. VYTVOŘENÍ LINIÍ S VNESENÝMI GENY

Za účelem fluorescenčního zviditelnění buněčných kompartmentů byly do rostlin vneseny geny pro GFP nebo RFP. Pro měření pH bylo třeba transformovat rostliny genem pro pH sensor.

4.4.1. TRANSFORMACE GENEM PRO GFP

Zčásti byla semena rostlin s fluorescenčními markery získána díky předchozím transformacím, které provedla kolegyně Judith García Gonzáles; kvůli nízké úspěšnosti byly do některých linií vneseny geny znovu.

Kompetentní buňky *Agrobacterium tumefaciens* kmene C58C1 s plasmidem pGV2260 byly rozmrazeny na ledu. Do suspence bylo přidáno 1,5 μ l DNA (GFP marker pro Golgiho aparát, spojený s kanamycinovou resistencí, podle Nelson & kol. 2007), směs byla promíchána, ponechána jednu minutu v ledu, přenesena do vychlazené elektroporační kyvety a sklepnuta na dno. Elektroporace (2 kV, 200 Ω , 125,25 μ F) proběhla v přístroji Bio-Rad Gene Pulser Apparatus. Následně byl do kyvety vpraven 1 ml YEB média; vzniklá suspence byla vnesena do mikrozkušavky a umístěna na třepačku, kde se následně 3 hodiny kultivovala při 28 °C a 180 otáčkách za minutu.

Poté byla vyseta na plotnu s LB médiem a antibiotiky (2 mg rifampicinu + 1 mg kanamycinu na 20 ml média) a pěstována 3 dny při teplotě 28 °C. Byla odebrána jedna bakteriální kolonie, pomocí kličky nanesa na stěnu 100ml Erlenmayerovy baňky s 10 ml YEB média, 1 mg rifampicinu a 0,5 mg kanamycinu a vymyta do média. Kultivace probíhala 24 hodin za stálého třepání (180 otáček/min). Potom bylo 600 μ l inokula odebráno, přeneseno do litrové baňky s 300 ml LB média a opět umístěno na třepačku, kde bakterie rostly do druhého dne při 28 °C. Bakteriální kultura byla centrifugována při 4 °C a 3700 *g* po dobu 15 minut. Supernatant byl odstraněn, sediment rozčeřen do zbytkového objemu kapalně složky a převeden do 5% roztoku sacharosy s přísadkou smáčedla Silwett (v koncentraci 0,05 %). Vzniklá suspence byla nalita do vysokého odměrného válce.

Šestitýdenní rostliny byly zbaveny otevřených květů a nezralých šesulí a transformovány metodou *floral dip*: na 5 sekund celé ponořeny do válce. Následně byly vráceny do sadbovače, překryty fólií a ponechány přes noc ve tmě. Po odstranění fólie se pokračovalo ve standardní kultivaci a po dozrání semen byla sklizena T1 generace.

4.4.1.1. Selektce

Transformovaná semena byla v mikrozkušavkách sterilisována roztokem 25 ml 96% ethanolu, 5 ml Sava a 15 μ l smáčedla Triton X-100 po dobu 10 minut a dvakrát promyta ethanolem. Po jeho odsátí byla rozetřena po vnitřku zkumavky a sušena ve sterilním

prostředí cca 2 hodiny. Vyschlá semena byla vyseta na médium s přídatkem 1 mg kanamycinu na 20 ml; semenáčky bez vnesené resistance po několika dnech zašly, přeživší exempláře byly dopěstovány do semen.

Kvůli nízké úspěšnosti bylo postupně přistoupeno ke snížení koncentrace antibiotika na polovinu, aby se zvýšila šance záchytu mosaikovitě transformovaných rostlin. V některých případech nebyla selekce provedena kanamycinem, nýbrž opticky pomocí fluorescenčního mikroskopu.

4.4.2. TRANSFORMACE GENEM PRO ČIDLO pH

Z kodaňské laboratoře prof. Schulze byly obdrženy vektory pro cytoplasmatický (pK2GW7) a apoplastický (pMP3061) pH sensor pHusion – dle Gjetting & kol. 2012, viz dále – a vneseny do kompetentních bakterií *Escherichia coli* (kmen JM109):

Suspense bakterií byla rozmrazena v ledové lázni a smíchána s 3 μ l DNA. Po půlhodinové inkubaci v ledu následovala transformace metodou *heat shock* – vystavením teplotě 42 °C na 60 sekund. Pak se směs 2 minuty chladila na ledu a byl k ní přidán 1 ml SOC média. Kultivace trvala 1 hodinu a probíhala na třepače (150 otáček/min) při teplotě 37 °C. Poté byly bakterie rozetřeny na LB médium s antibiotikem (1 mg/20 ml; kanamycin pro kulturu s plasmidem pro apoplastický sensor, spektinomycin pro kulturu s plasmidem pro cytoplasmatický). Druhý den byly bakterie rozčárkovány a dalších 24 hodin pěstovány na LB médiu; izolované kolonie byly odebrány sterilní špičkou a ta byla vhozena do bakteriologické zkumavky s 3,5 ml tekutého LB média a příslušným antibiotikem. Kultury rostly přes noc na třepače v šikmém stojánku při 37 °C a 150 otáčkách/min.

Suspense byly přelity do mikrozkuvek a centrifugovány 5 minut při 10000 *g*. Supernatant byl odlit a hrdla zkumavek byla osušena savým papírem. Do každé bylo přidáno 250 μ l rozčerovacího činidla a usazenina byla resuspendována špičkou pipety. Následně bylo vpraveno 250 μ l roztoku navozujícího rozleptání buněk a obsah zkumavek byl několikrát promíchán otočením dnem vzhůru. Po cca 4 minutách bylo přidáno 10 μ l roztoku zásadité proteasy a směs byla čtyřikrát promísena obrácením zkumavek. Po dalších 5 minutách bylo vpraveno 350 μ l neutralizačního roztoku a zkumavky byly ihned čtyřikrát převráceny. Následovala 10minutová centrifugace při 14000 *g*.

Supernatant byl přelit do odstředovací kolony vsazené v mikrozkuvce a centrifugován při maximálních otáčkách po dobu 1 minuty. Proteklý obsah byl odstraněn a kolona naplněna 750 μ l promývacího roztoku. Po další minutové centrifugaci a vylití kapaliny bylo do kolony vpraveno 250 μ l roztoku; následná centrifugace trvala 2 minuty. Kolona byla přenesena do čisté mikrozkuvky, vymyta přidáním 50 μ l vody prosté nukleas a centrifugována 1 minutu. Čistota získané DNA byla změřena technologií *Nanodrop*.

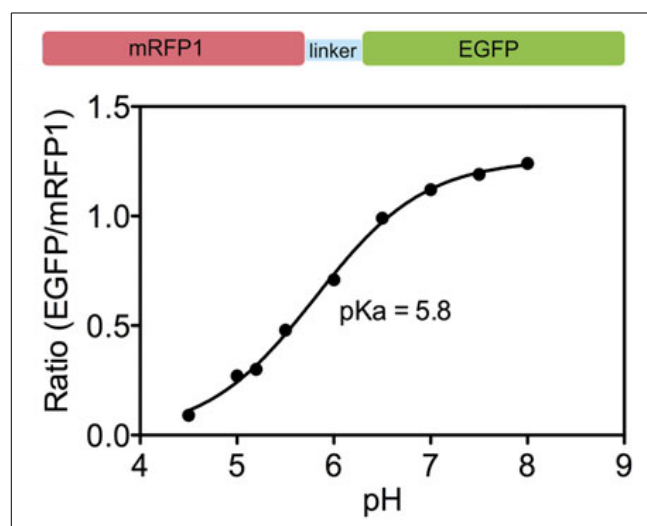
Připravená DNA byla natransformována do *Agrobacterium tumefaciens* a bakterie byly pěstovány (s kanamycinem nebo spektinomycinem) způsobem uvedeným v podkapitole 4.4.1. s tím rozdílem, že po 24hodinovém třepání ve 100ml baňce byla změřena optická densita při $\lambda = 600$ nm (OD_{600}) a podle ní část suspense přenesena do nové baňky s 25 ml čistého YEB média tak, aby výsledná $OD_{600} = 0,4$. Kultivace pokračovala na třepačce při 28 °C po dobu 6 hodin (OD_{600} dosáhla hodnoty 1,5) a pak byly suspense centrifugovány v 50ml zkumavkách 10 minut při 3000 *g*. Kapalná složka byla odlita a bakteriální usazenina resuspendována v 10 ml promývacího roztoku (10mM $MgCl_2$). Centrifugace se opakovala; supernatant byl znovu odstraněn a sediment rozčreňen ve 2 ml roztoku $MgCl_2$. Po změření OD_{600} vzniklé suspense byla tato ve dvou variantách naředěna do kokultivačního roztoku (viz tabulku 4), aby výsledná hodnota OD_{600} činila 0,3 a 0,6.

MS soli	1,1 g/l
sacharosa	10 g/l
smáčedlo Silwett	20 μ l/l
acetosyringon	200 μ mol/l
<i>Agrobacterium</i> v roztoku $MgCl_2$	$OD_{600} = 0,3$ nebo 0,6

Tab. 4: složení kokultivačního roztoku

Roztok byl po 1 ml nadávkován do jamkové destičky a byly do něj ponořeny 4denní rostliny (wt, *arp2* a *arp5*). Dvoudenní kokultivace probíhala potmě na třepačce (50 otáček/min).

pHusion, čídlo pH



Graf 3: struktura proteinu pHusion a poměr intenzit fluorescence jeho dvou složek při různých pH podle Gjetting & kol. 2012

pHusion je senzorem pH. Sestává z EGFP (*enhanced green fluorescent protein*, zesílená zeleně fluorescenční bílkovina) spojeného 5 aminokyselinami s mRFP (*monomeric red fluorescent protein*, monomer červeně fluorescenční bílkoviny); poměr intenzit jejich fluorescenční odezvy (viz graf 3) při daných excitačních parametrech závisí na pH [Gjetting & kol. 2012].

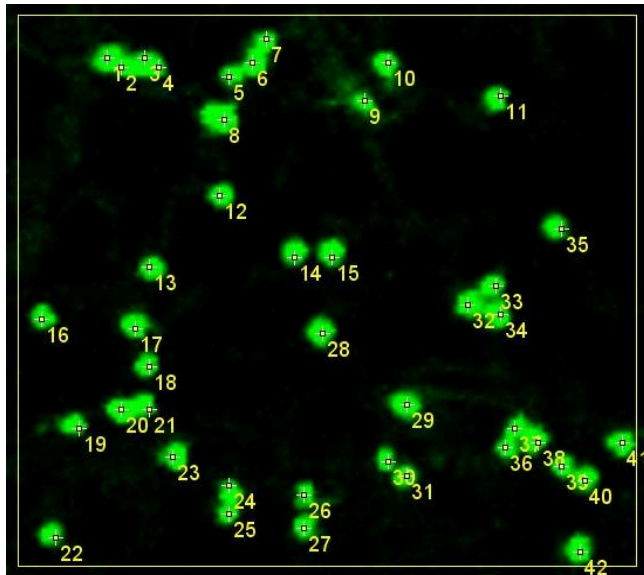
Zatímco fluorescence EGFP prudce slábne při poklesu pH pod 6 [Patterson & kol. 1997], odezva mRFP je za fyziologických podmínek podstatně stálejší [Campbell & kol. 2002].

4.5. STUDIUM POHYBU VÁČKŮ GOLGIHO APARÁTU

4.5.1. MIKROSKOPIE A VÝBĚR DIKTYOSOMŮ

Byly použity 6denní rostliny wt, *arp2* a *arp5* s vneseným GFP markerem pro Golgiho aparát (viz výše). Na konfokálním mikroskopu Leica TCS SP2 s nastavenou excitační vlnovou délkou 488 nm byla vodním objektivem 63× pořízena 60sekundová nebo 90sekundová videa kortikální vrstvy cytoplasmu buněk svrchní pokožky děložních listů. Snímková frekvence činila 1 obrázek za 3 s, 1,5 s nebo 0,64 s (dále uváděno v jednotkách [s/S] = [sekunda/snímek] = [Hz⁻¹], čili 3 s/S, 1,5 s/S a 0,64 s/S). Byly vybrány ty časověné sekvence, u nichž během snímání nedošlo k posunu roviny ostroty, a pro analýzu načteny programem ImageJ.

4.5.1.1. Výběrový rámeček



Na prvním snímku každého videa byla v místě bez zjevného směřovaného proudění vytyčena zhruba čtvercová oblast zahrnující přibližně 40 diktyosomů (viz obrázek 4). Tyto byly sledovány během celého trvání záznamu. Každý z těchto diktyosomů byl při všech expozicích (popř. dokud nezmizel) označen zaměřovacím křížem; vzniklé soubory dat tedy představují časový vývoj dvojice [x; y].

Obr. 4: příklad výběru diktyosomů k analýze jejich pohybu

4.5.1.2. Výběr skákavých váčků

Pro zajímavost a porovnání bylo také na pořízených záznamech (nezávisle na rámečcích z předchozí podkapitoly) vybráno 5 až 10 obzvláště trhaně se pohybujících diktyosomů (dále označovány jako skákavé). Sledovány byly taktéž zaměřovacím křížem, jak popsáno výše.

4.5.2. ZPRACOVÁNÍ DAT

K vyhodnocení byly údaje převedeny do programu Libre Office Calc. X-ová a y-ová souřadnice každé částice ze všech snímků videa byly zobrazeny na bodových grafech a spojeny čarami, čímž vznikly mapy pohybu diktyosomů. Další zpracování dat zahrnovalo spárování všech posic každého váčku s časovou souřadnicí příslušných snímků, výpočet všech meziexponičních drah, uražených jednotlivými diktyosomy, a jejich převod na odpovídající dílčí rychlosti. Z těch byl jednak stanoven průměr, jednak byly (v jednotkách $\mu\text{m/s}$)

roztříděny do intervalů $\langle 0; 0,1 \rangle$, $\langle 0,1; 0,2 \rangle$, $\langle 0,2; 0,3 \rangle$, $\langle 0,3; 0,4 \rangle$, $\langle 0,4; 0,5 \rangle$ a $\langle 0,5; \infty \rangle$, případně $\langle 0; 1 \rangle$, $\langle 1; 2 \rangle$, $\langle 2; 3 \rangle$, $\langle 3; 4 \rangle$, $\langle 4; 5 \rangle$ a $\langle 5; \infty \rangle$. Rozložení bylo vyneseno skládanými grafy. Kromě nich byly pro několik částic sestrojeny spojnicové grafy $v-t$, zachycující vývoj rychlosti jednoho diktyosomu během jeho pohybu.

Za účelem porovnání výsledků experimentů, během nichž byly pořízeny záznamy s rozdílnými snímacími frekvencemi, bylo nezbytné meziexposiční interval sjednotit. Proto bylo v souborech časoprostorových souřadnic získaných z videí o frekvenci 1,5 s/S vynecháním každé druhé posice dvojnásobně sníženo časové rozlišení – takto ochuzená data simulují $2 \times$ řidší snímkování (3 s/S). Obdobně se postupovalo i v případě dat s frekvencí 0,64 s/S: Jednak byly zprůměrovány výpočty ob jednu a ob dvě dvojice souřadnic (výsledek ne zcela přesně, ale přibližně odpovídá frekvenci 1,5 s/S), jednak byl proveden výpočet „ob čtyři“ (což se blíží frekvenci 3 s/S).

4.6. POZOROVÁNÍ CYTOPLASMATICKÉHO PROUDĚNÍ

4.6.1. PŘÍPRAVA ROSTLIN A MIKROSKOPIE

Bylo provedeno několik druhů pokusů, vždy s šestidenními rostlinami. Videa délky jedné minuty byla během všech popsanych experimentů pořízena na mikroskopu Olympus Provis AX70 objektivy 40× nebo 60× s použitím diferenciálního interferenčního kontrastu pomocí programu NIS Elements.

4.6.1.1. Proudění cytoplasmy v kořenech a ošetření latrunculinem B

Z *in vitro* pěstovaných rostlin (*wt*, *arp2*, *arpc5*, *fh1-1*, *fh1-1/arpc5* a *xi-k/xi-1/xi-2*) byly připraveny preparáty; pro pozorování byla vybrána oblast v blízkosti prvního (nejmladšího) primordia postranního kořene, snímalo se proudění cytoplasmy v buňkách primární kůry.

Pro ošetření latrunculinem byly rostliny přes noc ponořeny do 300nM latB, připraveného ze zásobního 2,5mM roztoku (v dimethylsulfoxidu, DMSO). Následně z nich byl vymyt jejich potopením do čisté vody na 12 minut. Poté byly snímány opět buňky kortexu poblíž prvního postranního kořene. Během těchto experimentů byla průběžně prováděna kontrolní pozorování (bez vymytí, stále v latrunculinu), aby se potvrdilo zastavení proudění.

Latrunculin

Houba *Latrunculia magnifica* (*latrunculus*, lupič), žijící v Rudém moři, se účinně brání poškození nebo požeru ze strany ryb. Je totiž schopna vylučovat smrtící načervenalou kapalinu; jedná se o směs tří chemicky podobných látek heterocyklické povahy, obsahujících thiazolidinový kruh: latrunculin A, B a C [Kashman & kol. 1980].

Příčinou toxicity latrunculinů je jejich destrukční vliv na aktinový cytoskelet, a to už v submikromolárních koncentracích [Spector & kol. 1983]. Tvoří totiž komplex 1:1 s monomery aktinu, a tím brání jeho polymeraci [Coué & kol. 1987]. Pro živočichy může být expozice jedu – např. kvůli inhibici cholinesterasy – fatální [Nèeman & kol. 1975], u rostlin je do značné míry vratná: Sice se zastaví cytoplasmatické proudění, ale po vymytí lat se toto opět ustavuje.

4.6.1.2. Proudění cytoplasmy v hypokotylech

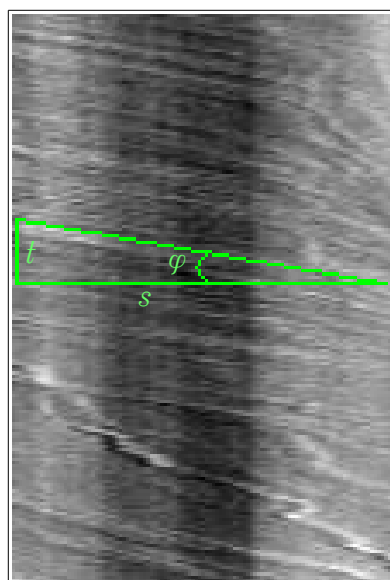
Petriho misky s vysetými semeny (*wt*, *arp2*, *arpc5*, *fh1-1*, *fh1-1/arpc5* a *xi-k/xi-1/xi-2*) byly po 24 hodinách kultivace na světle zabaleny na zbylých pět dní do neprůsvitného papíru. Cyklosa se u těchto etiolovaných semenáčků sledovala ve spodní části hypokotyly (většinou ve druhé buňce od jeho base), a to jednak bezprostředně po vytvoření preparátu (tři minuty po vynětí plotny z temnostní kapsy), jednak po dalších pěti minutách. Časem však bylo od snahy o okamžité pozorování upuštěno, protože jeho výsledky se od těch, které poskytlo snímání po delší prodlevě (jež navíc umožnila pečlivější zaostření), téměř nelišily.

Pro zajímavost byl proveden též pokus s neetiolovanými, na světle pěstovanými rostlinami (wt, *fh1-1* a *fh1-1/arpc5*) – ke sledování toku cytoplasmy byly v tom případě použity buňky ze spodní třetiny zelených hypokotylů.

4.6.2. MĚŘENÍ RYCHLOSTI PROUDĚNÍ

Rychlost pohybu částic v cytoplasmě byla pro porovnání stanovena dvěma způsoby:

a) Vybraná partikule byla pomocí zaměřovacího kříže v programu NIS Elements označena na každém snímku videa a poté byl soubor s jejími souřadnicemi na všech fotografiích převeden do programu LibreOffice Calc. Zde došlo k výpočtu vzdáleností uražených mezi jednotlivými expozicemi; vztahením délky těchto dílčích úseků k času přechodu snímků a následným zprůměrováním takto obdržených rychlostí byl získán konečný výsledek, tedy průměrná rychlost dané částice za celou dobu jejího pohybu. Bylo hodnoceno několik částic.



Obr. 5: kymogram s vyznačeným úhlem (φ), časem (t) a dráhou (s)

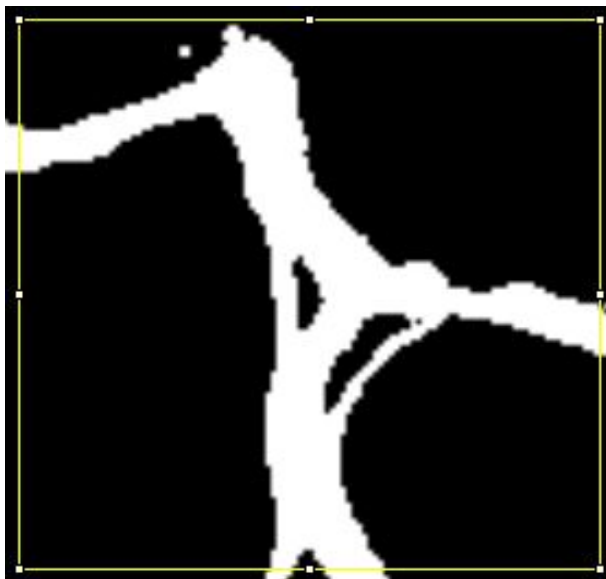
b) Videá byla převedena do programu ImageJ. V oblastech cytoplasmy vykazujících rychlé směrované proudění byly nataženy měřicí úsečky a pomocí přídatné funkce byly vytvořeny kymogramy ($\kappa\upsilon\mu\alpha$, vlna + $\rho\epsilon\acute{\alpha}\mu\mu\alpha$, písmeno nebo dopis). Z těchto byly úhly (viz obrázek 5) všech smysluplných čar, stanovené úhloměrnou polopřímku, zaznamenány do programu LibreOffice Calc. Zde byly posléze provedeny výpočty: Směr linií na kymogramu představuje rychlost pohybu; platí přímá úměra $\cotg \varphi \sim v$. Pro hodnoty průměrů všech $\cotg \varphi$ pro jednotlivé varianty experimentů, přepočítané na rychlost, byly sestrojeny sloupcové grafy.

4.7. ANALYSA VAKUOLÁRNÍHO SYSTÉMU

4.7.1. BARVENÍ A MIKROSKOPIE

Rostliny (wt, *arp2* a *arp5*) různého stáří byly přes noc ponořeny do 4 μ M roztoku lipofilního barviva FM4-64 (jenž byl připraven z 20mM zásobního roztoku v DMSO) a pozorovány objektivem 63 \times s vodní imersí na konfokálním mikroskopu Leica TCS SP2 při excitaci vlnovou délkou 514 nm. Byly zachyceny snímky svrchní pokožky děložních lístků, a to vždy v několika optických rovinách. Část obrázků byla pořízena na mikroskopu Zeiss LSM 5 Duo.

4.7.2. ZPRACOVÁNÍ A HODNOCENÍ OBRÁZKŮ



Fotografie byly upravovány v programu ImageJ: Z vhodného snímku (ve střední rovině listové pokožky, kde se relativní obsah vakuol v buňkách jeví nejvyšším) byla v místě ostrého obrazu vybrána na styku tří buněk čtvercová oblast (cca 600 μ m²). Po event. úpravě kontrastu a následném použití funkce pro vyhlazení čar byl výběr převeden do binární, černobílé podoby (obrázek 6), aby vynikly obarvené plasmatické a vakuolární membrány.

Obr. 6: příklad binárního zobrazení obarvených membrán a čtvercového výběru v programu ImageJ

Následně se změřila plocha zaujímaná centrálními vakuolami a vztáhla k celkové velikosti výběrového okna. Hodnoceno bylo vždy několik míst na každém souboru snímků. Výsledky byly vyneseny sloupcovými grafy.

4.8. MIKROSKOPIE ROSTLIN TRANSFORMOVANÝCH ČIDLEM pH

Děložní lístky 6denních semenáčků byly po dvou dnech v kokultivačním roztoku (podkapitola 4.4.2) pozorovány mikroskopem Zeiss LSM 5 Duo s cílem pořídit snímky, z nichž by se dalo usuzovat na hodnotu pH v cytoplasmě nebo apoplastu rostlin wt, *arp2* a *arp5*.

Sensor pHusion sestává z EGFP spojeného s mRFP; byla proto zvolena excitace vlnovými délkami 488 nm a 558 nm, fotografie buněk svrchní pokožky listů byly pořízeny v zeleném a červeném kanále. Bohužel, kvůli nízké úspěšnosti transientní transformace a nedostatku zkušeností s vícekanálovým snímáním se nepodařilo zachytit téměř žádné hodnotitelné obrázky; problematice se dále věnoval Jan Martinek a provedl úspěšnější, klasickou stabilní transformaci wt rostlin i vybraných Arp2/3-mutantů.

5. VÝSLEDKY

Výsledky všech tří hlavních částí práce jsou shrnuty grafy. Má-li smysl hodnotit výsledky statisticky, je na to v popisu grafu upozorněno; významné rozdíly jsou označeny hvězdičkami – dvěma pro $p < 0,01$ a jednou pro $p \in \langle 0,01; 0,05 \rangle$ – a je pro ně uvedena hodnota p : buď přímo v grafu (t -test), nebo v tabulce (Anova). Rozptylové úsečky vždy představují standardní chybu průměru (SEM). Většinou se rovněž vztahují k průměru ze všech měření (tzn. pro pohyb diktyosomů k průměru všech dílčích rychlostí ze všech experimentů, pro cytoplasmatické proudění k průměru rychlostí všech částic ze všech pozorování a pro plochu vakuol k průměru ze všech hodnocených buněk všech rostlin).

Jedinými výjimkami jsou grafy 9 a 10; zde SEM = chyba průměru průměrů jednotlivých experimentů, neboť pro graf 9 by jiný výnos ani nebyl možný a na grafu 10 by úsečky pro SEM celého souboru dat byly kvůli počtu dílčích rychlostí nezobrazitelně malé.

5.1. POHYBLIVOST GOLGIHO APARÁTU

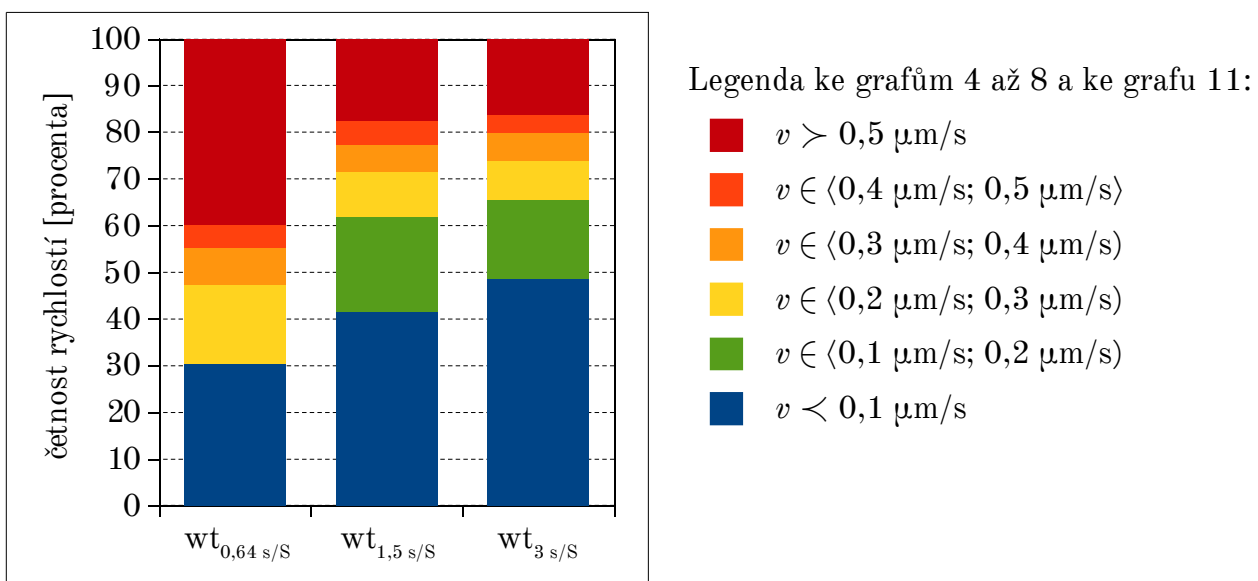
Pohyb diktyosomů v pokožkových buňkách děložních listů je přímo znázorněn spojnicovými a souřadnicovými grafy (kapitola 9, grafy 34 až 43), rozložení dílčích rychlostí částic ukazují grafy uvedené zde. Kromě nich jsou tu shrnuty údaje o průměrných rychlostech.

5.1.1. VÝBĚR DIKTYOSOMŮ RÁMEČKEM

5.1.1.1. Grafy rozložení rychlostí

Výška obdélníků různých barev ve sloupcích grafů 4 až 8, 11 a 12 značí poměrné zastoupení dílčích rychlostí z příslušných intervalů. Nezávislé experimenty jsou očíslovány.

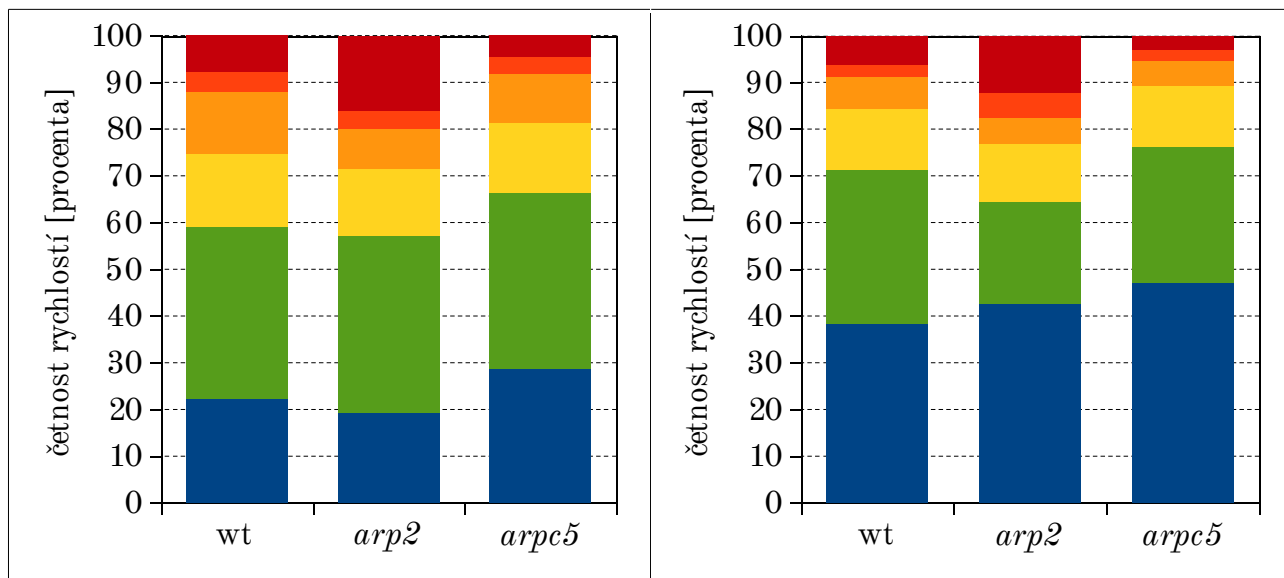
Experiment 1 (90s záznam, frekvence 0,64 s/S, výběr 32 částic v jedné buňce)



Graf 4: rozložení rychlostí diktyosomů (vlevo 1 snímek za 0,64 s, uprostřed přepočteno na 1 snímek za 1,5 s, vpravo na 1 snímek za 3 s)

Je vidět, že v prvním sloupci grafu 4 nemají rychlosti z intervalu $\langle 0,1 \mu\text{m/s}; 0,2 \mu\text{m/s} \rangle$ vůbec žádné zastoupení a naopak podíl nejvyšších rychlostí je oproti dalším sloupcům výrazně vyšší. Jedná se o přirozený důsledek příliš vysoké frekvence snímání (a příliš nízkého rozlišení obrázků); bude rozebráno v podkapitole 6.1.2. Mezi druhým a třetím sloupcem již zdaleka takový rozdíl nenastal. Při dalších experimentech již frekvence 1 snímek za 0,64 s nebyla používána:

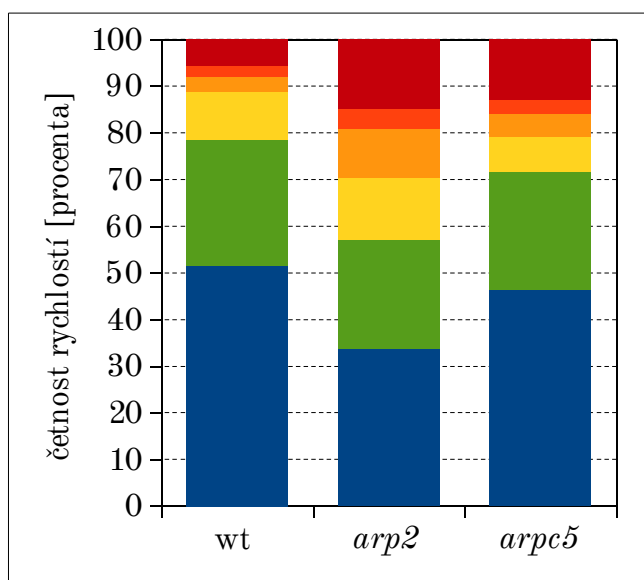
Experiment 2 (60s záznam, frekvence 1,5 s/S, výběr 42, 45 a 39 částic v jedné buňce)



Grafy 5 a 6: rozložení rychlostí diktyosomů (vlevo snímek za 1,5 s, vpravo přepočteno na snímek za 3 s)

Zastoupení nejnižších rychlostí vzrostlo mezi grafy 5 a 6 (tzn. s prodlužujícím se snímkovým intervalem) podobně jako v případě prvního experimentu.

Experiment 3 (60s záznam, frekvence 3 s/S, výběr 38, 39 a 42 částic v jedné buňce)

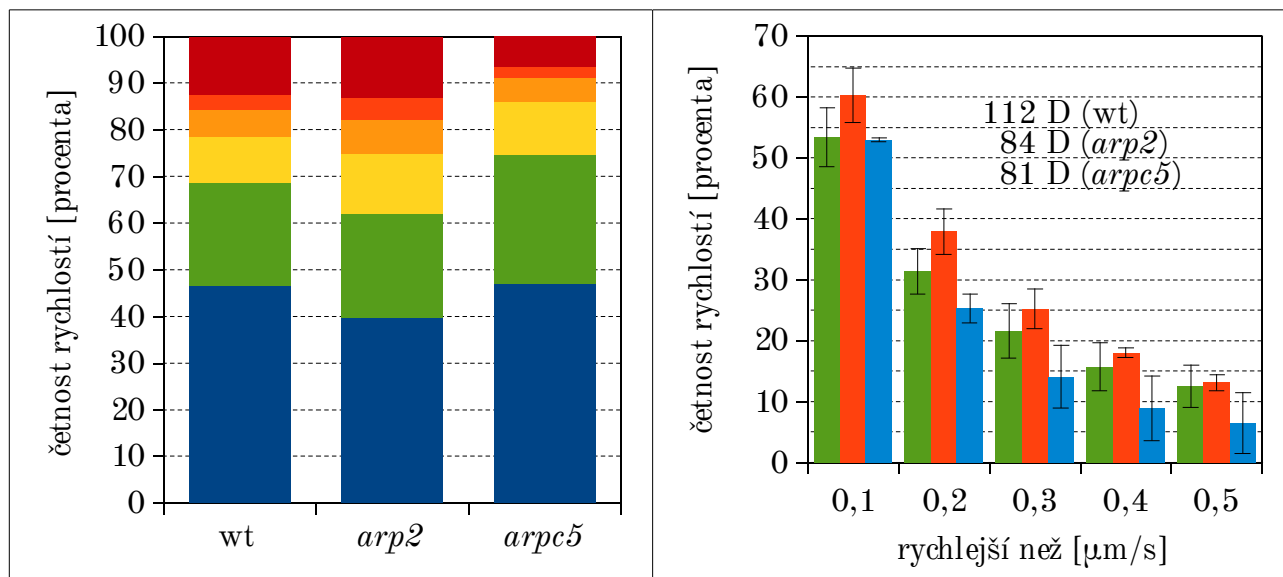


Z údajů o snímací frekvenci záznamů, pořízených během nezávislých experimentů, plyne, že vzájemně ekvivalentní jsou jednak třetí sloupec grafu 4 s celým grafem 6 a celým grafem 7 (všechno 3 s/S), jednak druhý sloupec grafu 4 s celým grafem 5 (1,5 s/S).

Graf 7: rozložení rychlostí diktyosomů (1 snímek za 3 s)

Průměry rozložení (vše přepočteno na 3 s/S)

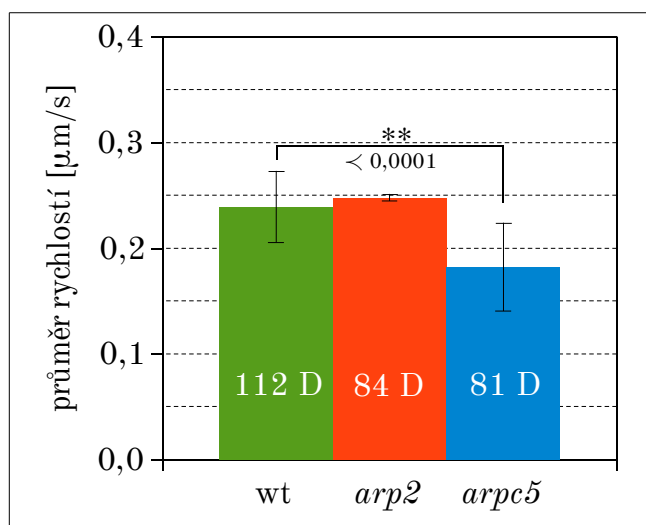
Průměry výsledků experimentů (1), 2 a 3 ukazují grafy 8 a 9. Graf 8 představuje výnos průměrů všech dat ze všech experimentů, a to stejným grafickým způsobem jako grafy 4 až 7. Na grafu 9 je vidět poměrné zastoupení rychlostí diktyosomů vyšších než zvolené hraniční hodnoty – jedná se tedy o podobné vyjádření jako na grafech 4 až 8, pouze jinak zobrazené, aby bylo možno snadněji porovnat výsledky pro wt, *arp2* a *arpc5* a také stanovit SEM.



Grafy 8 a 9: vlevo průměrné rozložení rychlostí diktyosomů, vpravo četnost rychlostí vyšších než daná hodnota (wt ■: průměr dat z experimentů 1, 2 a 3; *arp2* ■ a *arpc5* ■: průměr dat z experimentů 2 a 3); D = diktyosom

Empiricky bylo stanoveno, že rychlost $< 0,2 \mu\text{m/s}$ lze ve většině případů pokládat za klid. Druhou trojici sloupců v grafu 9 je tedy možno chápat jako procentuální zastoupení času, který diktyosomy v průměru stráví zjevným pohybem.

5.1.1.2. Průměrné rychlosti (3 s/S)



Graf 10: průměrné rychlosti diktyosomů (wt: průměr dat z experimentů 1, 2 a 3; *arp2* a *arpc5*: průměr dat z exp. 2 a 3); statistické hodnocení - *t*-test proti wt; D = diktyosom

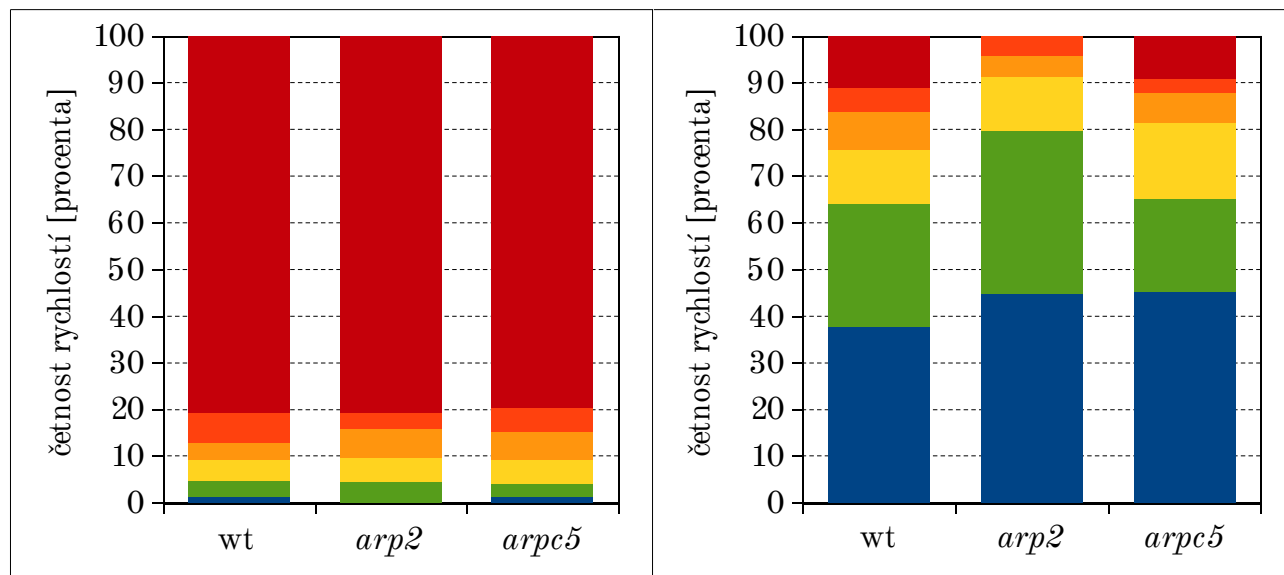
Prostá průměrná rychlost částic ze všech přechodů snímků při všech experimentech je zachycena grafem 10, který zahrnuje též statistické vyhodnocení.

5.1.2. VÝBĚR SKÁKAVÝCH DIKTYOSOMŮ

5.1.2.1. Grafy rozložení rychlostí

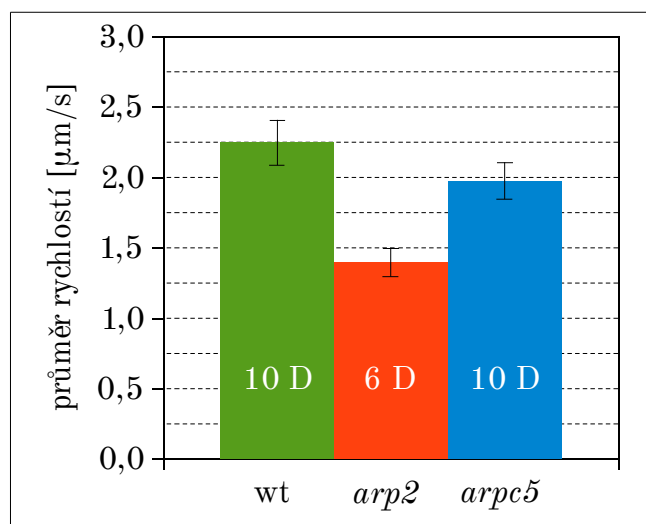
Graf 11 zobrazuje tentýž výnos zastoupení rychlostí jako grafy v podkapitole 5.1.1.1.; jak vidno, tato volba intervalů pro něj není příliš vhodná. Proto je zde uveden také graf 12, kde mají intervaly desetinásobnou velikost (po 1 $\mu\text{m/s}$):

Výběr 10, 6 a 10 částic z experimentů 2 a 3 (3 s/S)



Grafy 11 a 12: rozložení rychlostí diktyosomů (1 snímek za 3 s, případně přepočteno na tento parametr); vlevo graf se stejným barevným značením jako v podkapitole 5.1.1.1, vpravo byly intervaly 10× zvětšeny: $v < 1 \mu\text{m/s}$, $v \in (1 \mu\text{m/s}; 2 \mu\text{m/s})$, $(2 \mu\text{m/s}; 3 \mu\text{m/s})$, $(3 \mu\text{m/s}; 4 \mu\text{m/s})$, $(4 \mu\text{m/s}; 5 \mu\text{m/s})$ a $v > 5 \mu\text{m/s}$ (výběr z experimentů 2 a 3)

5.1.2.2. Průměrné rychlosti (3 s/S)



Graf 13: průměrné rychlosti skákavých diktyosomů (výběr z experimentů 2 a 3); D = diktyosom

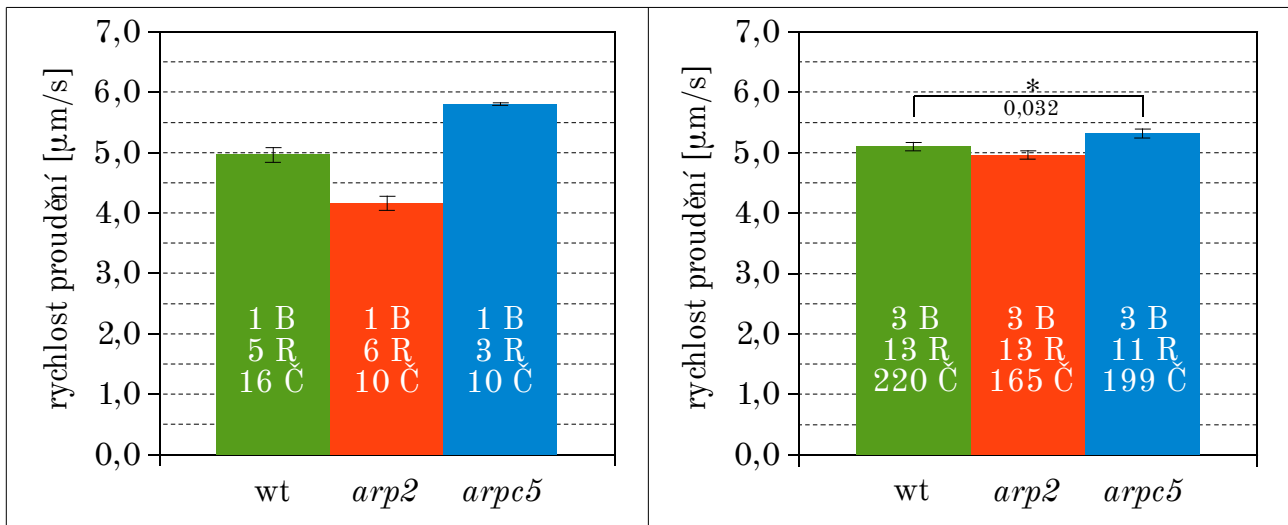
Graf 13 opět znázorňuje průměrné rychlosti částic při všech přechodech snímků; zde pro výběr skákavých diktyosomů, k nimž se vztahují grafy 11 a 12. Statistické hodnocení zde kvůli způsobu výběru částic (a malému množství dat) nemá smysl.

5.2. CYTOPLASMATICKÉ PROUDĚNÍ

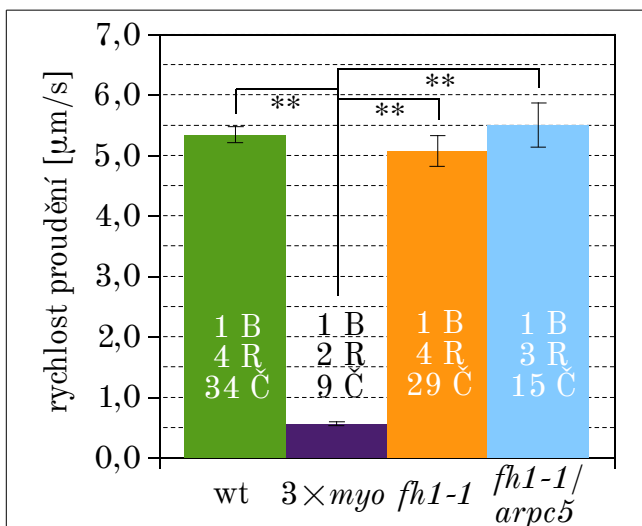
Rychlost toku cytoplasmy ukazují grafy 14 až 21. Graf 14 je jediným, pro nějž byly hodnoty získány ručním sledováním částic pomocí zaměřovacího kříže, a zároveň jediným, pro nějž – vzhledem k malému množství dat – nebyla zpracována statistika. Všechny ostatní znázorňují výsledky měření kymogramy a jejich zdrojová data byla statisticky testována.

5.2.1. KOŘENY

Grafy 14 a 18 zobrazují rychlost cytoplasmatického proudění v buňkách primární kůry kořene. Zatímco v případě grafů 14 až 16 se jedná o výsledky změřené na nijak neošetřených rostlinách, grafy 17 a 18 se týkají rostlin, z nichž byl po celonočním působení vymyt latB.



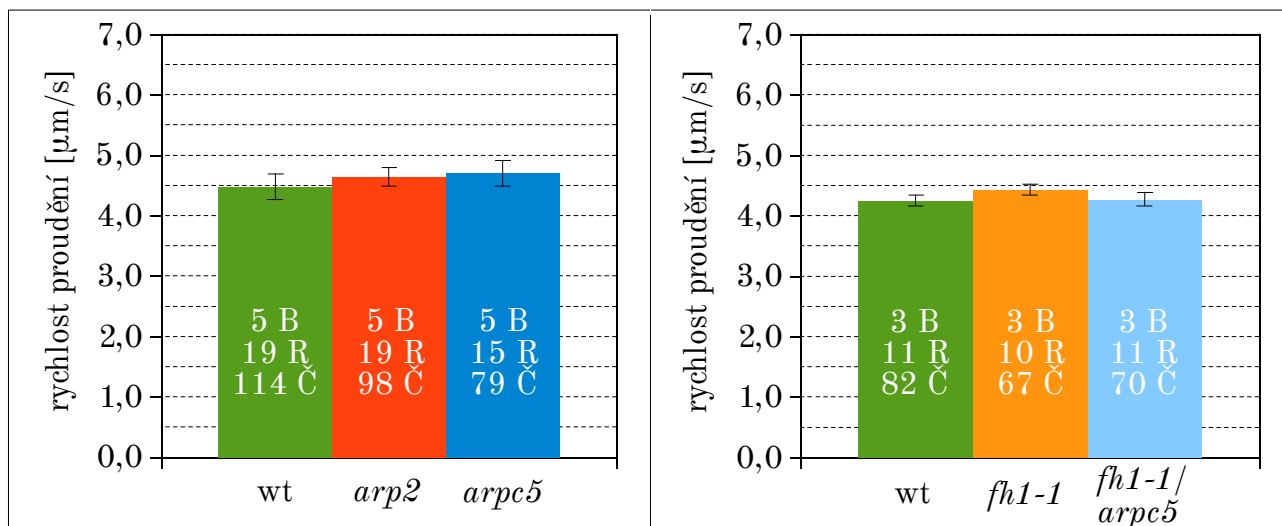
Grafy 14 a 15: rychlost proudění v kořenech (vlevo sledování částic zaměřovacím křížem v programu NIS Elements, vpravo pomocí kymogramů v Image); statistické hodnocení (graf 15) – t-test proti wt; B = počet biologických opakování, R = rostlina a Č = částice



Mutant *xi-k/xi-1/xi-2* vykazoval podle očekávání řádově pomalejší proudění cytoplasmy než ostatní rostliny.

hodnota p	wt	3xmyo	fh1-1	fh1-1/arpc5
wt	—	< 0,001	0,694	0,900
3xmyo	< 0,001	—	< 0,001	< 0,001
fh1-1	0,694	< 0,001	—	0,540
fh1-1/arpc5	0,900	< 0,001	0,540	—

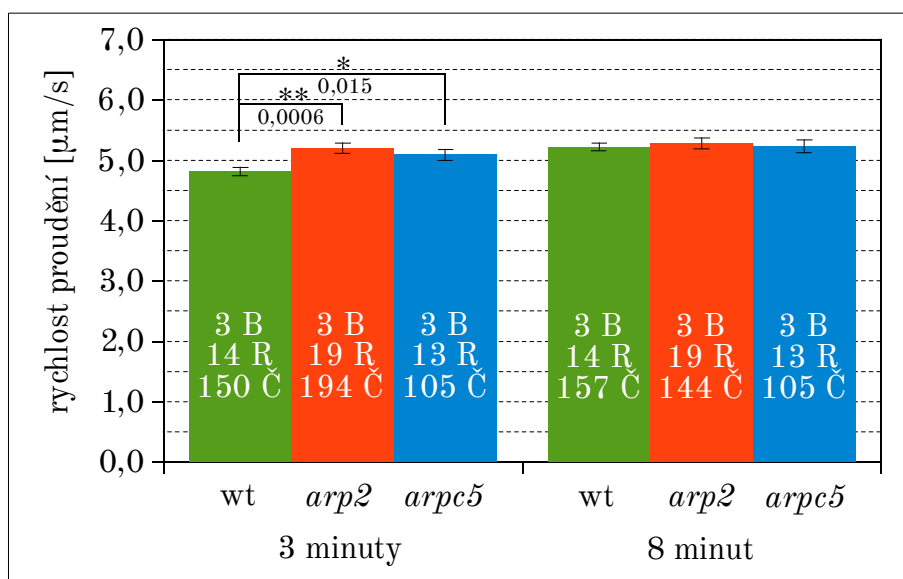
Graf 16: rychlost proudění v kořenech (3xmyo = mutant *xi-k/xi-1/xi-2*); statistické hodnocení – Anova; B = počet opakování, R = rostlina a Č = částice



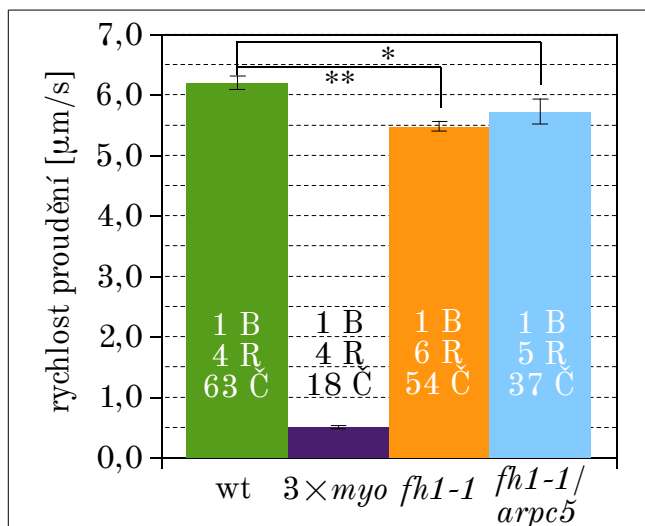
Grafy 17 a 18: rychlost obnoveného proudění v kořenech po vymytí latB; statistické hodnocení - *t*-test proti wt (vlevo), Anova (vpravo); B = počet opakování, R = rostlina a Č = částice

5.2.2. ETIOLOVANÉ HYPOKOTYLY

Grafy 19 a 20 znázorňují rychlost cytoplasmatického proudění v buňkách etiolovaných hypokotylů. Graf 19 ukazuje jednak rychlost změřenou na videích, která byla – po vytvoření preparátů z rostlin pěstovaných ve tmě – pořízena bezprostředně, jednak rychlost, kterou buňky vykazovaly po dalších 5 minutách.



Graf 19: rychlost proudění v etiolovaných hypokotylech (vlevo po 3 minutách od vynětí z temnostní kapsy, vpravo po dalších 5 minutách pod zhasnutým mikroskopem); statistické hodnocení - *t*-test proti wt pro levou a pravou trojici hodnot; B = počet opakování, R = rostlina a Č = částice

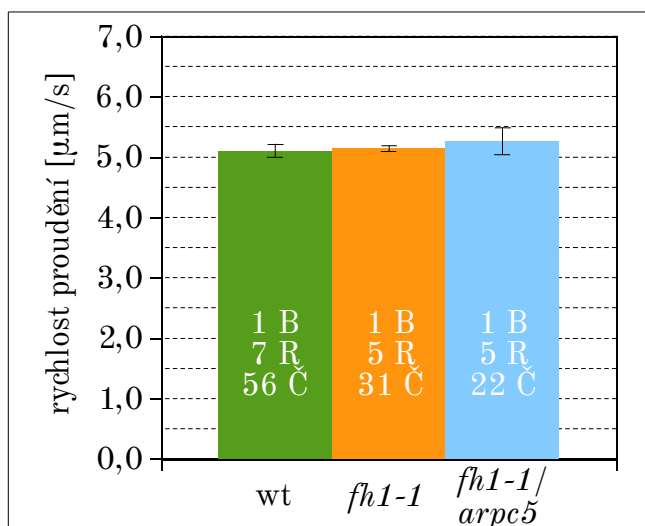


Graf 20 vyjadřuje rychlost proudění cytoplasmy po cca 8 minutách od osvětlení rostlin kultivovaných ve tmě.

hodnota p	wt	3xmyo	fh1-1	fh1-1/arc5
wt	—	< 0,001	< 0,001	0,038
3xmyo	< 0,001	—	< 0,001	< 0,001
fh1-1	< 0,001	< 0,001	—	0,552
fh1-1/arc5	0,038	< 0,001	0,552	—

Graf 20: rychlost proudění v etiolovaných hypokotylech (3xmyo = mutant *xi-k/xi-1/xi-2*); statistické hodnocení - Anova (v zájmu přehlednosti není hvězdičkami označen extrémní rozdíl mezi myosinovým mutantem, negativní kontrolou, a všemi ostatními); B = počet opakování, R = rostlina a Č = částice

5.2.3. ZELENÉ HYPOKOTYLY

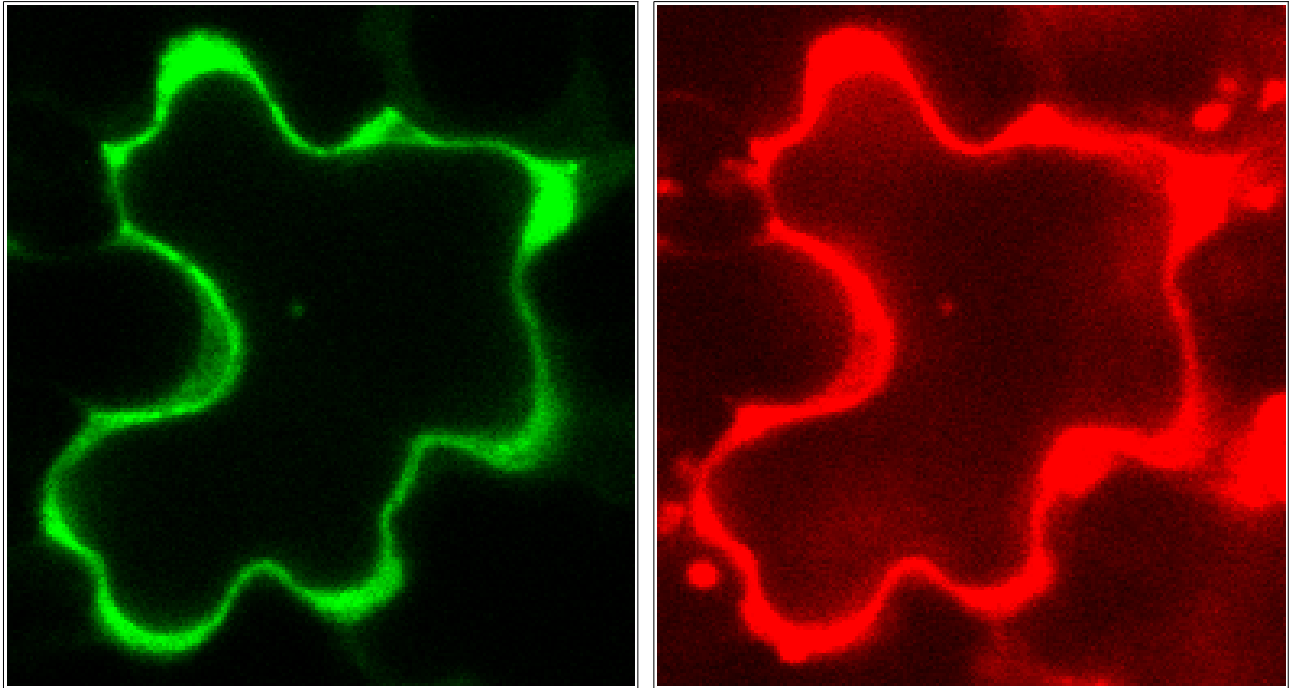


Rychlost proudění v buňkách zelených, neetiolovalých hypokotylů uvádí graf 21.

Graf 21: rychlost proudění v neetiolovalých hypokotylech; statistické hodnocení - Anova; B = počet opakování, R = rostlina a Č = částice

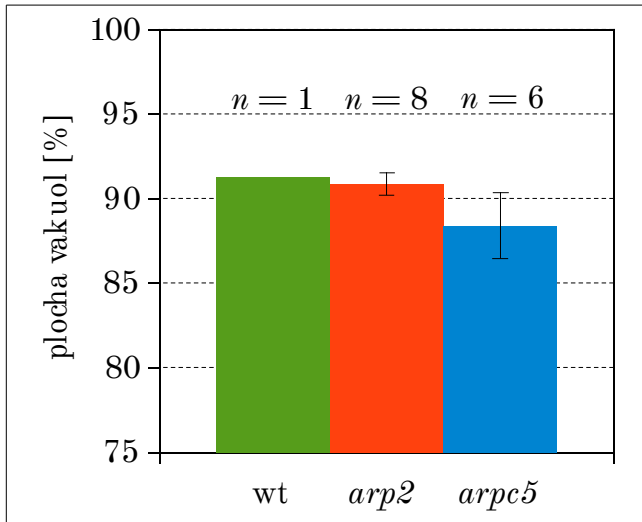
5.3. ROZLOŽENÍ pH V BUŇCE

Obrázky 7 a 8 byly pořízeny pomocí konfokálního mikroskopu; jedná se opět o pokožkové buňky děložních listů, tentokrát 6denních rostlin transientně transformovaných genem pro pHusion, čidlo pH. Zachycují signál dvou fluorescenčních kanálů – v zeleném svítí molekula EGFP, v červeném protein mRFP (fotografie nebyly nijak upravovány). Ačkoli jde o jedny z mála solidních snímků, které se podařilo získat, je patrná přexponovanost červeného kanálu, znemožňující hodnocení fluorescenční intensity.



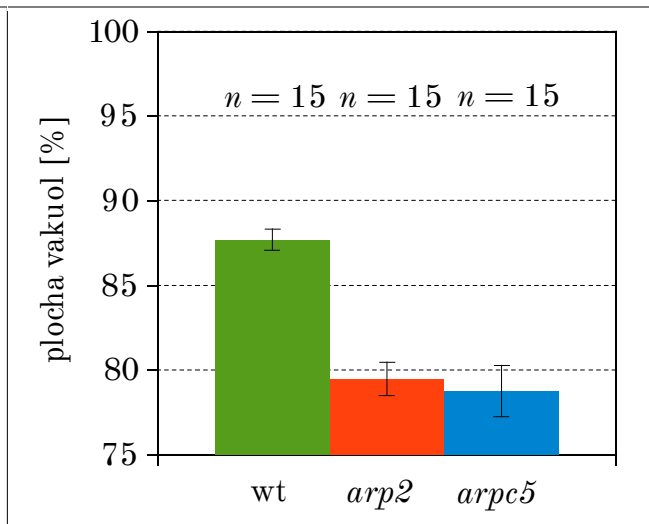
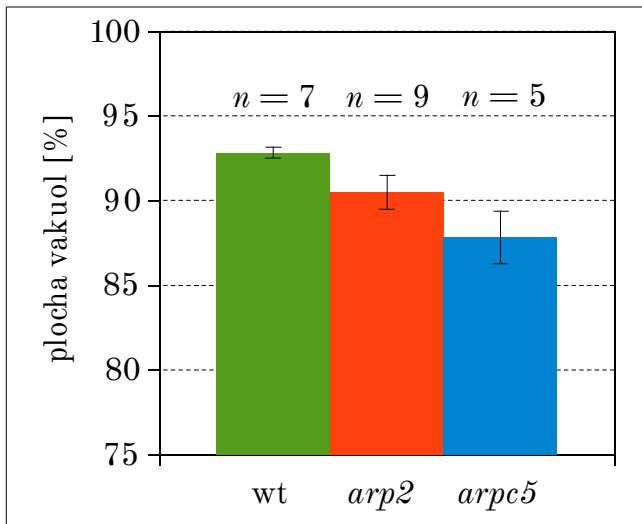
Obr. 7 a 8: pokožková buňka wt exprimující EGFP (zelený kanál) a mRFP (červený kanál); zvětšení 63x

5.4. VAKUOLÁRNÍ SYSTÉM

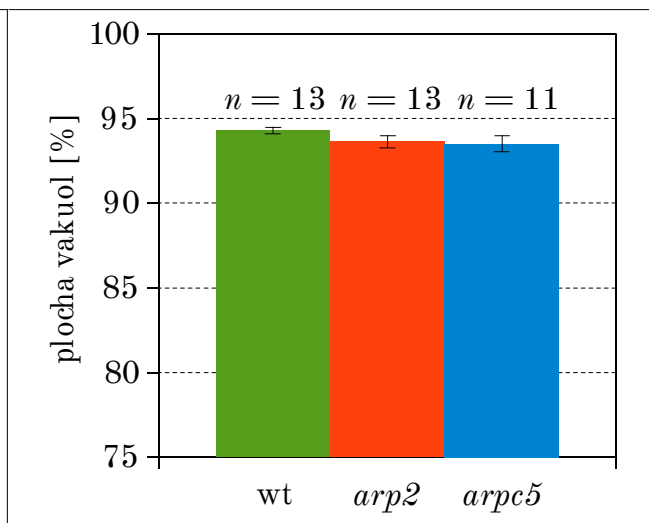
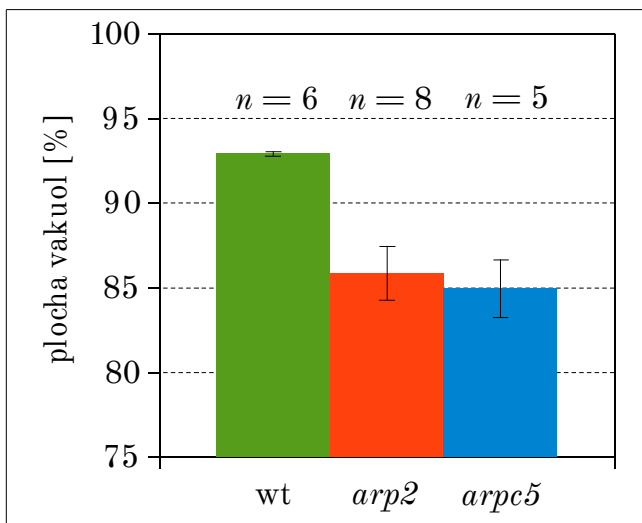


Graf 22: obsah vakuol na řezu (4denní rostliny)

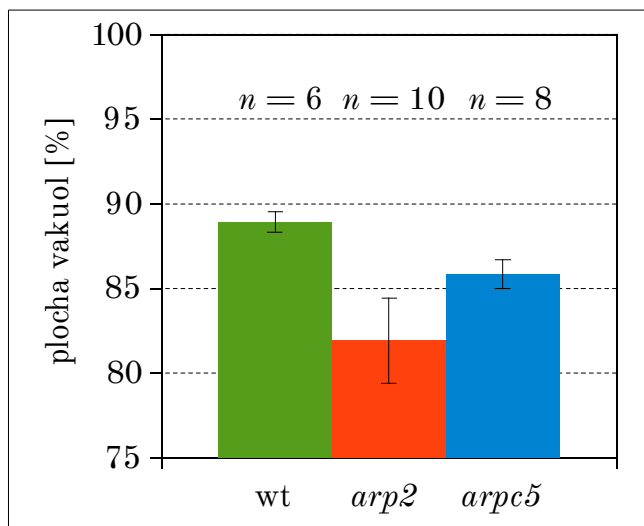
Grafy 22 až 33 zobrazují poměrnou plochu centrálních vakuol v měřicích rámečcích na optických řezech pokožkovými buňkami děložních listů 4- až 14denních rostlin. Každý graf představuje nezávislý pokus s několika rostlinami. Písmenem *n* je označen celkový počet měření; statisticky byl hodnocen pouze souhrnný graf 33.



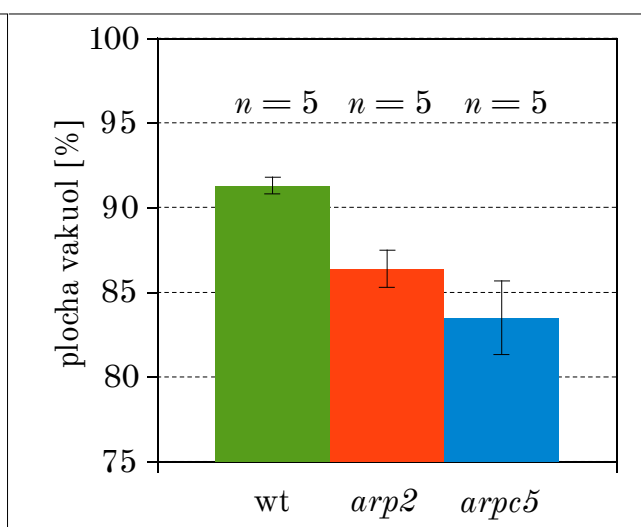
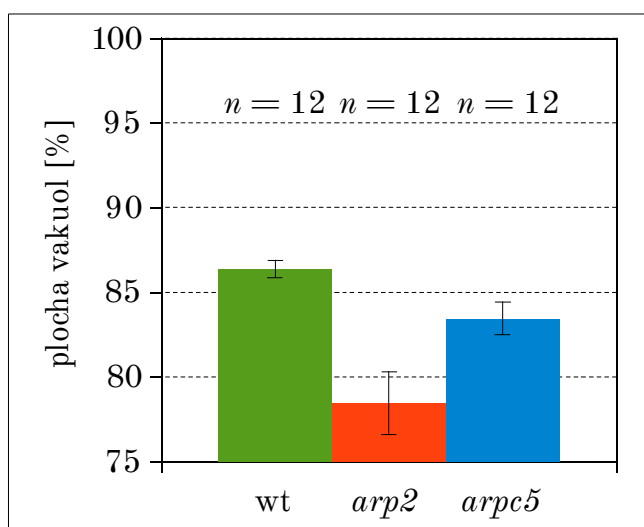
Grafy 23 a 24: obsah vakuol na řezu (5denní rostliny)



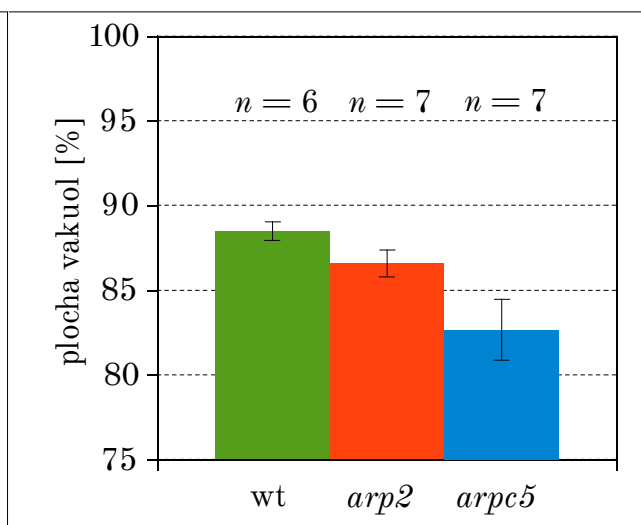
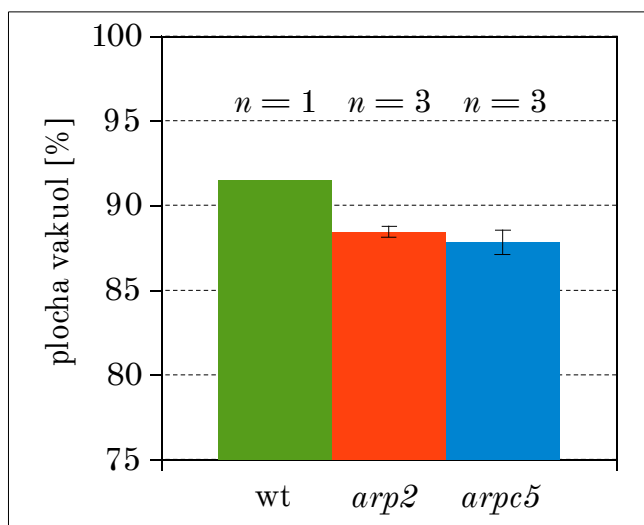
Grafy 25 a 26: obsah vakuol na řezu (6denní rostliny vlevo, 7denní vpravo)



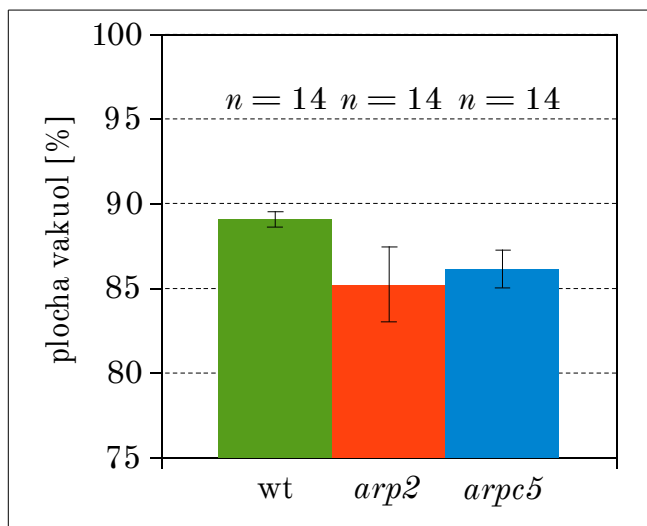
Graf 27: obsah vakuol na řezu (8denní rostliny)



Grafy 28 a 29: obsah vakuol na řezu (9denní rostliny)



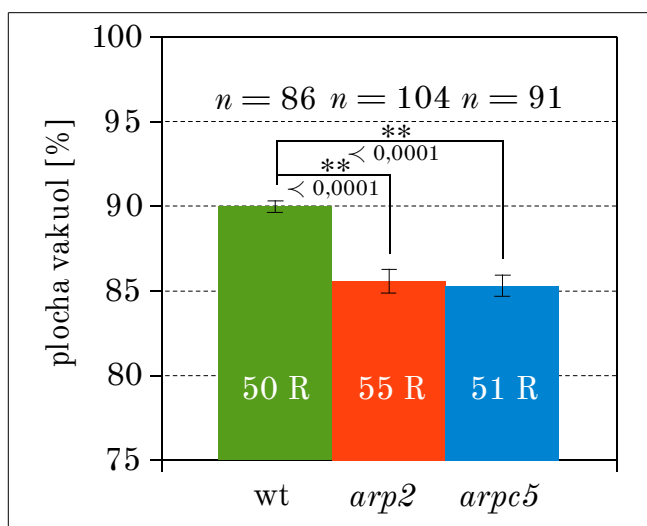
Grafy 30 a 31: obsah vakuol na řezu (10denní rostliny vlevo, 11denní vpravo)



Graf 32: obsah vakuol na řezu (14denní rostliny)

Objemový podíl zaujímaný v buňkách hlavními vakuolami lze na základě znalosti poměrů v optických řezech odhadnout: Necht obsah vakuol tvoří např. 90 % plochy snímku; prostorově pak budou zaujímat přibližně $0,9^{3/2} = 0,854$, čili asi 85 % objemu buněk. Samozřejmě se jedná pouze o hrubé přiblížení, neboť vychází z předpokladu isotropie (a ten u pokožkových buněk ani zdaleka není splněn), a pro výsledky uvedené v této práci je kvůli způsobu, jakým bylo měření prováděno, ani nelze patřičně použít: Grafy se vztahují k měřicím čtvercům, nikoli buňkám.

Průměrný obsah vakuol

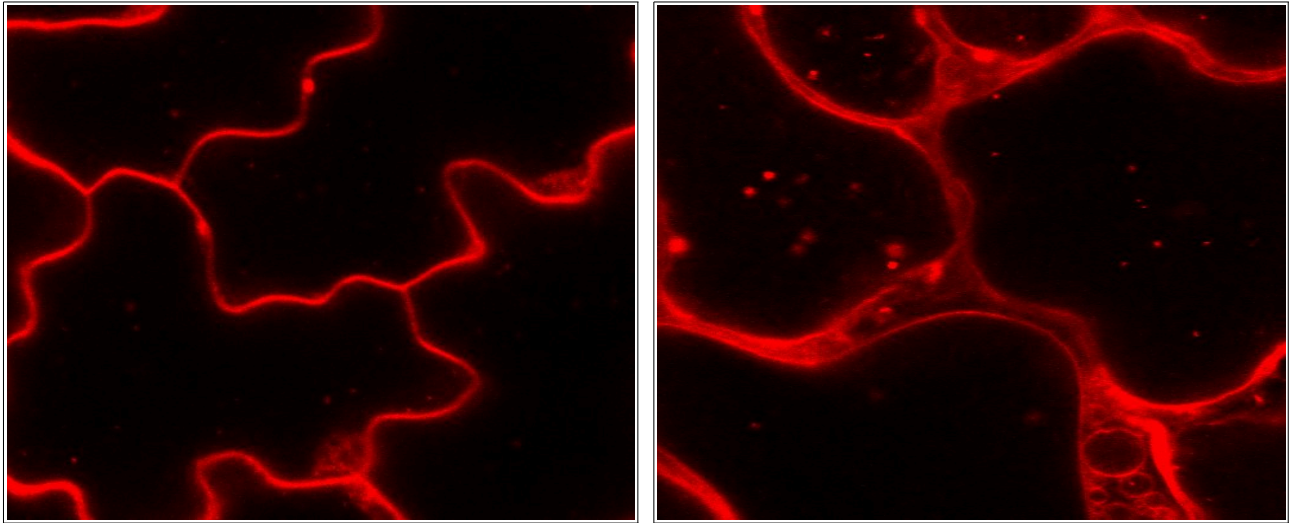


Graf 33: obsah vakuol na řezu (průměr ze všech změřených buněk všech hodnocených 4- až 14denních rostlin); statistické hodnocení - t-test proti wt; R = rostlina

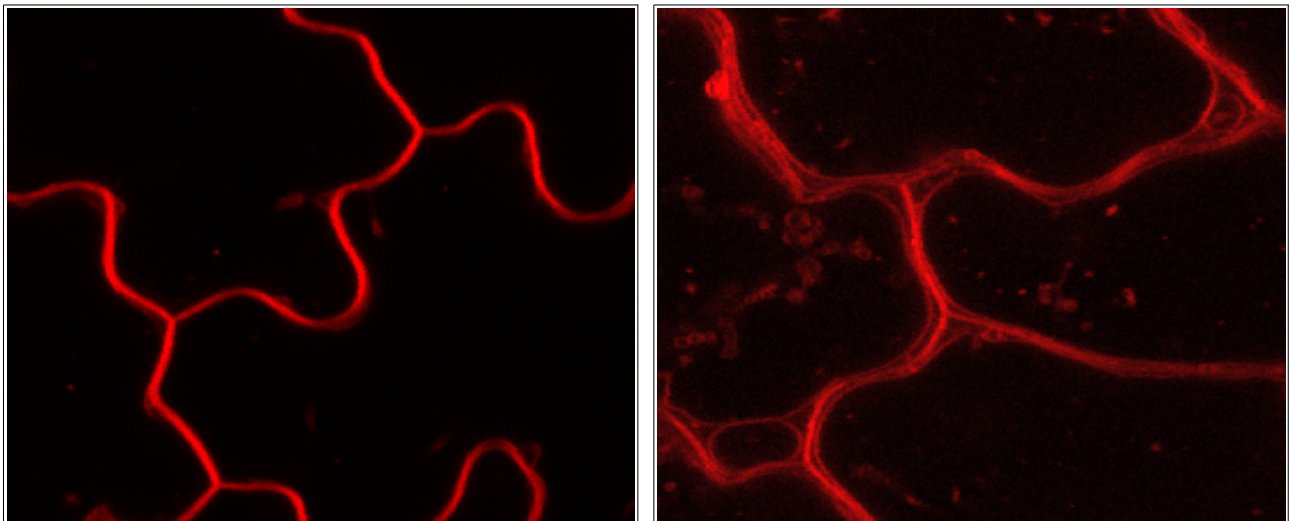
Vakuolárním systémem pokožkových buněk děložních listů 14denních rostlin se ve své diplomové práci zabývala také Petra Schiebertová (2013).

Graf 33 vznikl zprůměrováním výsledků zobrazených grafy 22 až 32. Jedná se tedy o průměr ze všech hodnocených snímků všech rostlin.

Stručnou fotodokumentaci optických řezů, na nichž je rozdíl ve struktuře vakuomu buněk svrchní pokožky děložních listů mezi rostlinami wt a mutanty *arp2* a *arpc5* jasně patrný, nabízejí mikrofotografie z konfokálního mikroskopu (obrázky 9 až 12).



Obr. 9 a 10: pokožkové buňky děložního listu wt (vlevo) a mutanta *arp2* (vpravo) barvené FM4-64; zvětšení 63x



Obr 11 a 12: pokožkové buňky děložního listu wt (vlevo) a mutanta *arpc5* (vpravo) barvené FM4-64; zvětšení 63x

6. DISKUSE

6.1. POHYBLIVOST GOLGIHO APARÁTU

6.1.1. VOLBA ROSTLINNÉHO MATERIÁLU A VÝBĚR DIKTYOSOMŮ

Při hodnocení motility Golgiho aparátu nastávají potíže se zajištěním nevychýlenosti výběru jeho váčků k pohybové analýze. Samotná volba kortikální vrstvy pokožkových buněk děložních listů obecnost výzkumu omezuje, nicméně např. protáhlé buňky kořene nebo hypokotylu by se použít nedaly, neb tyto vykazují značně směrované cytoplasmatické proudění, které diktyosomy strhává, čímž pozorování jejich typických *stop-and-go* přeskoků znemožňuje. Stejně tak sledování hlubších oblastí buněk listu, kde se cisterny vyskytují především v transvakuolárních provazcích, by spíše sloužilo ke stanovení rychlosti proudění cytoplasmy (mimo to by takové studium bylo značně obtížné kvůli trojrozměrnosti pohybů; naproti tomu kortikální vrstva pokožkových buněk je poměrně plochá). Právě odlišit dva základní typy pohybů diktyosomů – a pokud možno příspěvek toku cytoplasmy při hodnocení co nejvíce eliminovat – bylo cílem této fáze výzkumu.

Stáří rostlin (6 dní) bylo zvoleno po dobrých zkušenostech s mikroskopií takto malých semenáčků (lístky jsou poddajné a pod krycím sklem se snadno vyrovnají, při práci s rostlinami nedochází k jejich nadměrnému poškozování).

6.1.1.1. Výběrový rámeček

Co se týče způsobu, jakým byly na videích vybírány konkrétní diktyosomy, po zvážení a vyzkoušení různých metod bylo v zájmu zachování maximální systematičnosti přistoupeno k rozboru motility všech váčků vybraných na prvním snímku rámečkem, a to během celé délky záznamu. I tento přístup ovšem naráží na obtížně splnitelný požadavek výběrové rovnoměrnosti – náhodné přiložení čtverce dané velikosti do okna videí by často mělo za následek, že v některých případech by byla hodnocena oblast kortikální vrstvy poblíž ústí cytoplasmatického provazce, kde je veškeré chování značně ovlivněno směrovaným prouděním, zatímco jindy by do vybraného výřezu žádný provazec nezasahoval, tudíž by v něm převažovaly diktyosomy se *stop-and-go* pohybem.

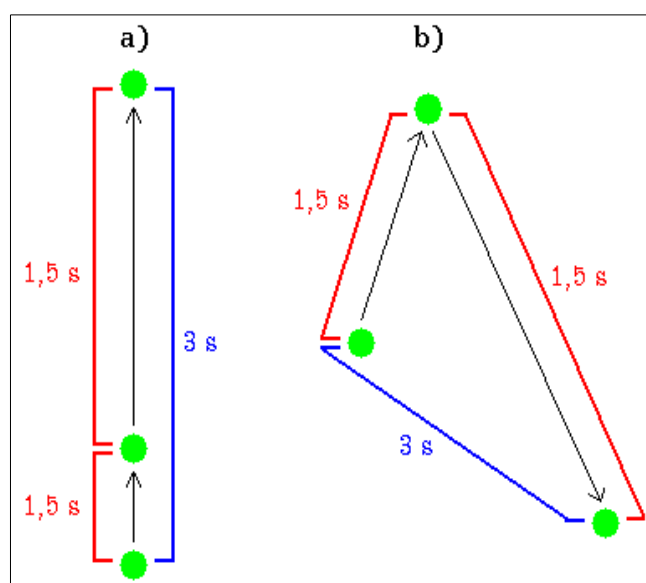
V této práci byl rámeček vždy vytyčen v místě, kde se narušení provazci jevílo minimálním. Pro značné rozdíly v plošné hustotě rozložení cisteren mezi jednotlivými záznamy nebyla velikost čtverce zvolena pevně, nýbrž tak, aby zahrnoval přibližně 40 váčků. Volba takového množství vychází z faktu, že se málokdy podařilo nasnímat video, na němž by se našel souvislý okrsek splňující uvedenou podmínku, který by obsahoval více diktyosomů. Úskalí této metody přirozeně také tkví v subjektivitě a výběr zatěžuje systematická chyba, avšak výsledky nezávislých experimentů by při tomto přístupu měly být porovnatelné.

6.1.1.2. Výběr skákavých váčků

Podobné krajně subjektivní metody se v literatuře zabývající se pohyby organel překvapivě často vyskytují. Zde byl tento přístup uveden pro ukázkou, jak výrazně se jeho výsledky liší od těch, které obdržíme při systematictějším výběru diktyosomů. Čímž sice není řečeno, že výše popsany postup s výběrovým rámečkem je optimální, avšak rozhodně lépe popisuje průměrné chování zkoumaných objektů, a ne jen jejich speciální subpopulaci.

6.1.2. SNÍMACÍ FREKVENCE

Při pořizování videí je třeba vhodně zvolit časový odstup mezi snímky, neboť kratší snímací interval zdánlivě zvýší jednak podíl zaznamenaných vyšších rychlostí, jednak rychlost průměrnou. To lze vysvětlit následujícími jevy (viz obrázek 13):



a) Při řídkším snímkování bude v množině změřených rychlostí částic pohybujících se zhruba přímočaře, ale nerovnoměrně, sníženo zastoupení extrémních hodnot - chvilková maxima a minima totiž někdy nebudou zaznamenána.

b) Nižší snímací frekvence často neodhalí skokové změny směru pohybu sledované partikule – mnoho získaných velikostí rychlostí bude příliš malých, skutečnosti fakticky neodpovídajících.

Obr. 13: interpretace dat o pohybu snímaném různou frekvencí vede k různým výsledkům

Optimální přesnost analýsy by teoreticky poskytlo snímání s co nejkratším intervalem; zde ovšem do výzkumu promlouvají technická omezení (nehledě na to, že časová náročnost zpracování dat by se limitně blížila nekonečnu): Rozlišení obrázků má své hranice, a při velmi vysoké frekvenci není mnohý pohybující se diktyosom tak rychlý, aby během kratičkého přechodu snímku překonal vzdálenost hrany jednoho pixelu, tudíž je jeho poloha při hodnocení často několik oken po sobě zaznamenána týmiž souřadnicemi. V okamžiku, kdy se dostane spíše do plochy sousedního pixelu, je jeho x-ová nebo y-ová souřadnice (případně obě) změněna o 1. To sice představuje nejnižší možnou detekovatelnou dráhu, ovšem po jejím přepočtení na dílčí rychlost vyjde nereálně vysoké číslo – ač se jedná o součet příspěvků dílčích trajektorií, ураžených během několika mezinímkových intervalů, je mu při analýse mylně přiřazen interval jeden (a to velmi krátký).

Tento efekt logicky příliš neovlivní průměrné rychlosti, zato jejich rozložení zcela zkreslí – zastoupení vyšších (a většinou i klidu) chybně vzrůstá na úkor nejnižších (ty často nejsou zaznamenány vůbec). Vzniku těchto zavádějících výsledků lze do jisté míry bránit dodatečným značným zvýšením rozlišení již existujících videí, avšak tím může nastat problém s neúnosně rostoucí velikostí souborů; obrovské datové objemy se (nejen) programem ImageJ obtížně načítají.

V této práci jsou představeny především výsledky rozboru videí o frekvencích 1 snímek za 1,5 s a 3 s. Při takových parametrech ještě potíže s nedostatečným rozlišením obrázků příliš nenastávají, a rozdíly mezi výstupy z hodnocení záznamů o různých frekvencích lze takřka výlučně přičíst jevům znázorněným na obrázku 13. Naproti tomu snímkování jednou za 0,64 s již k technickým problémům analýzy vede, a proto je vhodnější při hodnocení takto získaných dat jejich časové rozlišení snížit.

6.1.3. ZPRACOVÁNÍ ZÍSKANÝCH DAT

Ze spleťových souřadnicových (podkapitola 9.1.) nebo složitých spojnicových (podkapitola 9.2.) výnosů, zachycujících skákavý pohyb diktyosomů, lze jen s obtížemi usuzovat na nějaké rozdíly mezi wt rostlinami a mutanty. Naproti tomu grafy rozložení rychlostí (podkapitola 5.1.) představují přehlednější způsob, jak pohyblivost diktyosomů hodnotit.

Při porovnávání měření z různých experimentů je sice třeba věnovat pozornost snímací frekvenci (kvůli jevům popsaným v předchozí podkapitole), ale jejich výsledky lze snadno zrovnocnit, obzvláště pokud snímání probíhala frekvencemi celočíselně násobnými – v tom případě stačí při hodnocení videa s hustším snímkováním postupovat ob jednu (dvě, tři, ...) dvojici/e souřadnic.

V této práci byly použity záznamy o frekvencích 3 s/S, 1,5 s/S a 0,64 s/S: Při přepočtu dat s rozlišením 1,5 s/S na 3 s/S zjevně potíže nenastanou; horší situace panuje v případě frekvence 0,64 s/S – převod na 1,5 s/S byl řešen zprůměrováním výsledků výpočtů ob jednu (1,28 s/S) a ob dvě (1,92 s/S) dvojice souřadnic, což kýženému parametru 1,5 s/S úplně neodpovídá, a k transformaci na 3 s/S se dospělo výpočtem ob čtyři, což rovněž není zcela přesné. Nicméně chyba přepočtů činí jen asi desetinu jednotky s/S.

Ke stanovení hranice mezi klidem a pohybem bohužel neexistuje žádný obecně použitelný návod. Vzhledem k průměru diktyosomu (necelý 1 μm) je ovšem jakákoli změna polohy menší než cca 0,2 μm značně sporná (skutečné kmitání, jakož i velmi pomalý směřovaný pohyb se těžko odlišují od fluktuací fluorescence apod.), tudíž byly za mezní hodnotu zvoleny právě 0,2 μm .

6.1.4. VÝSLEDKY

Zhodnotit komplexní informace, které pohybová analýsa poskytla, je nesmírně problematické. Na první pohled vyniká jen propastný rozdíl mezi vyhodnocením chování nejpohyblivějších diktyosomů a výsledky, které se vztahují k váčkům vybraným rámečkem.

Průměrné rychlosti pro wt, *arp2* a *arpc5* lze sice porovnat snadno, ale vyvstává otázka, co takový údaj vlastně znamená a jaký má – vzhledem ke krajní neuspořádanosti chování diktyosomů – smysl. Např. Avisar & kol. sledovali úctyhodný počet částic v pokožkových buňkách tabáku a stanovili (při snímací frekvenci 1 expozice za 2 sekundy) průměrnou rychlost diktyosomů nemutovaných rostlin na cca 1,11 $\mu\text{m/s}$. Což je znatelně více, než bylo v této práci zjištěno při metodě výběrového rámečku (zhruba 0,24 $\mu\text{m/s}$), ale méně, než když byly subjektivně vybírány skákavé váčky (přibližně 2,25 $\mu\text{m/s}$). To však (odhlédneme-li od faktu, že používali jinou rostlinu) nepřekvapí, jelikož dotyčný tým si na snímcích záznamů, které pořídil, oblast pro analýsu nijak nevybíral – hodnotili totiž všechny diktyosomy v záběru. Z obdobných důvodů pak ovšem nelze snadno porovnávat s literaturou ani případné údaje o rozložení rychlostí.

Námi zvolená metoda měření pohyblivosti váčků neprokázala rozdíl mezi wt a mutanty. Jak bylo ukázáno, výběrový efekt je zde přes veškerou snahu extrémní, a případné skutečné odlišnosti jsou výchytkami způsobenými různým přiložením rámečku (nemluvě o jakémkoli čistě subjektivním přístupu) jistě převýšeny. Naměřené rozdíly – pokud nějaké – navíc nejsou velké (rozložení rychlostí se propastně neliší a ani při pohledu na souřadnicové grafy, jimiž je pohyb přímo znázorněn, nic zásadního nevyniká).

Celkově se dá zhodnotit, že sledujeme-li množinu diktyosomů v oblasti kortikální vrstvy buňky (kam neústí žádný patrný cytoplasmatický provazec), zachytíme během snímání cca 30 % dílčích rychlostí přesahujících 0,2 $\mu\text{m/s}$, zatímco zbytek budou tvořit periody (přibližného) klidu; pro rostliny wt i mutanty *arp2* a *arpc5* obdržíme srovnatelné výsledky.

6.1.5. POZNÁMKY K METODICE, ÚVAHY

Základním nedostatkem provedeného výzkumu je malé množství biologického materiálu (ve třech nezávislých experimentech byla vždy hodnocena jen jedna buňka jedné rostliny). Příčina tkví v enormní časové náročnosti sledování pohybu diktyosomů (i takto malý analysovaný soubor vyžadoval zaznamenání tisíců posic zaměřovacím křížem). Tato diplomová práce tedy především nabízí rozpracovanou metodu, jak pohyb hodnotit; pro další výzkum bude třeba ji uplatnit na větší objem dat z více biologických opakování.

Kromě popsaných způsobů analýsy se nabízí možnost spočítat diktyosomy, které během zvolené doby vykazaly nějaký přesun, a porovnat jejich množství s těmi, jež se nepohnuly. Každopádně kdybychom takto chtěli analyzovat opět jen oblasti kortikální vrstvy bez

rušivého vlivu cytoplasmatických provazců, bylo by zapotřebí velmi mnoha (dlouhých) záznamů – na cca minutovém videu z jedné buňky totiž v místech splňujících tuto podmínku nenajdeme víc než několik desítek diktyosomů. Navíc zaznamenáme jen minimum těch, které po celých 60 s zůstaly (zhruba) na místě. Přístup navíc naráží na problémy – jednak během prodlouženého snímání jistě dojde k posunu roviny ostrosti, jednak není jasné, jak velký bychom měli při analýze stanovit časový úsek, k němuž se hodnocení klid/pohyb bude vztahovat.

Kromě toho by v úvahu přicházelo zachovat způsob výnosu (rozložení rychlostí nebo jejich průměr), ale výpočty provést pro každý váček zvlášť. Vzniklo by tak ohromné množství velmi rozdílných grafů, příp. čísel, z nichž by se však těžko dalo něco vyčíst. Obří velikost statistického souboru by nicméně byla nezbytná, neboť chování jednotlivých diktyosomů se navzájem pronikavě liší.

Možná by zajímavé výsledky poskytl přístup, jenž byl při několika experimentech zvolen pro měření rychlosti cytoplasmatického proudění: Ježto latB prokazatelně paralyzuje pohyby diktyosomů [Martinière & kol. 2011], dalo by se sledovat, jak u wt a mutantních rostlin probíhá jejich obnova po vymytí drogy.

Vedle konkrétních návrhů, jak výzkum provádět, stojí základní úkol, a sice vymyslet, jak diktyosomy (resp. orgány obecně) při analýze jejich pohybu správně vybírat. Sjednocení způsobů by totiž bezpochyby znamenalo zásadní přínos.

6.2. CYTOPLASMATICKÉ PROUDĚNÍ

6.2.1. VOLBA ROSTLINNÉHO MATERIÁLU A MÍSTA POZOROVÁNÍ

Byly používány 6denní rostliny – jednak kvůli tomu, že práce s takto mladými semenáčky je jednoduchá, manipulací se zpravidla nepoškodí a jejich kořeny mají optimální délku pro pozorování pod mikroskopem, jednak proto, že studium pohyblivosti Golgiho aparátu rovněž probíhalo na 6denním materiálu.

Směřované proudění cytoplasmy je nejpatrnější v protáhlých buňkách; ty se při pěstování rostlin na světle vyskytují takřka výhradně v kořeni, a sice v jeho prodlužovací a diferenciací zóně. Za účelem porovnatelnosti jednotlivých experimentů byla k pozorování vždy vybírána oblast poblíž prvního kořene postranního. Kromě toho byl výzkum prováděn i na rostlinách etiolovaných; zde se sledovaly buňky hypokotylu, v zájmu jednoty vždy v jeho nejspodnější třetině. Ze začátku byly tyto pokusy prováděny se snahou o bezprostřední mikroskopii, tzn. ihned po osvětlení rostlin kultivovaných ve tmě, ale proudění o plné rychlosti se ustavuje tak rychle, že tento přístup byl dosti problematický.

Při aplikaci latB před mikroskopií kořenů se jako nejvhodnější ukázalo nechat je působit přes noc a následně ho vymýt ponořením rostlin do čisté vody na 12 minut. Krátké (\approx 2hodinové) vystavení jedu totiž nezastavilo tok cytoplasmy zcela, a naopak jeho 2denní působení vyvolalo odumírání rostlin. Délka vodního vymývání pak byla zvolena nejmenší možná (méně než 10 minut většinou k obnovení proudění nestačilo; vznikaly značné rozdíly typu 0/1 mezi jednotlivých buňkami téže rostliny). Při pozorování hypokotylů se zjistilo, že regenerace pohybů trvá mnohem déle (hodiny) a nastává v různých buňkách po velmi různých dobách – pravděpodobným důvodem je fakt, že (přestože se jednalo o rostliny pěstované *in vitro*) hypokotylu mají na rozdíl od kořenů kutikulu, pročež komunikace s vymývací lázní u jejich buněk probíhala pomaleji a v menší míře. Dále tedy byly při těchto pokusech mikroskopovány již pouze kořeny.

6.2.2. VÝBĚR ČÁSTIC A MĚŘENÍ RYCHLOSTI

Nejdříve bylo několik náhodně vybraných částic v cytoplasmě sledováno zaměřovacím křížem v programu NIS Elements, pomocí něhož byly záznamy pořízeny. Tato metoda je časově velmi náročná, a vzhledem k malému souboru dat jsou výsledky těchto měření uvedeny spíše pro úplnost a hrubé porovnání, než aby plně hodnověrné výstupy. Záhy bylo tudíž přistoupeno k využití kymogramů. Jejich výhoda spočívá jednak v množství partikulí, jejichž rychlost lze změřit, jednak v tom, že umožňuje okamžitě odlišit ty, které se během záznamu pohybovaly rovnoměrně, od těch, jež byly zbržděny nějakou překážkou. Hodnoceny byly pouze struktury vykazující nerušený pohyb.

Při sledování cytoplasmatického proudění není – díky jeho směrovanosti a poměrně stálé rychlosti – třeba věnovat pozornost snímací frekvenci jako při sledování pohybu diktyosomů.

6.2.3. VÝSLEDKY

Naměřená rychlost cytoplasmatického proudění činí přibližně 5 $\mu\text{m/s}$, a co je zajímavé, mezi buňkami kořenů, zelených a etiolovaných hypokotylů se tato hodnota příliš neliší (i když při jednom experimentu s etiolovanými hypokotyly rostlin wt byl zjištěn průměr kolem 6 $\mu\text{m/s}$). Tento výsledek vcelku souhlasí s literárními údaji [Holweg 2007], možná je mírně vyšší.

Na rychlost toku cytoplazmy jistě mají vliv kultivační podmínky, dále pak teplota a světlo během pozorování. Každopádně nebyla zaznamenána žádná obecná odlišnost rostlin wt od mutantů *arp2* a *arpc5*; významnější rozdíl se týká jen situace, kdy byly etiolované rostliny poprvé vystaveny světlu: Bylo změřeno, že po 3 minutách vykazovaly buňky hypokotylů mutantů *arp2* i *arpc5* statisticky průkazně o 6 až 8 % rychlejší proudění než wt a že tato rychlost se u mutantů za dalších 5 minut už téměř nezvýšila. Takové zjištění může naznačovat, že jejich zrychlovací křivka (viz podkapitulu 2.3., graf 1) je strmější, případně by mohlo být důsledkem vyšší rychlosti jejich cytoplasmatického proudění za tmy.

Žádný obecný rozdíl se neprokázal ani při srovnání wt, *fh1-1* a *fh1-1/arpc5*, i když zde nebylo provedeno tolik pokusů, takže výsledky nelze považovat za definitivní. Přestože rozdíl rychlosti proudění v buňkách etiolovaných hypokotylů mezi wt a mutanty po 8minutové expozici světlu má údajně signifikantní velikost (a činí přibližně 11 %), je třeba poukázat na skutečnost, že hodnota průměru pro wt se při dotyčném experimentu o cca 1 $\mu\text{m/s}$ liší od všech ostatních výsledků, které pro wt rostliny byly obdrženy jindy. To naznačuje značnou variabilitu (jejíž konkrétní příčinu lze těžko určit) a zpochybňuje významnost tohoto rozdílu. Pro zpřesnění a ověření by bylo třeba provést více biologických opakování.

Dle předpokladu byl u trojnásobného myosinového mutantu, negativní kontroly, pohyb uvnitř buněk silně postižen; rychlost proudění u něj dosahovala kolem 0,5 $\mu\text{m/s}$, někdy se pro svou nezřetelnost vůbec nedalo změřit. Takový výsledek je ve shodě s názory o klíčové roli právě myosinů XI-K, XI-1 a XI-2 [Prokhnovsky & kol. 2008]. Kromě toho vykazovaly tyto rostliny značné růstové defekty – byly zakrslé a neprosplávaly.

Celonoční vystavení kořenů 300nM latB proudění zastaví; k jeho obnovení však dochází už po několika minutách vymývání čistou vodou. Výsledky nenaznačují, že by se rostliny wt od mutantů *arp2*, *arpc5*, *fh1-1* nebo *fh1-1/arpc5* nějak lišily ve schopnosti rychlého znovuoustavení proudění. Také se téměř nepodařilo zachytit žádný přechodový stav (buňky se směrovaným, ale pomalým pohybem cytoplazmy) – buď proudění vůbec nebylo zřetelné (hlavně při zkoušení regenerační doby < 10 minut), nebo vykazovalo cca 90% rychlost ve

srovnání s výsledky mikroskopie nijak neošetřených kořenů. Tento fakt se ovšem zdá logickým – typy myosinových motorů ve výbavě buněk jsou dané, a tyto nebyly latrunculinem nijak poškozeny, takže při opětovném vytvoření aktinových vláken po nich začnou kráčet „svými“, nikoli menšími rychlostmi (kortikální vrstva je tenká a cytoplasma dosti vazká [Wolff & kol. 2012], u obecného proudění lze tedy čekat rychlou odezvu na rozblhající se motorisované přesuny váčků).

Nicméně polymerace přirozeně nenastane všude v přesně stejném okamžiku (určitě ne v různých buňkách, ale ani v rámci téže buňky); po jistou dobu bude tudíž proudění chaotické a bude k němu docházet jen v některých oblastech cytoplasmy. Pozorování tento předpoklad většinou potvrdilo.

6.2.4. POZNÁMKY K METODICE, ÚVAHY

Využití kymogramů se ukázalo jako šťastné – metoda se zdá být robustní a přesná. Při zpětném pohledu na experimenty však vyšly najevo různé nedokonalosti, mimo jiné skutečnost, že při pozorování rostlin vystavených latB nebyl proveden jeden vhodný způsob kontroly: Aby se dalo náležitě porovnat obnovené proudění s tím, jaké rostlina vykazuje bez expozice latrunculinu, patřilo by se zahrnout také pokus se semenáčky ponechanými přes noc v čisté vodě (resp. ve vodě s příslušným množstvím DMSO), aby se zjistilo, zda ponoření nějak rychlost proudění neovlivňuje.

Dále by bezpochyby bylo zajímavé sledovat proudění v různých typech buněk (ať už rostlin etiolovaných, nebo kultivovaných na světle) tak, jak to Plieth & Hansen dělali s řasou skleněnkou: zaostřit preparát, zhasnout, zatemnit místnost a po několika hodinách zachytit změny rychlosti bezprostředně po osvětlení. Tento přístup by vyřešil potíže s okamžitou mikroskopií rostlin zvyklých na tmu a umožnil by sestrojení zrychlovacích křivek, čímž by zajisté přispěl k ověření a zpřesnění výsledků.

Co se týče aplikace drog nebo inhibitorů (latB, BDM aj.), je nanejvýš překvapivé a znepokojující (nejen při výzkumu cytoplasmatického proudění), že v literatuře bývá zpravidla uvedena pouze koncentrace, nikoli množství roztoku, jímž byly rostliny ošetřeny. S ohledem na ceny těchto chemikálií lze totiž často pochybovat, zda se objem pletiv vůči objemu lázně dá považovat za zanedbatelný; příliš málo látky může vést k tomu, že tato nebude stačit k vysycení všech vazebných míst. Samotný údaj o koncentraci je pak bezcenný.

V této práci činil při pokusech s 300nM latB objem lázně necelých 10 ml, a to vždy pro zhruba pět 6denních semenáčků najednou. Následné vymývání každé rostliny probíhalo ve 100 ml čisté vody.

6.3. ROZLOŽENÍ pH V BUŇCE

Přesné měření pH se sice kvůli technickým potížím nezdařilo, ale byla zavedena metodika, aby se problematice mohli v budoucnu rozsáhleji věnovat ostatní členové týmu.

Problém nastal hlavně při transientní transformaci – její úspěšnost byla tak nízká (často jen jedna buňka na celém listu), že nedovolila pořídit dostatečné množství obrázků. Druhý nedostatek pramenil z nezkušenosti s ratiometrickými měřeními: Fotografie se dají analyzovat jen tehdy, nejsou-li přeexponované (signál mimo rozsah barevné hloubky způsobí, že poměry fluorescenční odezvy nelze spočítat). Nejprve je tedy třeba provést seřizovací snímání: kontrolovat získaná data a podle nich nastavit výkon excitačních laserů. Během experimentu se pak parametry logicky nesmějí měnit.

Stabilní transformace poskytne mnohem lepší podmínky pro optimalisaci mikroskopie a umožní získat nepoměrně víc obrázků. Mimo to budou jistě pozorované rostliny v daleko lepším stavu než po dvou dnech v kokultivačním roztoku.

6.4. VAKUOLÁRNÍ SYSTÉM

6.4.1. VOLBA ROSTLINNÉHO MATERIÁLU

Kolegyně Petra Schiebertová, která se vakuomem mutantních rostlin také zabývá, pozorovala pokožkové buňky maturovaných děložních listů 14denních rostlin. Výsledky této práce se týkají rostlin mladších (nejméně však 4denních, neboť dříve děložní listy zkoumat nelze), čímž předchozí výzkum rozšiřují, a zahrnují též kvantitativní zhodnocení.

6.4.2. ZPŮSOB MĚŘENÍ

Někdy bylo nutné přistoupit k individuálním úpravám snímků: Membrány různých rostlin se totiž nestejně obarvily, tudíž prosté převedení obrázků do binární podoby a následné stanovení poměrné plochy vakuol by kromě skutečných rozdílů odráželo též odchylky v intenzitě fluorescenční odezvy (jasně svítící membrány se jeví silnějšími). Pro sjednocení vzezření fotografií většinou stačilo upravit kontrast. Tyto zásahy byly tedy vedeny snahou o lepší vzájemnou porovnatelnost naměřených dat.

6.4.3. VÝSLEDKY

Dle očekávání bylo zjištěno, že mutantní rostliny mají v pokožkových buňkách děložních listů relativně menší vakuoly než wt. Při používané metodice měření činí rozdíl obsahu plochy na optickém řezu dosti přesně 5 %, a to pro *arp2* i *arpc5*. Výsledek je zcela směrodatný – nepřiléhavost tonoplastu k plasmatické membráně se (leckdy výrazně) objevila u většiny mutantů, zatímco u wt rostlin jen výjimečně – a shoduje se s dřívějšími výzkumy.

6.4.4. POZNÁMKY K METODICE, ÚVAHY

Optimální by jistě bylo změřit každou centrální vakuolu zvlášť, a její plochu vztáhnout k příslušné buňce. Takový postup by ovšem byl dosti pracný – patrně by vyžadoval ruční obkreslení jak tonoplastu, tak plasmatické membrány. Tím by se analýza značně prodloužila, takže by se nedalo získat tolik dat. Ne vždy se navíc podařilo nasnímat obrázky tak, aby buňky měly svou maximální projekci celé v téže optické rovině; během obkreslování membrán by tedy bylo třeba průběžně přecházet mezi fotografiemi z různých rovin.

Využití měřicího čtverce tyto těžkosti nepřináší – jednak se velikost vakuol vztahuje k němu, nikoli k obsahu buňky, jež by bylo nutno změřit, jednak byl zvolen dostatečně malý, aby odpadla nutnost brát v úvahu více rovin ostrosti.

Další zmenšování čtverce by poskytlo zdánlivě nesmyslné výsledky (zejména u mutantů by časem došlo k poklesu zahrnuté plochy vakuol až na 0). I proto bylo namátkově provedeno několik měření s podstatně většími okny (cca $120 \times 120 \mu\text{m}$), zabírajícími částí několika buněk; výsledky byly překvapivě blízké těm, které poskytly čtverce o hraně $25 \mu\text{m}$ na styku tří buněk. Zjednodušující přístup, ač jistě ne ideální, tedy poskytl vcelku relevantní výstupy.

7. ZÁVĚREČNÉ SHRNUÍ

Práce se zabývala především rostlinami mutantními v podjednotkách Arp2/3 komplexu a kladla si za cíl zjistit, zda tyto mutace mají nějaký vliv na pohyblivost diktyosomů, cytoplasmatické proudění a strukturu vakuolárního systému.

Nezjistila se žádná jednoznačná a prokazatelná souvislost mezi (ne)funkčností proteinů ARP2 nebo ARPC5 a chováním cisteren Golgiho aparátu. Při studiu pohybu diktyosomů bylo poukázáno na technická omezení a metodické i interpretační výzvy.

Ani v případě cytoplasmatického proudění nebyly pozorovány zásadní rozdíly v jeho rychlosti mezi wt a rostlinami *arp2* a *arpc5*; jen výsledky týkající se etiolovaných hypokotylů naznačují, že těsně po prvním osvětlení je proudění u těchto mutantů o několik procent rychlejší. Regenerace cytoplasmatického toku po působení latrunculinu B probíhá u dotyčných mutantů nerozdílně oproti wt. Ani mutanty *fh1-1* a *fh1-1/arpc5* nevykazují obecně změněné proudění; v buňkách etiolovaných hypokotylů bylo sice sledováno o něco pomalejší, ale výsledky prozatím nejsou průkazné. Celkově výzkum přinesl informaci, že rychlost cytoplasmatického proudění se mezi buňkami diferenciační zóny kořenů a buňkami hypokotylů nijak znatelně neliší.

Byly potvrzeny a zpřesněny dosavadní výsledky pozorování vakuolárního systému pokožkových buněk děložních listů rostlin *arp2* a *arpc5*. Centrální vakuoly těchto buněk se u daných mutantů na optickém řezu jeví o několik procent menšími než u wt; lze očekávat, že při trojrozměrné analýze by zjištěný rozdíl byl ještě větší.

8. POUŽITÁ LITERATURA

- Akkerman M. & kol.** (2011): Golgi Body Motility in the Plant Cell Cortex Correlates with Actin Cytoskeleton Organization. *Plant & Cell Physiology* **52**, str. 1844
- Avisar D. & kol.** (2008): Myosin XI-K Is Required for Rapid Trafficking of Golgi Stacks, Peroxisomes, and Mitochondria in Leaf Cells of *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiology* **146**, str. 1098
- Boevink P. & kol.** (1998): Stacks on tracks: the plant Golgi apparatus traffics on an actin/ER network. *The Plant Journal* **15**, str. 441
- *Bünning E.** (1939): Sonstige Lichtwirkungen, speziell Wirkungen auf das Plasma. IN Bünning E.: *Die Physiologie des Wachstums und der Bewegungen*, str. 211. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg
- Campbell R. E. & kol.** (2002): A monomeric red fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, str. 7877
- Corti B.** (1774): Della circolazione del fluido nella Cara. IN Corti B.: *Osservazioni microscopiche sulla Tremella e sulla circolazione del fluido in una pianta acquajuola*, str. 136. Giuseppe Rocchi, Lucca
- Coué M., Brenner S. L., Spector I. & Korn E. D.** (1987): Inhibition of actin polymerization by latrunculin A. *Federation of European Biochemical Societies Letters* **213**, str. 316
- Cvčková F., Novotný M., Pícková D. & Žárský V.** (2004): Formin homology 2 domains occur in multiple contexts in angiosperms. *BioMed Central Genomics* **5**, str. 44
- *Cvrčková F., Oulehlová D. & Žárský V.** (2015): Formins: Linking Cytoskeleton and Endomembranes in Plant Cells. *International Journal of Molecular Science* **16**, str. 1
- Deeks M. J. & kol.** (2010): The plant formin AtFH4 interacts with both actin and microtubules, and contains a newly identified microtubule-binding domain. *Journal of Cell Science* **123**, str. 1209
- Finka A. & kol.** (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**, str. 769
- Foissner I. & Wasteney G. O.** (2000): Microtubule disassembly enhances reversible cytochalasin-dependent disruption of actin bundles in characean internodes. *Protoplasma* **214**, str. 33
- Funaki K. & kol.** (2004): The Motility of *Chara corallina* Myosin was Inhibited Reversibly by 2,3-Butanedione Monoxime (BDM). *Plant & Cell Physiology* **45**, str. 1342
- Gibbon B. C., Kovar D. R. & Staiger C. J.** (1999): Latrunculin B Has Different Effects on Pollen Germination and Tube Growth. *The Plant Cell* **11**, str. 2349

- Gjetting K. S. G., Ytting C. K., Schulz A. & Fuglsang A. T.** (2012): Live imaging of intra- and extracellular pH in plants using pHusion, a novel genetically encoded biosensor. *Journal of Experimental Botany* **63**, str. 3207
- Golomb L., Abu-Abied M., Belausov E. & Sadot E.** (2008): Different subcellular localizations of *Arabidopsis* myosin VIII. *BioMed Central Plant Biology* **8**, str. 3
- Hachikubo Y. & kol.** (2007): Enzymatic Activity and Motility of Recombinant *Arabidopsis* Myosin XI, MYA1. *Plant & Cell Physiology* **48**, str. 886
- Havelková L. & kol.** (2015): Arp2/3 complex subunit ARPC2 binds to microtubules. *Plant Science* **241**, str. 96
- *Hertwig O.** (1920): Thermische Reize. IN Hertwig O.: *Allgemeine Biologie*, str. 157. Gustav Fischer, Jena
- Higaki T. & kol.** (2006): Actin Microfilaments Regulate Vacuolar Structures and Dynamics: Dual Observation of Actin Microfilaments and Vacuolar Membrane in Living Tobacco BY-2 Cells. *Plant & Cell Physiology* **47**, str. 839
- Holliday L. S.** (2000): The Amino-terminal Domain of the B Subunit of Vacuolar H⁺-ATPase Contains a Filamentous Actin Binding Site. *The Journal of Biological Chemistry* **275**, str. 32331
- Holweg C. L.** (2007): Living Markers for Actin Block Myosin-Dependent Motility of Plant Organelles and Auxin. *Cell Motility and the Cytoskeleton* **64**, str. 69
- *Chesarone M. A. & Goode B. L.** (2009): Actin nucleation and elongation factors: mechanisms and interplay. *Current Opinion in Cell Biology* **21**, str. 28
- Kamiya N. & Kuroda K.** (1956): Velocity Distribution of the Protoplasmic Streaming in *Nitella* Cells. *The Botanical Magazine Tokyo* **69**, str. 544
- Kashman Y., Groweiss A. & Shmueli U.** (1980): Latrunculin, a new 2-thiazolidinone macrolide from the marine sponge *Latrunculia magnifica*. *Tetrahedron Letters* **21**, str. 3629
- Kersey Y. M., Hepler P. K., Palevitz B. A. & Wessells N. K.** (1976): Polarity of actin filaments in Characean algae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **73**, str. 165
- Kleinebrecht J., Selow J. & Winkler W.** (1982): The mouse mutant limb-deformity (ld). *Anatomischer Anzeiger* **152**, str. 313
- Knight A. E. & Kendrick-Jones J.** (1993): A myosin-like protein from a higher plant. *Journal of Molecular Biology* **231**, str. 148
- *Kovar D. P. & Pollard D. P.** (2004): Progressing actin: Formin as a processive elongation machine. *Nature Cell Biology* **6**, str. 1158

- Kühne W.** (1864): Verhalten des Muskelgerinnsels. IN Kühne W.: *Untersuchungen über das Protoplasma und die Contractilität*, str. 8. Wilhelm Engelmann, Leipzig
- Lee B. S., Gluck S. L. & Holliday L. S.** (1999): Interaction between Vacuolar H⁺-ATPase and Microfilaments during Osteoclast Activation. *The Journal of Biological Chemistry* **274**, str. 29164
- Li S., Blanchoin L., Yang Z. & Lord E. M.** (2003): The Putative *Arabidopsis* Arp2/3 Complex Controls Leaf Cell Morphogenesis. *Plant Physiology* **132**, str. 2034
- Li-Chuan L. & kol.** (2013): The reorganization of actin filaments is required for vacuolar fusion of guard cells during stomatal opening in *Arabidopsis*. *Plant, Cell & Environment* **36**, str. 484
- Ma B. & kol.** (2012): *Arabidopsis* Vacuolar H⁺-ATPase (V-ATPase) B Subunits Are Involved in Actin Cytoskeleton Remodeling via Binding to, Bundling, and Stabilizing F-actin. *The Journal of Biological Chemistry* **287**, str. 19008
- Machesky L. M. & kol.** (1994): Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from *Acanthamoeba* by affinity chromatography on profilin-agarose. *The Journal of Cell Biology* **127**, str. 107
- Martinière A., Gayral P., Hawes C. & Runions J.** (2011): Building bridges: formin1 of *Arabidopsis* forms a connection between the cell wall and the actin cytoskeleton. *The Plant Journal* **66**, str. 354
- Mathur J. & kol.** (2003a): *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**, str. 3137
- Mathur J., Mathur N., Kernebeck B. & Hülskamp M.** (2003b): Mutations in Actin-Related Proteins 2 and 3 Affect Cell Shape Development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **15**, str. 1632
- *Mathur J.** (2005): The ARP2/3 complex: giving plant cells a leading edge. *BioEssays* **27**, str. 377
- Michelot A. & kol.** (2006): A Novel Mechanism for the Formation of Actin-Filament Bundles by a Nonprocessive Formin. *Current Biology* **16**, str. 1924
- *Mollenhauer H. H. & Morré D. J.** (1994): Structure of Golgi apparatus. *Protoplasma* **180**, str. 14
- Mullins R. D., Heuser J. A. & Pollard T. D.** (1998): The interaction of Arp2/3 complex with actin: Nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, str. 6181

- Nebenführ A. & kol.** (1999): Stop-and-Go Movements of Plant Golgi Stacks Are Mediated by the Acto-Myosin System. *Plant Physiology* **121**, str. 1127
- Nèeman I., Fishelson L. & Kashman Y.** (1975): Isolation of a new toxin from the sponge *Latrunculia magnifica* in the Gulf of Aquaba (Red Sea). *Marine Biology* **30**, str. 294
- Nelson B. K., Cai X. & Nebenführ A.** (2007): A multicolored set of *in vivo* organelle markers for co-localization studies in *Arabidopsis* and other plants. *The Plant Journal* **51**, str. 1126
- Otomo T. & kol.** (2005): Structural basis of actin filament nucleation and processive capping by a formin homology 2 domain. *Nature* **433**, str. 488
- Palevitz B. A., Ash J. F. & Hepler P. K.** (1974): Actin in the Green Alga, *Nitella*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **71**, str. 363
- Patterson G. H.** (1997): Use of the Green Fluorescent Protein and Its Mutants in Quantitative Fluorescence Microscopy. *Biophysical Journal* **73**, str. 2782
- Peremyslov V. V. & kol.** (2013): Identification of Myosin XI Receptors in *Arabidopsis* Defines a Distinct Class of Transport Vesicles. *The Plant Cell* **25**, str. 3022
- Peremyslov V. V., Cole R. A., Fowler J. E. & Dolja V. V.** (2015): Myosin-Powered Membrane Compartment Drives Cytoplasmic Streaming, Cell Expansion and Plant Development. *Public Library of Science ONE* **10**, str. 1
- Perroud PF. & Quatrano R. S.** (2006): The Role of ARPC4 in Tip Growth and Alignment of the Polar Axis in Filaments of *Physcomitrella patens*. *Cell Motility and the Cytoskeleton* **63**, str. 162
- Plieth C. & Hansen UP.** (1992): Light dependence of protoplasmic streaming in *Nitella flexilis* L. as measured by means of laser-velocimetry. *Planta* **188**, str. 332
- Prokhnevsky A. I., Peremyslov V. V. & Dolja V. V.** (2008): Overlapping functions of the four class XI myosins in *Arabidopsis* growth, root hair elongation, and organelle motility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, str. 19744
- Radford J. E. & White R. G.** (1998): Localization of a myosin-like protein to plasmodesmata. *The Plant Journal* **14**, str. 743
- Reddy A. S. N. & Day I. S.** (2001): Analysis of the myosins encoded in the recently completed *Arabidopsis thaliana* genome sequence. *Genome Biology* **2**, str. 0024.1
- Reichelt S. & kol.** (1999): Characterization of the unconventional myosin VIII in plant cells and its localization at the post-cytokinetic cell wall. *The Plant Journal* **19**, str. 555
- Rivolta M., Urrutia R. & Kachar B.** (1995): A soluble motor from the alga *Nitella* supports fast movement of actin filaments in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta* **1232**, str. 1

- *Robinson D. G., Brandizzi F., Hawes C. & Nakano A. (2015):** Vesicles versus Tubes: Is Endoplasmic Reticulum-Golgi Transport in Plants Fundamentally Different from Other Eukaryotes? *Plant Physiology* **168**, str. 393
- Rosero A., Žárský V. & Cvrčková F. (2013):** AtFH1 formin mutation affects actin filament and microtubule dynamics in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **64**, str. 585
- Rouiller I. & kol. (2008):** The structural basis of actin filament branching by the Arp2/3 complex. *The Journal of Cell Biology* **180**, str. 887
- Sambade A. & kol. (2014):** Actin-Dependent and -Independent Functions of Cortical Microtubules in the Differentiation of *Arabidopsis* Leaf Trichomes. *The Plant Cell* **26**, str. 1629
- Sattarzadeh A., Franzen R. & Schmelzer E. (2008):** The *Arabidopsis* Class VIII Myosin ATM2 Is Involved in Endocytosis. *Cell Motility and the Cytoskeleton* **65**, str. 457
- Schiebertová P. (2013):** Role komplexu ARP2/3 v rostlinné buňce (*diplomová práce*), str. 51. Univerzita Karlova, Praha
- *Sparkes I. A. (2010):** Motoring around the plant cell: insights from plant myosins. *Biochemical Society Transactions* **38**, str. 833
- Spector I., Shochet N. R., Kashman Y. & Groweiss A. (1983):** Latrunculins: Novel Marine Toxins That Disrupt Microfilament Organization in Cultured Cells. *Science* **219**, str. 493
- *Staiger C. J. & Blanchoin L. (2006):** Actin dynamics: old friends with new stories. *Current Opinion in Plant Biology* **9**, str. 554
- *Sütterlin C. & Colanzi A. (2010):** The Golgi and the centrosome: building a functional partnership. *The Journal of Cell Biology* **188**, str. 621
- Svitkina T. M. & Borisy G. G. (1999):** Arp2/3 Complex and Actin Depolymerizing Factor/Cofilin in Dendritic Organization and Treadmilling of Actin Filament Array in Lamellipodia. *The Journal of Cell Biology* **145**, str. 1009
- Szymanski D. B., Marks M. D. & Wick S. M. (1999):** Organized F-Actin Is Essential for Normal Trichome Morphogenesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **11**, str. 2331
- Tominaga M. & kol. (2003):** Higher plant myosin XI moves processively on actin with 35 nm steps at high velocity. *The European Molecular Biology Organization Journal* **22**, str. 1263
- Tominaga M. & kol. (2013):** Cytoplasmic Streaming Velocity as a Plant Size Determinant. *Developmental Cell* **27**, str. 345
- *van Gisbergen P. A. C. & Bezanilla M. (2013):** Plant formins: membrane anchors for actin polymerization. *Trends in Cell Biology* **23**, str. 227

- *Vildanova M. S., Wang W. & Smirnova E. A. (2014): Specific Organization of Golgi Apparatus in Plant Cells. *Biochemistry (Moscow)* **79**, str. 894
- Vitavska O., Wieczorek H. & Merzendorfer H. (2003): A Novel Role for Subunit C in Mediating Binding of the H⁺-V-ATPase to the Actin Cytoskeleton. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, str. 18499
- Vitavska O., Merzendorfer H. & Wieczorek H. (2005): The V-ATPase Subunit C Binds to Polymeric F-actin as Well as to Monomeric G-actin and Induces Cross-linking of Actin Filaments. *The Journal of Biological Chemistry* **280**, str. 1070
- Volkman N., Page C., Li R. & Hanein D. (2014): Three-dimensional reconstructions of actin filaments capped by Arp2/3 complex. *European Journal of Cell Biology* **93**, str. 179
- Winter D. C., Choe E. Y. & Li R. (1999): 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**, str. 7288
- Wolff K., Marenduzzo D. & Cates M. E. (2012): Cytoplasmic streaming in plant cells: the role of wall slip. *Journal of the Royal Society Interface* **9**, str. 1398
- Woodhouse F. G. & Goldstein R. E. (2013): Cytoplasmic streaming in plant cells emerges naturally by microfilament self-organization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, str. 14132
- Wu SZ. & Bezanilla M. (2014): Myosin VIII associates with microtubule ends and together with actin plays a role in guiding plant cell division. *eLife* **3**, str. 03498
- Yanagisawa M. & kol. (2015): Patterning mechanisms of cytoskeletal and cell wall systems during leaf trichome morphogenesis. *Nature Plants* **1**, str. 1
- Ye J. & kol. (2009): *Arabidopsis* Formin3 Directs the Formation of Actin Cables and Polarized Growth in Pollen Tubes. *The Plant Cell* **21**, str. 3868
- Yi K. & kol. (2012): Dynamic maintenance of asymmetric meiotic spindle position through Arp2/3 complex-driven cytoplasmic streaming in mouse oocytes. *Nature Cell Biology* **13**, str. 1252
- Zhou K., Sumigray K. D. & Lechler T. (2015): The Arp2/3 complex has essential roles in vesicle trafficking and transcytosis in the mammalian small intestine. *Molecular Biology of the Cell* **26**, str. 1995

Poznámky k seznamu literatury

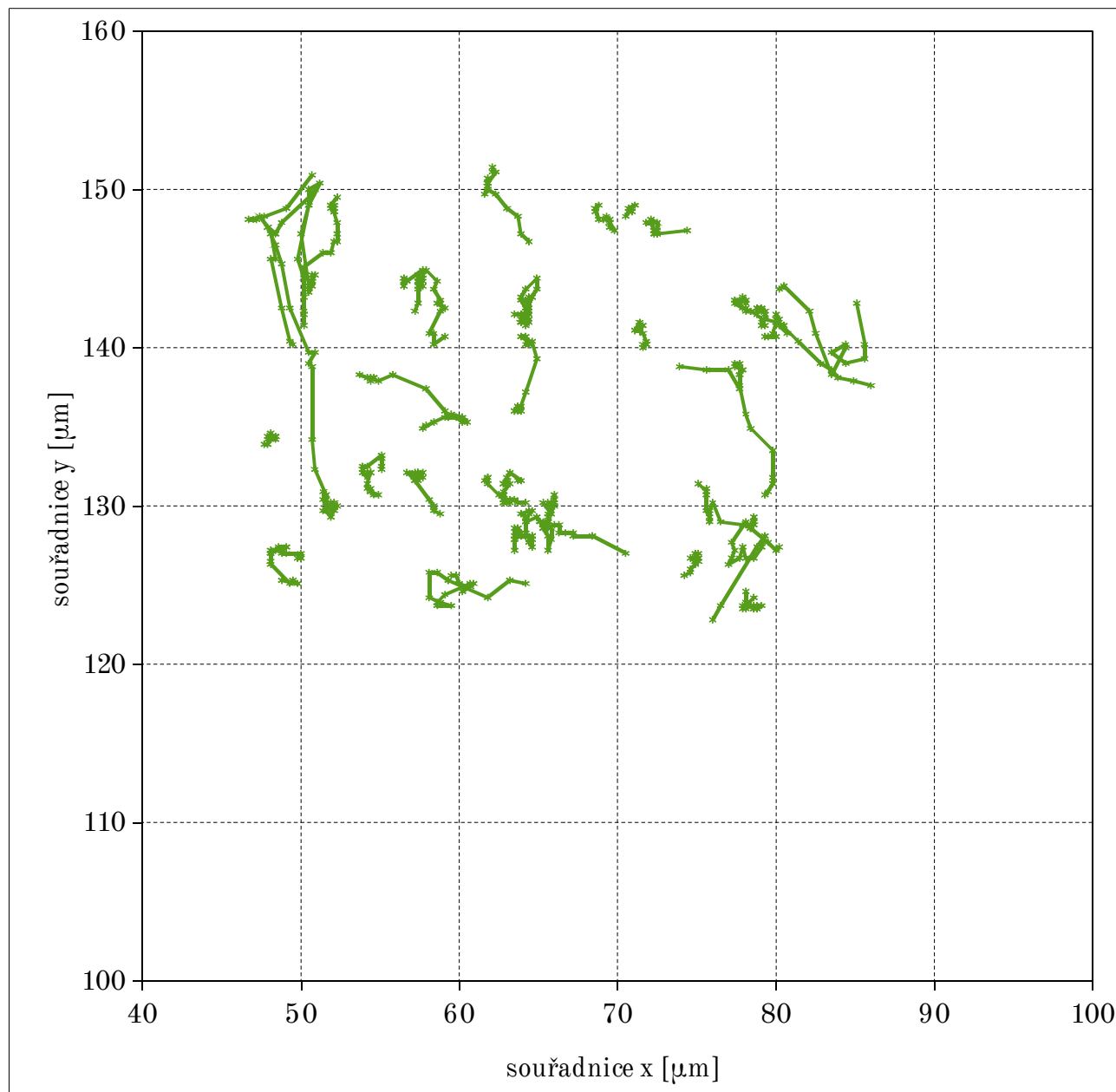
Při počtu autorů < 5 uvádím všechny, jinak píšu jen prvního a zkracuji „& kol.“.

* = sekundární citace

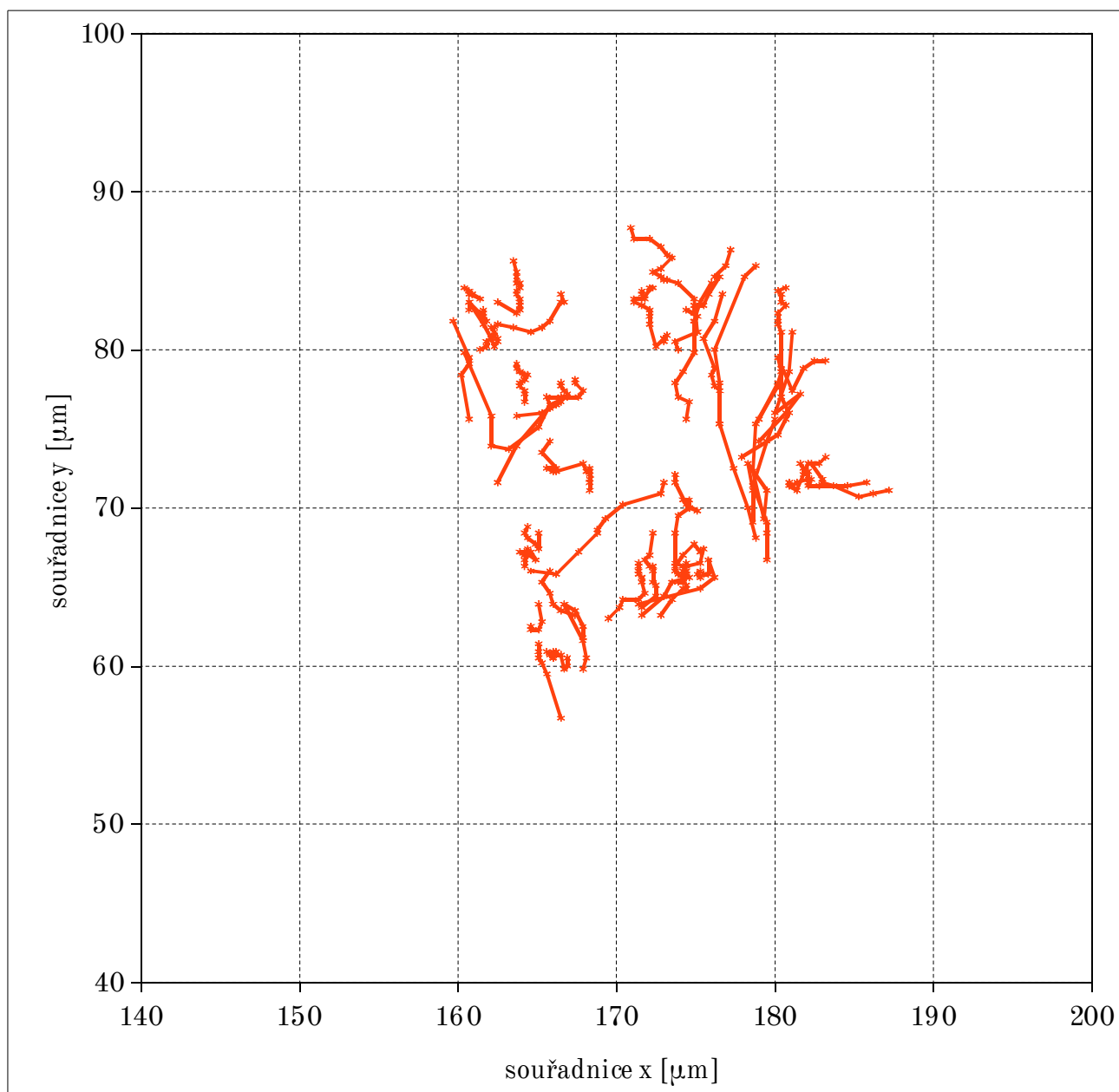
9. PŘÍLOHY

9.1. SOUŘADNICOVÉ GRAFY POHYBU DIKTYOSOMŮ

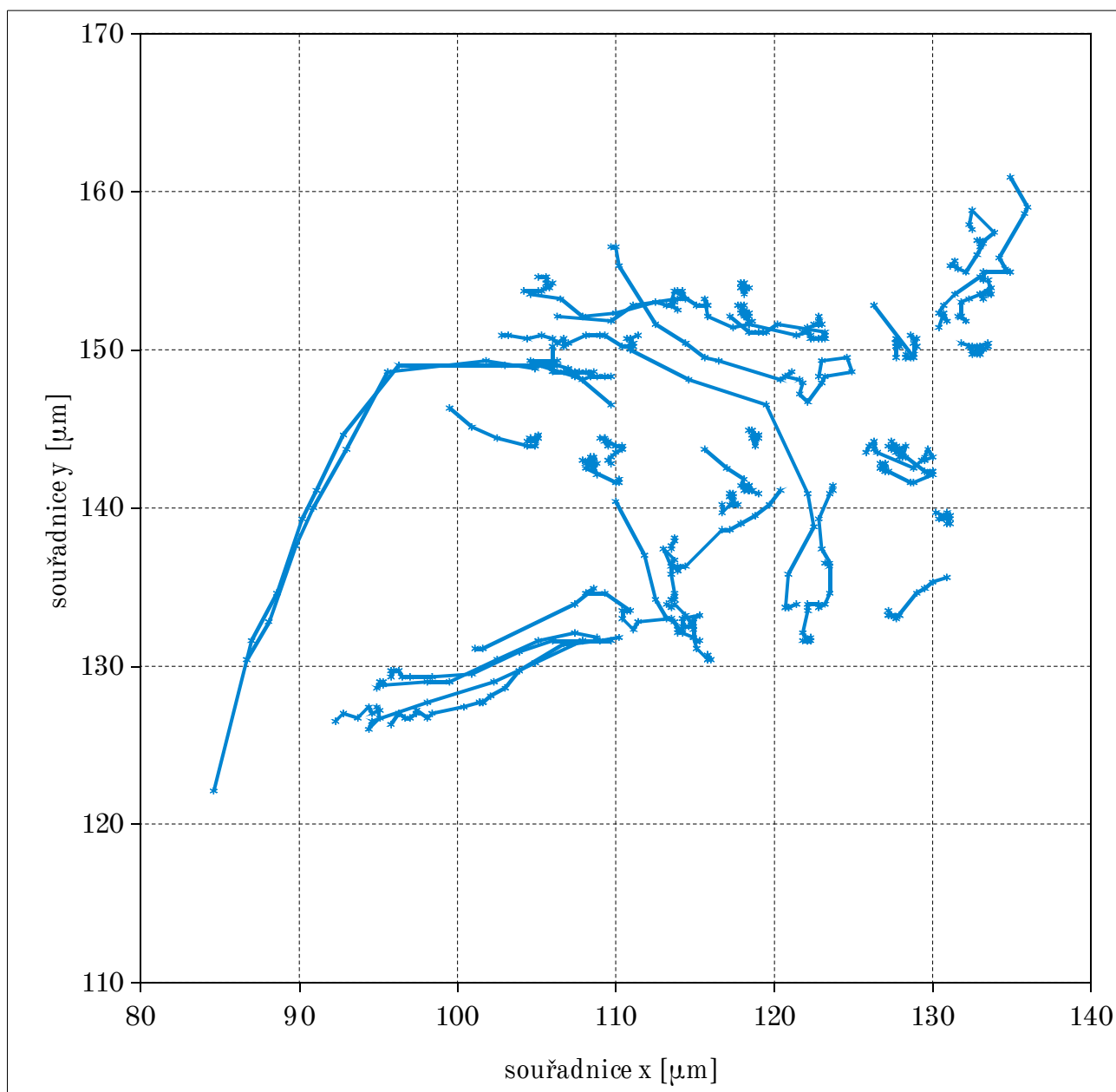
Grafy 34 až 40 je vyneseno chování diktyosomů v kortikální vrstvě pokožkových buněk děložních listů – každá čára představuje pohyb jedné cisterny během trvání záznamu (60 s či 90 s), resp. během doby, kdy tato byla v dané optické rovině viditelná.



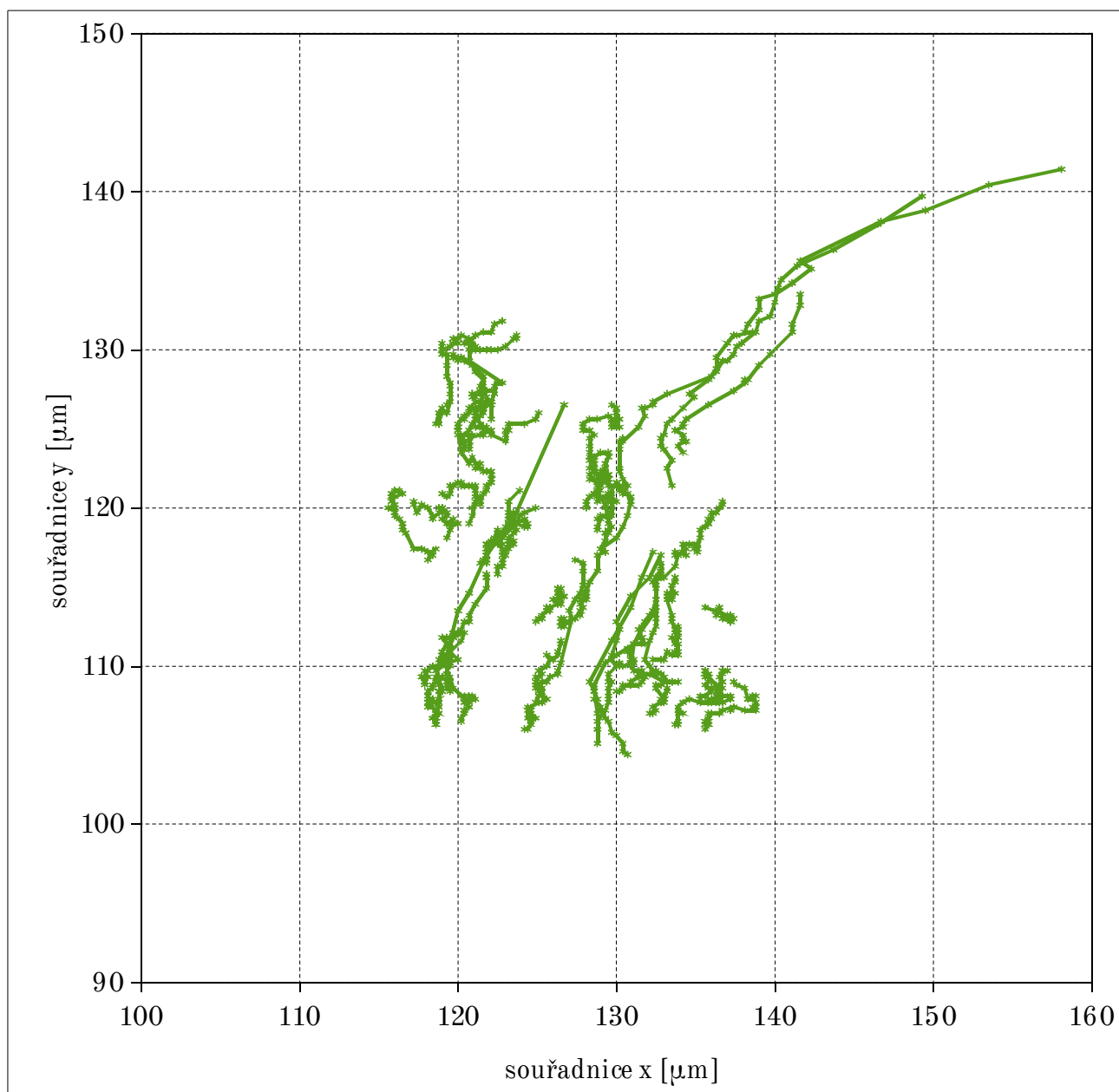
Graf 34: wt, pohyb 38 diktyosomů během 60 sekund snímání (frekvence 1 snímek za 3 s)



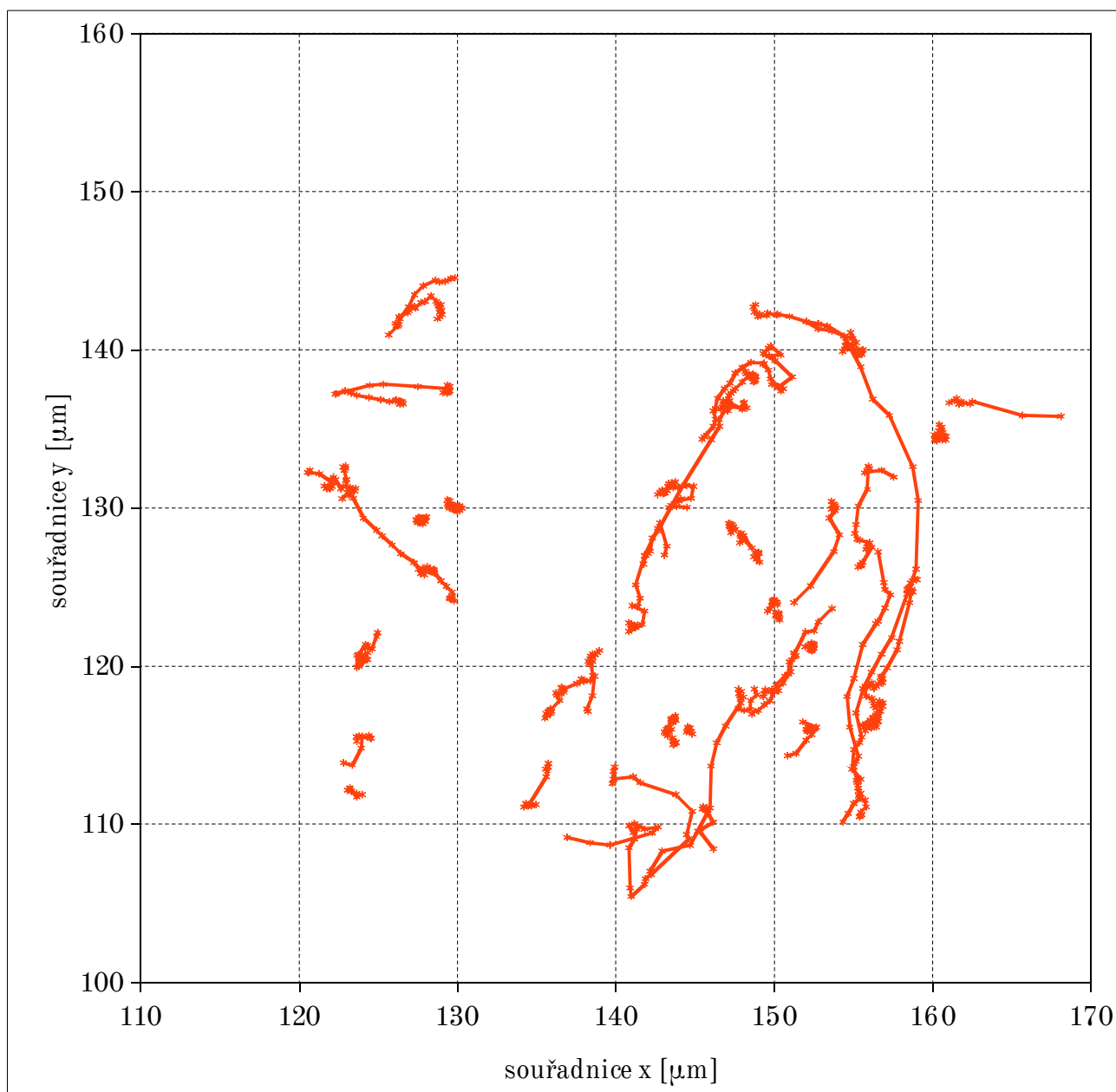
Graf 35: *arp2*, pohyb 39 diktyosomů během 60 sekund snímání (frekvence 1 snímek za 3 s)



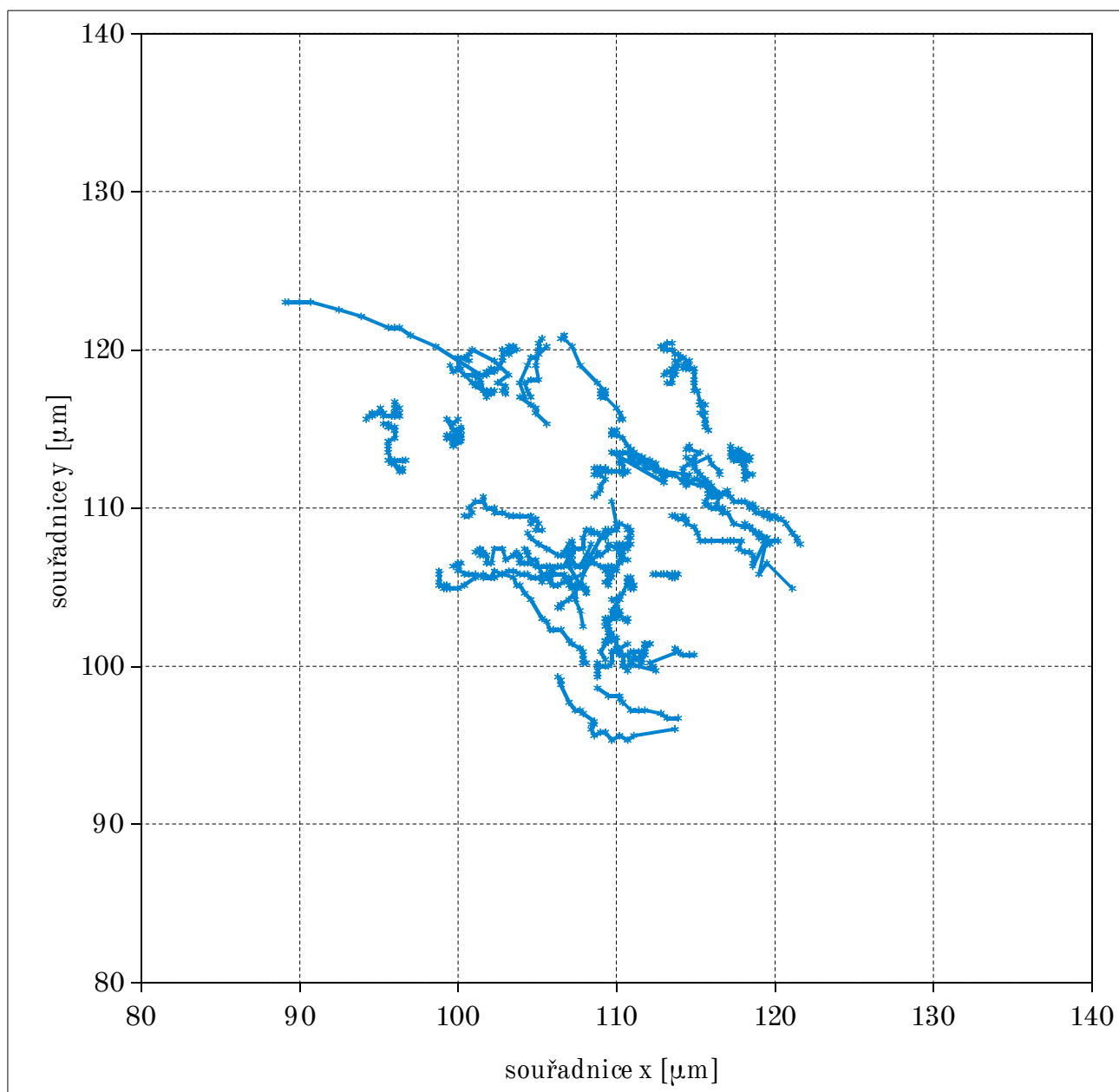
Graf 36: *arpc5*, pohyb 42 diktyosomů během 60 sekund snímání (frekvence 1 snímek za 3 s)



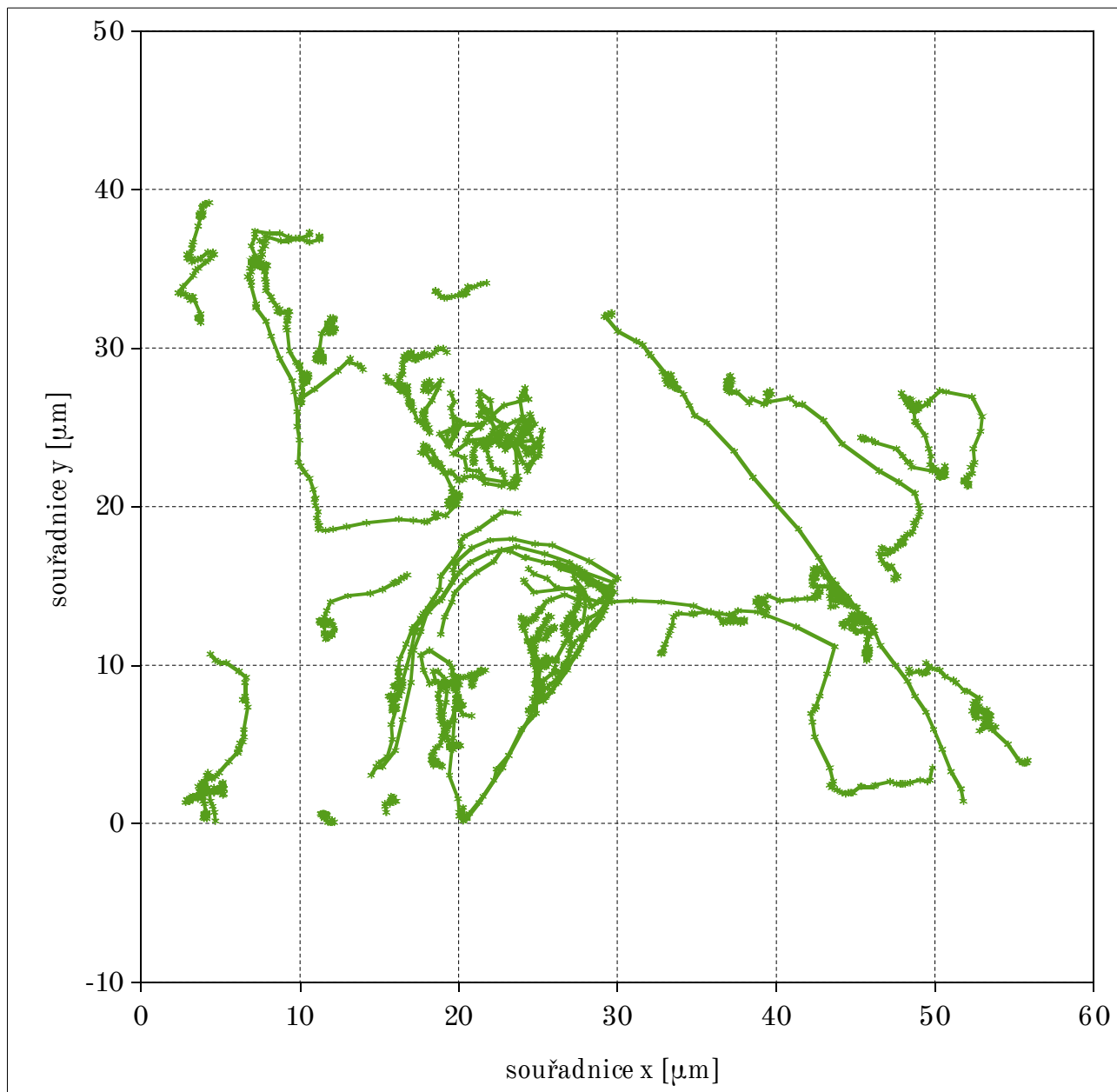
Graf 37: wt, pohyb 42 diktyosomů během 60 sekund snímání (frekvence 1 snímek za 1,5 s)



Graf 38: *arp2*, pohyb 45 diktyosomů během 60 sekund snímání (frekvence 1 snímek za 1,5 s)

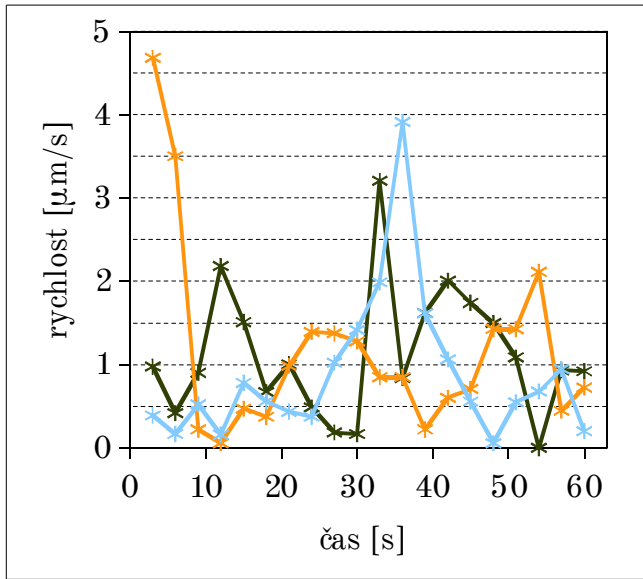


Graf 39: *arpc5*, pohyb 39 diktyosomů během 60 sekund snímání (frekvence 1 snímek za 1,5 s)



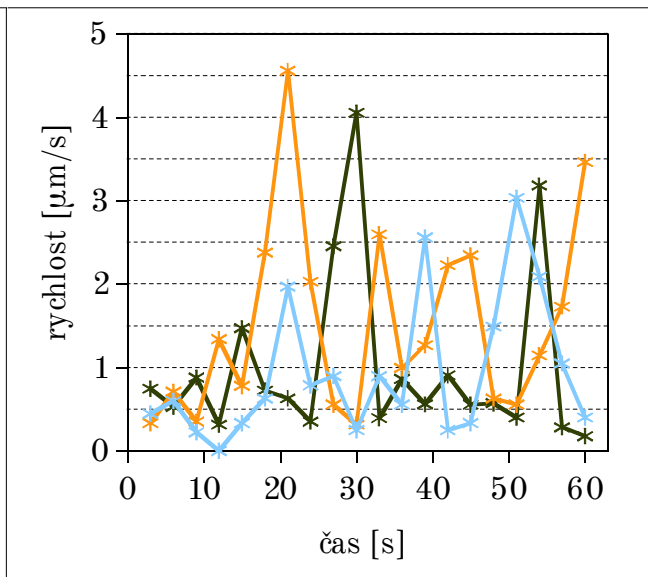
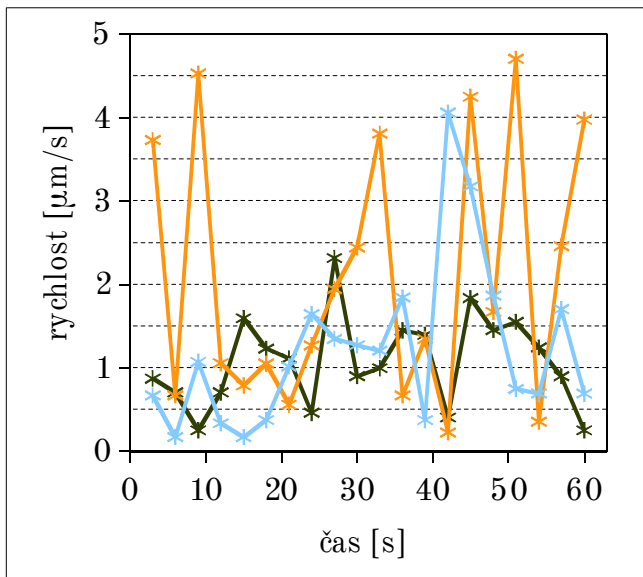
Graf 40: wt, pohyb 32 diktyosomů během 90 sekund snímání (frekvence 1 snímek za 0,64 s)

9.2. UKÁZKY SPOJNICOVÝCH GRAFŮ POHYBU DIKTYOSOMŮ



Příklady $v-t$ výnosů pohybu diktyosomů nabízejí grafy 41 až 43. Jedná se o výběr tří skákavých cisteren pro wt a mutanty *arp2* a *arp5*.

Graf 41: výnos $v-t$ znázorňující pohyb tří diktyosomů; wt, frekvence 1 snímek za 3 sekundy (jak z grafu vyplývá)



Grafy 42 a 43: výnos $v-t$ znázorňující pohyb tří diktyosomů; *arp2* (vlevo) a *arp5* (vpravo), frekvence 1 snímek za 3 sekundy