

Blok 3

Role aktinového cytoskeletu v morfogenezi rostlinných buněk - analýza fenotypu

Úlohy:

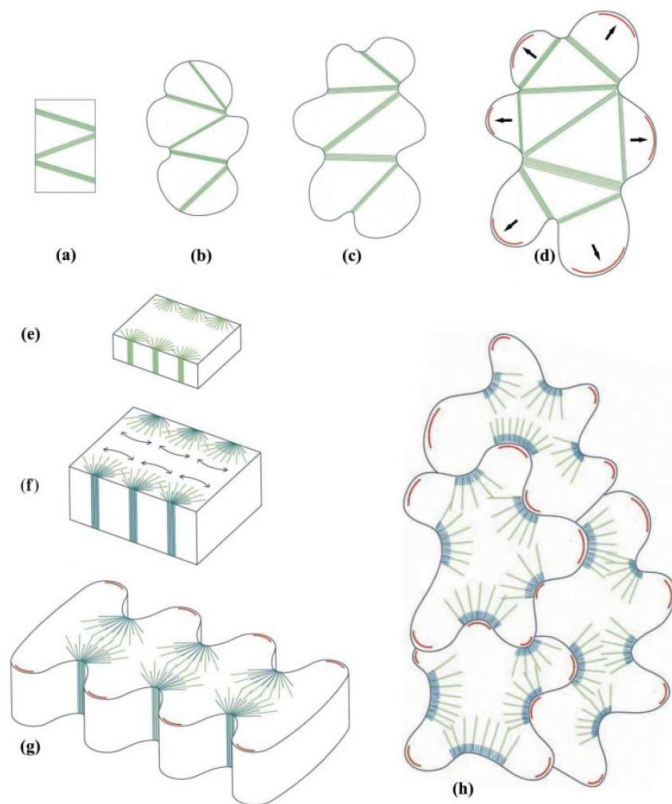
- 1. Kvantifikace počtu zkroucených a správně tvarovaných trichomů** u prvních pravých listů jednoduchých a dvojitých mutantů *Arabidopsis thaliana* s nefunkčními geny pro nukleátory aktinu ARPC5 (podjednotka komplexu Arp2/3) a formin FH1.
- 2. Stanovení permeability povrchu listů** pomocí barvení rutheniovou červení u jednoduchých a dvojitých mutantů *Arabidopsis thaliana* s nefunkčními geny pro nukleátory aktinu ARPC5 (podjednotka komplexu Arp2/3) a formin FH1.
- 3. Stanovení délek hlavního kořene a hypokotylu** u jednoduchých a dvojitých mutantů *Arabidopsis thaliana* s nefunkčními geny pro nukleátory aktinu ARPC5 (podjednotka komplexu Arp2/3) a formin FH1.
- 4. Analýza a porovnání fenotypů** jednoduchých a dvojitých mutantů z úloh 1.-3. Tvorba vlastní hypotézy o rolích jednotlivých aktinových nukleátorů v rostlině.

Teoretický úvod:

Postembryonální vývoj rostlin je provázen průběžným formováním tvaru jednotlivých buněk. Obecně lze formování tvaru buněk chápat jako proces, ve kterém se skládají vlivy vnější a vnitřní, úlohu hrají jak biologické děje, tak fyzikální podmínky v konkrétním pletivu.

V tomto bloku si budeme demonstrovat důležitost buněčné kostry (cytoskeletu) pro utváření tvaru pokožky listu (listové epidermis) a prodlužování orgánů (hypokotyl, stoněk). Cytoskelet je tvořen vysoce dynamickou trojrozměrnou sítí proteinů, která je základní složkou všech eukaryotických buněk a u rostlin sestává se vzájemně propojených sítí mikrotubulů a aktinových filament. Při formování tvaru buněk je vždy důležitá souhra mezi složkami cytoskeletu a buněčné stěny (**Obr. 1**).

Aktinový cytoskelet u rostlin hraje roli v buněčných procesech, jako jsou pohyb organel, zavírání a otevírání průduchů, ustavení buněčné polarity, vývoj a směrovaný buněčný růst a buněčné dělení (Hussey et al., 2006). V našich úlohách se budeme zabývat proteiny, které iniciují vznik nových aktinových filament, tj. nukleují aktin. Aktinové nukleační faktory, které byly dosud objeveny u rostlin, zahrnují komplex Arp2/3 a forminy. Zatímco komplex Arp2/3 rozvětňuje síť stávajících aktinových filament, forminy katalyzují vznik přímých (nevětvících se) aktinových vláken (Goode a Eck 2007).

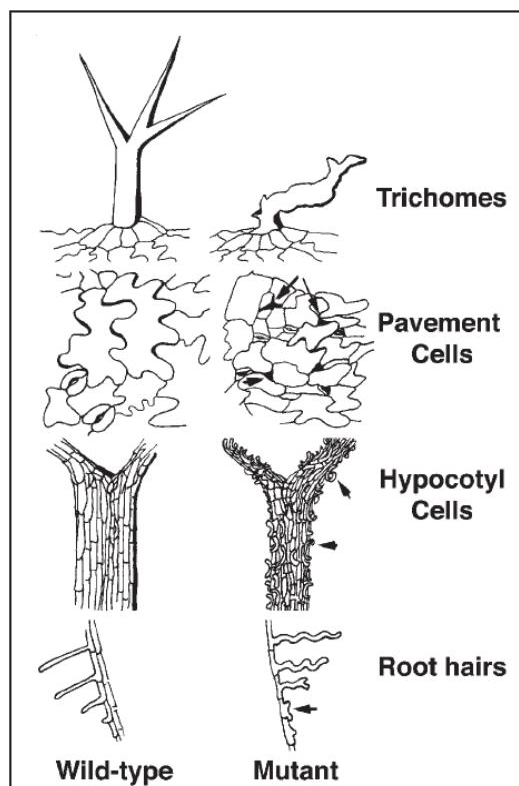


Obr. 1: Spolupráce mikrotubulů (zeleně), mikrofibril buněčné stěny (modře) a aktinových filament (červeně) při morfogenezi buněk listového mezofylu (a-d) a epidermis (e-h). Podle Panteris and Galatis, (2005).

ARP2/3 komplex je evolučně konzervovaný proteinový komplex složený ze sedmi podjednotek (ARP2, ARP3 a ARC1-ARPC5) s poměrně konzervovanou strukturou. Rostliny postrádající podjednotku ARPC5 jsou životaschopné, fertillní, a mají charakteristické fenotypové projevy, mezi které patří změněná

morfologie trichomů, pokožkových buněk a změny v délce kořene a hypokotylu (**Obr. 2**). V těchto rostlinách je pravděpodobně snížena schopnost aktinu vytvářet vlákna snížena schopnost buněk nabývat konkrétního tvaru. Naproti tomu delece podjednotek Arp2/3 u živočišných buněk je často letální (Winter et al., 1999).

Kompletně osekvenovaný genom *Arabidopsis thaliana* odhalil přítomnost rozmanité mnohagenové rodiny formin-like sekvencí (Blanchoin a Staiger 2010). Formin třídy FH1, člen třídy I forminů *Arabidopsis thaliana* hraje roli při nukleaci aktinových filament *de novo*, váže se s vysokou afinitou na již existující aktinová filamenta a také je váže do svazků (Michelot et al. 2006). Rostliny s mutovaným forminem FH1 vykazují změněnou morfolologii pokožkových buněk (Rosero et al., 2016), ale celkově jsou projevy jednoduché mutace FH1 spíše obtížně rozpoznatelné.



Obr. 2: Fenotyp rostlin s mutovaným Arp2/3 komplexem. Nejnápadnějšími jsou postižení tvaru buněk pokožkových pletiv listu, jako jsou trichomy a dlaždicové buňky (pavement cells), pokožky hypokotylu a pokožky kořene (kořenové vlásy). Podle Mathur (2005).

Úloha 1:

1. Kvantifikace počtu zkroucených a správně tvarovaných trichomů u prvních pravých listů jednoduchých a dvojitých mutantů *Arabidopsis thaliana* s nefunkčními geny pro nukleátory aktinu ARPC5 (podjednotka komplexu Arp2/3) a formin FH1.

Cíl úlohy:

Cílem úlohy je stanovení frekvence výskytu zkroucených a normálních trichomů na adaxiální straně prvních pravých listů u tří různých mutantních rostlin *Arabidopsis thaliana* a divokých (wild-type) rostlin. U předložených rostlin spočítejte s pomocí binokulární lupy celkový počet trichomů na prvních pravých listech a vyhodnoťte, zda jsou trichomy normální či zkroucené. Porovnáním jednoduchých a dvojitých mutantů posuďte úlohu jednotlivých aktinových nukleátorů a jejich funkční zastupitelnost.

Princip úlohy:

Tato úloha je zaměřena na morfologii trichomů (**Obr. 3**) u rostlin s mutacemi v nukleátorech aktinového cytoskeletu. V roce 2003 Mathur a kolektiv publikovali práci, kde dokumentují zkroucený „distorted“ tvar trichomů u rostlin s mutací v podjednotkách komplexu Arp2/3. Oproti tomu analýza fenotypu rostlin mutantních v nejhojnějším typu forminu, FH1, neodhalila změněnou morfologii trichomů (Blanchoin a Staiger 2010).

Vaším úkolem v této úloze je potvrdit nebo vyvrátit výše uvedená zjištění porovnáním tvaru a počtu trichomů u kontrolních (wild-type) rostlin s mutanty *arpc5* a *fh1-1*. Dále pak porovnat tyto parametry u rostlin mutantních v obou nukleátorech aktinového cytoskeletu, tj. dvojitého mutantu *fh1-1/arpc5* vzniklého křížením jednoduchých mutantů. Tento dvojitý mutant dosud nebyl v literatuře popsán a je v současné době studován výzkumnými týmy KEBR.

Materiál a postup:

Rostlinný materiál a potřebné vybavení:

1) Klíční rostliny *Arabidopsis thaliana* pěstované 10 dnů *in vitro* na pevném médiu. Složení kultivačního média: 1% sacharóza, 1% agar, 2,15g/l MS sole, pH 5.7.

Na miskách jsou 4 linie označené popiskem:

wt - divoký (wild type) typ

arpc5 - jednoduchý mutant s postiženou ARPC5 podjednotkou komplexu Arp2/3

fh1-1 - jednoduchý mutant s postiženým forminem FH1

fh1-1/arpc5 - dvojitý mutant s postiženými proteiny ARPC5 a FH1

2) Fixy

3) Binokulární lupa s fotoaparátem

Postup:

- 1) Předložené rostliny všech 4 linií očísľujte, číslo napište fixou na zadní stranu misky, stačí takto označit 10 rostlin pro každou linii.
- 2) Pomocí binokulární lupy pozorujte morfologii trichomů. U každé jednotlivé očísľované rostliny určete, zda má na prvních pravých listech normální či zkroucené trichomy (**Obr. 3**) a stanovte jejich celkový počet. Vzhledem k tomu, že první pravé listy u *Arabidopsis thaliana* vyrůstají v párech, vyhodnoťte trichomy na obou prvních pravých listech. Rostliny z misky nepřenášejte a nechte je na médiu, tak jak narostly, budete je fotit a měřit v úloze 3.
- 3) Pořídte fotodokumentaci tvaru trichomů pro každou linii. Stačí jedna kvalitní fotografie pro každou linii.
- 4) Popište experiment svými slovy, vyhodnoťte tvar a uveďte počet trichomů u každé linie, doplňte obrazovou dokumentací.



Obr. 3: Fenotyp trichomů na prvních pravých listech semenáčků *Arabidopsis thaliana*. U kontrolních rostlin divokého typu (wt, vlevo) jsou trichomy správně utvářené, protažené, aktinový cytoskelet je plně funkční. Rostliny s mutovanou jednou podjednotkou komplexu Arp2/3 (vpravo) mají trichomy zkroucené a zakrslé.

Úloha 2:

Stanovení permeability povrchu listů pomocí barvení rutheniovou červení u jednoduchých a dvojitých mutantů *Arabidopsis thaliana* s nefunkčními geny pro nukleátory aktinu ARPC5 (podjednotka komplexu Arp2/3) a formin FH1.

Cíl úlohy:

Stanovte míru permeability pokožkové vrstvy buněk pomocí barvení rutheniovou červení. Změna permeability povrchu listu rostliny zde slouží jako parametr udávající míru tvarového poškození a adheze buněk u jednotlivých mutantních linií (**Obr. 4**). Po inkubaci s barvivem (3h) pozorujte, zaznamenejte a vyhodnoťte míru zbarvení u jednoduchých a dvojitých mutantů v aktinových nukleátorech, porovnejte s divokými rostlinami.

Princip úlohy:

Rutheniová červeň je histologické barvivo, které neprochází přes neporušenou a nepřerušenu kutikulu a voskovou vrstvu do listu. Pokud je ale morfologie a tím pádem i adheze pokožkových buněk narušená, dojde k penetraci barviva do listu. Takovou situací může být právě poškození aktinového cytoskeletu. Rutheniová červeň se váže na pektiny (polysacharidy kys. galaktouronové), které jsou hlavní složkou střední lamely a vyplňují prostory mezi přilehlými buněčnými stěnami. Výsledkem je červené zbarvení listu.

Materiál a postup:

Rostlinný materiál a potřebné vybavení:

- 1) Klíčnicí rostliny *Arabidopsis thaliana* pěstované 10 dnů *in vitro* na pevném médiu. Složení kultivačního média: 1% sacharóza, 1% agar, 2,15g/l MS sole, pH 5.7.
- 2) 0,01% vodný roztok rutheniové červeně (Ammonium ruthenium oxychlorid).
- 3) Kádinka na vodu, plastová miska se 6 jamkami, fixy
- 4) Pinzeta, nůžky
- 5) Makrostožan s fotoaparátem
- 6) Podložní a krycí skla, plastové kapátko, voda
- 7) Mikroskop s fotodokumentačním zařízením

Postup:

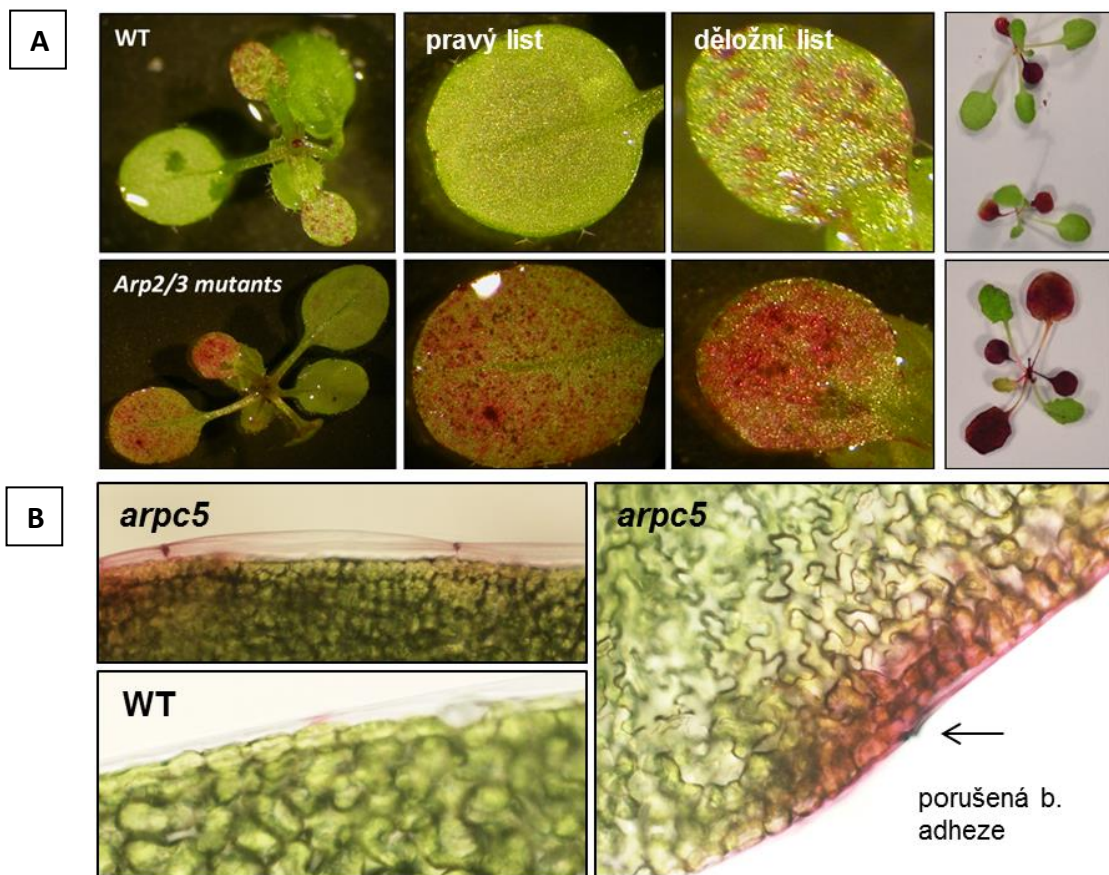
- 1) 0,01% vodný roztok rutheniové červeně převedte do 4 jamek plastové destičky, naplňte roztokem vždy alespoň polovinu objemu jamky.
- 2) Na stole máte připravené rostliny rostoucí v MS mediu - 4 linie označené popiskem. Vždy 3 rostliny z každé pozorované linie (wt, *arpc5*, *fh1-1* a *fh1-1/arpc5*) ustříhnete opatrně těsně u země, dejte

pozor na porušení kutikuly a vosků. Pinzetou přeneste rostliny za hypokotyl do připravené lázně s rutheniovou červení a pečlivě jednotlivé linie označte fixem. Ponechte stát 3h při pokojové teplotě.

3) Rostliny vyjměte z lázně (pinzetou), opatrně ponořením opláchněte ve vodě v kádince a pozorujte zbarvení jednotlivých listů u jednotlivých linií pod binokulární lupou. Celé rostliny vyfoťte (**Obr. 4A**).

4) Ustříhněte první pravý list z každé pozorované linie a vytvořte z něho vodní preparát na podložním sklíčku. Pod mikroskopem vyfoťte detail pokožkových buněk (**Obr. 4B**).

5) Popište experiment svými slovy, vyhodnoťte míru zbarvení rostlin pro každou linii, doplňte obrazovou dokumentací celých barvených rostlin (**Obr. 4A**) a detailu pokožkových buněk (**Obr. 4B**).



Obr. 4: Barvení listů rutheniovou červení. A) Po barvení rostlin rutheniovou červení dochází k obarvení prvních pravých listů u rostlin s mutacemi v podjednotkách ARP2/3 komplexu. Děložní listy se obarví jak u divokého typu tak u mutantů. **B)** Detailní pohled na pronikání barvy mezi buňky. Ukázka změny adheze pokožkových buněk listu.

Úloha 3:

Stanovení délek hlavního kořene a hypokotylu u jednoduchých a dvojitých mutantů *Arabidopsis thaliana* s nefunkčními geny pro nukleátory aktinu ARPC5 (podjednotka komplexu Arp2/3) a formin FH1.

Cíl úlohy:

Tato úloha je zaměřená na jeden z nejviditelnějších fenotypů rostlin s mutací v Arp2/3 podjednotkách. Mutantní rostliny mají delší kořeny a kratší hypokotyl v porovnání s divokými rostlinami. Cílem úlohy je hypokotyl a kořen za použití programu ImageJ změřit a délky u jednotlivých mutantních linií porovnat.

Princip úlohy:

Principem úlohy je porovnat mutanty v nukleaci aktinu nejen na základě změněné morfologie buněk listu, ale zaměřit se i na další důležité rostlinné orgány u mladých semenáčků *Arabidopsis thaliana* – na hypokotyl a kořeny. V této úloze budete pracovat s programem ImageJ, volně dostupným obrazovým analyzátozem.

Materiál a postup:

Rostlinný materiál a potřebné vybavení:

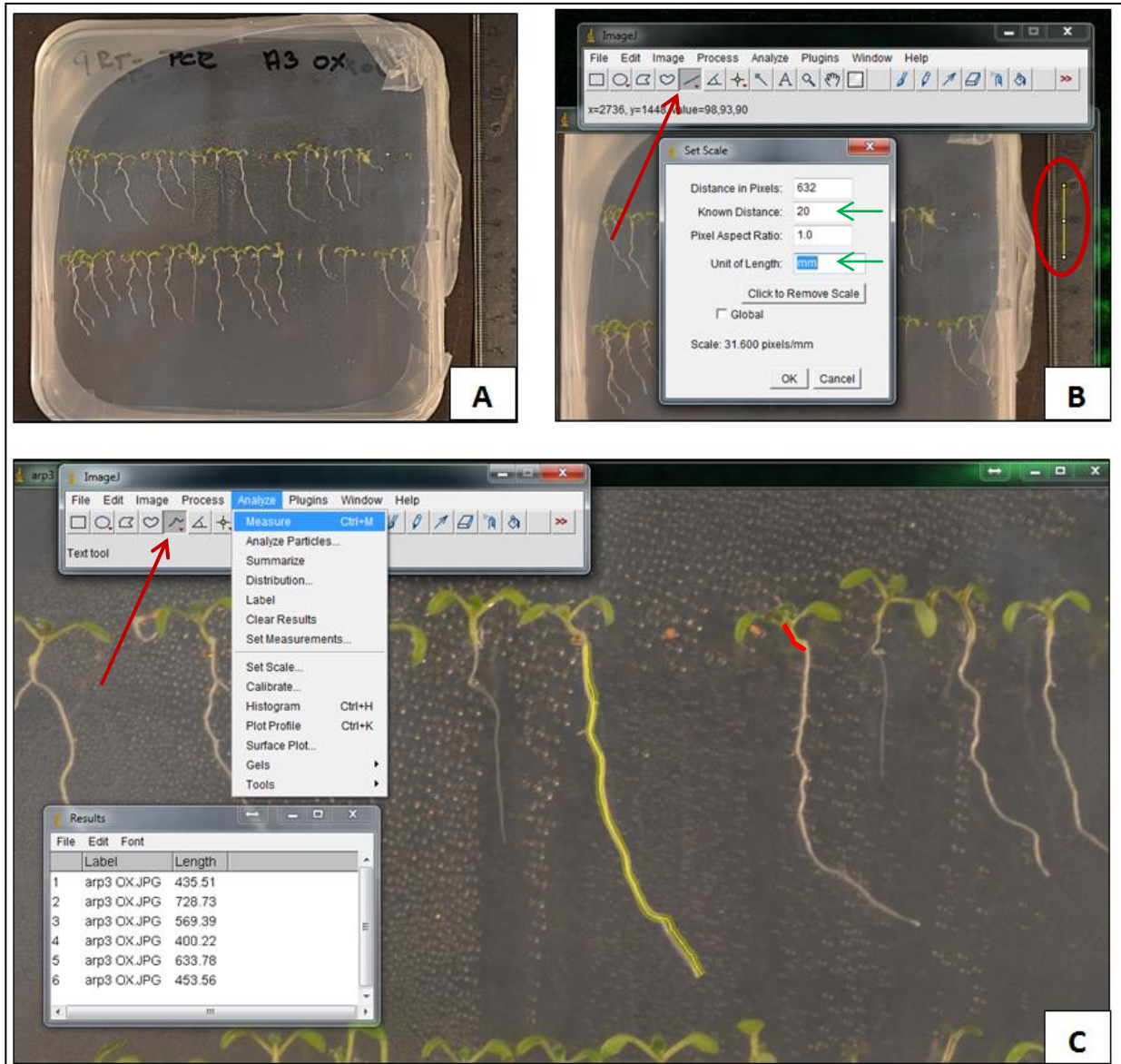
1. Klíční rostliny *Arabidopsis thaliana* pěstované 10 dnů *in vitro* na pevném médiu. Složení kultivačního média: 1% sacharóza, 1% agar, 2,15g/l MS sole, pH 5.7.
2. Makrostojan s fotoaparátem a pravítko.
3. PC s programem ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

Postup:

- 1) Misky s nasazenými rostlinami vyfoťte spolu s pravítkem, dle **obr. 5A**.
- 2) Snímky přeneste do laboratorních notebooků a otevřete v programu imageJ.
- 3) Nastavte měřítko pomocí pravítka:
Pomocí nástroje pro výběr přímé čáry (*Straight line*) (**Obr. 5B – červená šipka**) nakreslete úsečku podél hrany pravítka dlouhou 20mm (**Obr. 5B – červený ovál**). Pomocí příkazu Set Scale (*Analyze/Set Scale*) zadejte v programu délku nakreslené úsečky a její jednotky (**Obr. 5B – Set scale – zelené šipky**).
- 4) Délku kořene a hypokotylu rostlin změřte pomocí nástroje *Freehanded lines* (**Obr. 5C - šipka**). V horní liště programu z nabídky Draw Tools použijte nástroj *freehanded lines* a obtahujte nejprve kořeny rostlin. Měření zaznamenávejte po každém obkreslení kořene a poté hypokotylu pomocí příkazu *Measure* (*Analyze/Measure*). Výsledky se zobrazí v tabulce dialogového okna Results. Změřte

kořeny první vybrané linie (**Obr. 5C – žlutě naznačené**), čísla si zkopírujete do excelového souboru a popište názvem linie. Postupně změřte kořeny všech linií. Stejně postupujte při měření hypokotylů (**Obr. 5C – červeně naznačené**). ImageJ ukládá čísla s desetinnou tečkou místo čárky. Tento formát v excelu změňte (*Najít/Nahradit/Nahradit vše*), jinak nepůjde vypočítat průměrná délka kořene a hypokotylu.

5) Pomocí tabulkového editoru (Excel) vypočítejte průměrnou délku u všech hypokotylů a kořenů na miskách pro všechny linie. Z čísel vytvořte přehledné grafy. Doplněte o chybové úsečky. Do protokolu zařadte snímky linií na miskách a zpracované grafy.



Obr. 5: Měření délek hypokotylu a kořene. Práce s programem ImageJ.

Úloha 4:

Analýza a porovnání fenotypů jednoduchých a dvojitých mutantů z úloh 1.-3. Tvorba vlastní hypotézy o rolích jednotlivých aktinových nukleátorů v rostlině.

Cíl úlohy:

Cílem poslední úlohy je vyhodnocení všech nasbíraných dat v úlohách předchozích. Dle předlohy (**Tab. 1**) vytvořte přehlednou tabulky fenotypů mutantních rostlin (*fh1-1*, *arpc5*, *fh1-1/arpc5*) v porovnání s divokými rostlinami a mezi sebou navzájem. Zahrňte parametry počet trichomů, zkroucenost trichomů (úloha 1), propustnost listu (úloha 2) a délky hypokotylu a kořene (úloha 3). Zformulujte vlastní hypotézu o rolích nukleátorů aktinu v rostlinné buňce, tj. komplexu Arp2/3 a forminů s přihlédnutím k fenotypu dvojitého mutantu *fh1-1/arpc5*.

Projev mutace	WT	<i>arpc5</i>	<i>fh1-1</i>	<i>fh1-1/arpc5</i>
Průměrný počet trichomů na list (číslo)				
Zkroucené trichomy (ano/ne)				
Permeabilita listů (ano/ne)				
Průměrná délka hypokotylu (číslo)				
Průměrná délka kořene (číslo)				

Tab. 1: Příklad tabulky fenotypů.

Citovaná literatura:

- Blanchoin, L. & C. J. Staiger (2010) Plant formins: Diverse isoforms and unique molecular mechanism. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 1803, 201-206.
- Goode BL, Eck MJ (2007) Mechanism and function of formins in the control of actin assembly. *Annual Review of Biochemistry* 76:593-627.
- Hussey PJ, Ketelaar T, Deeks MJ (2006) Control of the actin cytoskeleton in plant cell growth. *Annual Review of Plant Biology* 57:109-125.
- Mathur J, Mathur N, Kirik V, Kernebeck B, Srinivas BP, Hulskamp M (2003) Arabidopsis CROOKED encodes for the smallest subunit of the ARP2/3 complex and controls cell shape by region specific fine F-actin formation. *Development* 130:3137-3146.
- Mathur, J. (2005). The ARP2/3 complex: giving plant cells a leading edge. *Bioessays* 27: 377–87.
- Michelot, A., E. Derivery, R. Paterski-Boujemaa, C. Guerin, S. J. Huang, F. Parcy, C. J. Staiger & L. Blanchoin (2006) A novel mechanism for the formation of actin-filament bundles by a nonprocessive formin. *Current Biology*, 16, 1924-1930.
- Panteris, E. and Galatis, B. (2005). The morphogenesis of lobed plant cells in the mesophyll and epidermis: organization and distinct roles of cortical microtubules and actin filaments. *New Phytol.* 167: 721–32.
- Rosero A, Oulehlová D, Stillerová L, Schiebertová P, Grunt M, Žárský V, Cvrčková F. Arabidopsis FH1 formin affects cotyledon pavement cell shape by modulating cytoskeleton dynamics. *Plant Cell Physiol.* 2016;57:488–504.
- Winter DC, Choe EY, Li R (1999b) Genetic dissection of the budding yeast Arp2/3 complex: A comparison of the in vivo and structural roles of individual subunits.