Univerzita Karlova   
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie   
Studijní obor: Experimentální biologie rostlin



Bc. Štěpánka Kebrlová

Role aktinového cytoskeletu při umísťování auxinových přenašečů v plazmatické membráně  
The role of actin cytoskeleton in the targeting of auxin carriers to the plasma membrane

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Jan Petrášek, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Judith Garcia Gonzalez

Praha, 2022

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 24.12.2021

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

Štěpánka Kebrlová

Poděkování

Chci poděkovat svému školiteli Janu Petráškovi, potom své konzultantce Judith. Aničce za pomoc s rostlinkami.

Taky děkuji laboratoři Matese za rady a poskytnutí barviček.

Potom děkuji své rodině, a to hlavně bratrovi a dále svému příteli za podporu.

Abstrakt

Auxin hraje významnou roli ve vývoji rostlin již od prvotního zakládání embrya. Jeho transport z buňky do buňky zajišťují především auxinové přenašeče umístěné na plazmatické membráně. Přenos auxinu ven z buňky zajišťují proteiny rodin PIN-FORMED (PIN) a ABCB/PGP. Pro přenos auxinu do buňky slouží proteiny rodiny AUX1/LAX.

Tato práce se bude soustředit na pozorování pokožky děložních lístků *Arabidopsis thaliana* v období, kdy jsou buňky malé a teprve se vyvíjejí. Buňky pokožky se v prvotních fázích vývoje dělí a poté dochází k diferenciaci na buňky pokožkové a stomatální. Pro expanzi pokožkových buněk je důležitý správný transport auxinu přes plazmatickou membránu a také aktinový cytoskelet, který zabraňuje expanzi v určitých místech buňky. Cílem této práce bude zjistit, jakým způsobem se podílí aktinový cytoskelet na lokalizaci auxinových přenašečů v plazmatické membráně. Bude se sledovat vliv mutace v podjednotkách komplexu ARP2/3, který je zodpovědný za větvení aktinových filament. Dále se budou pozorovat mutanty v aktinu a myozinu. Narušení aktinu by mělo způsobovat špatné umístění auxinových přenašečů na plazmatické membráně s negativním vlivem na expanzi a tvarování pokožkových buněk. Předmětem práce bude také vytvoření nových linií pomocí křížení. Práce navazuje na předchozí bakalářskou práci.

Klíčová slova: auxin, cytoskelet, auxinové přenašeče, plazmatická membrána

Abstract

Key words: auxin, cytoskeleton, auxin carriers, plasma membrane

Obsah

Seznam zkratek

Úvod a cíle práce

Materiál a metody

Rostlinný materiál

Pro experimenty byly využívány linie rostlin Arabidopsis thaliana (ekotyp Columbia) s fluorescenčně označenými proteiny.

... výpis

Kultivace rostlin

Rostliny určené pro sklízení semen byly pěstovány v kultivační místnosti při teplotě 23 °C a fotoperiodě 16 h světlo/8 h tma. Rostliny byly pěstované v arasystémech v jiffách, při jejichž první hydrataci byl použit roztok s hnojivem Krystalon o koncentraci 1g/l.

Semenáčky určené pro selekci byly pěstovány nejprve na miskách s médiem a po selekci přeneseny jednotlivě na jiffy do arasystému, překryté fólií na několik dní.

Semenáčky pro mikroskopii byly pěstovány in vitro na miskách s médiem ARA min.

In vitro kultivace

Semena byla sterilizována v ependorfce působením 1 ml 50% roztoku SAVA po dobu 10 minut na třepačce. Ve flow boxu byl roztok poté odpipetován a následoval oplach v klávované destilované vodě 4-5x. Semena byla vyseta na misku s ARA min médiem a miska zalepena parafilmem. Semena byla stratifikována v lednici po dobu minimálně 2 dní (2-6) podle potřeby a následně přenesena do in vitro kultivační místnosti s teplotou 23 °C a fotoperiodou 16/8.

Složení použitého média:

…

Křížení

Křížení bylo prováděno pod stereolupou s pomocí pinzety … Použila jsem vždy mladé čerstvě nakvetlé rostliny. Pod lupou jsem odstranila vzrostný vrchol s nejmladšími poupaty a zároveň jsem odstranila starší květy s otevřenými prašníky. Vybraná poupata jsem zbavila kališních a korunních lístků a tyčinek. Pro křížení jsem použila 2 mateřské rostliny markerové linie a 2 mateřské rostliny linie nesoucí požadovanou mutaci. Rostliny s připravenými poupaty jsem přenesla zpět do kultivační místnosti na dobu 2-3 dnů. Poté následovalo opylení zralých otevřených blizen. Použila jsem otevřené květy s prasklými prašnými pouzdry od otcovské rostliny pro danou požadovanou kombinaci markeru s mutací. Rostliny byly opět navráceny do kultivační místnosti, dokud šešule nedozrály.

Seznam připravených/vygenerovaných linií:

…

Selekce

Pro potřeby selekce byly použity rostlinky přibližně týden staré pěstované od nasetí na médiu. Linie byly selektovány pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus Provis AX 70. Vyselektované rostliny byly poté přeneseny na jiffy do arasystému, překryty fólií a dány do kultivačky.

Mikroskopie

Pro mikroskopii byly použity semenáčky 0,75-1,75 dní po vyklíčení pěstované na médiu. Pro pozorování byl využit konfokální mikroskop Zeiss LSM880. Celé semenáčky byly přeneseny z média do kapky destilované vody na podložní sklo a byly jednotlivě překryty krycím sklem. Byl použit objektiv C-Apochromat 63x W … popis excitace a emise, filtry … Snímání probíhalo pomocí softwaru ZEN black… Zen Black (CLSM acquisition, Zeiss)

Pozorována byla adaxiální strana děložních lístků semenáčků. Vždy jsem pořídila pokud možno 2 Z-Stacky na lístek na každou rostlinku.

barvené semenáčky jsem pozorovala na mikroskopu u matese Visiview (vertical SD acquisition, Visitron)

Obrazová analýza

Pro analýzu snímků jsem použila program ImageJ Fiji.

….

Farmakologie

Byl použit Latrunkulin B, koncentrace zásobního roztoku 2,53 mM rozpuštěný v DMSO. Latrunkulin B byl přidán do připraveného rozpuštěného média s výslednou koncentrací 1uM. Médium bylo nalito do kulaté Petriho misky. Po ztuhnutí byla naseta sterilní semena, stratifikována v lednici po dobu 2,5 dní a přenesena do kultivační místnosti. Kontrolní linie byla pěstována na ARA min.

Barvení

FM4-64 barvení …

Oregon green dextran

Oregon Green™ Dextran 488, 10,000 MW, Anionic (Thermo Fisher Scientific, D7170)

1 mg/1 ml stock in miliQ H2O, used 2.5 μg/ml final concentration in ½ MS media

F-STS

F-STS (Thermo Fisher Scientific, F1130)

100 mM stock in miliQ H2O, used 100 μM and 50 μM final concentrations in ½ MS media

Genotypování ???

Statistika