

### Název úlohy:

## VIZUALIZACE AKTINOVÉHO CYTOSKELETU *in vivo*

### Rostlinný materiál:

- BY-2 tabákové buňky stabilně exprimující fimbrin-GFP nebo fimbrin-mCherry;
- pokožkové buňky listů *Nicotiana bentamiana*, transientně transformované v rámci praktika konstruktem FABD2-GFP (fimbrin-GFP)
- *Arabidopsis thaliana* stabilně transformované konstruktem FABD2-GFP

### Princip vizualizace:

V eukaryotických buňkách jsou mikrofilamenta uspořádána do trojrozměrné sítě pomocí celé řady aktin vazebných proteinů (actin binding proteins, ABD). **Fimbrin** náleží k velké rodině proteinů svazkujících aktin; jeho úkolem je tedy sdružovat jednotlivá vlákna aktinu do těsných svazků (Obr. 1). Fimbrin se vyskytuje u živočichů i rostlin. Protein fimbrin je tvořen dvěma aktin-vazebnými doménami (fimbrin-actin binding domains 1 a 2).

Schopnost fimbrinu vázat aktinová vlákna byla využita při detekci těchto struktur v živých buňkách. Sekvence, kódující proteinovou doménu vázající aktin (fimbrin actin-binding domain 2, FABD2) byly fúzovány se sekvencí zeleně fluoreskujícího proteinu (Green fluorescent protein, GFP, viz úloha Endoplazmatické retikulum) a následně exprimovány pod silným promotorem v rostlinných buňkách. Jelikož se protein váže s vysokou afinitou k aktinu, lze díky nim lokalizovat struktury mikrofilament.

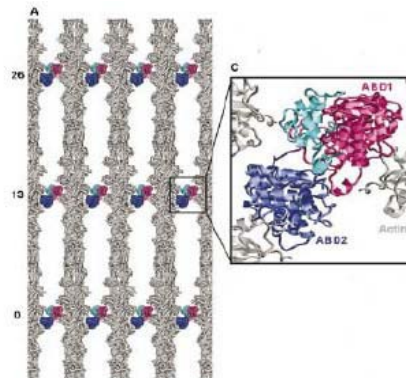
### Postup vizualizace

#### *Stabilně transformované buňky BY-2:*

K pozorování použijte fluorescenční mikroskop nebo konfokální mikroskop.

#### *Tranzientní transformace pokožkových buněk listů *Nicotiana bentamiana*:*

Transformované listy (transformace viz protokol) odstříhnete a udržujete ve vlhkém prostředí. Pozorujte pod fluorescenčním a konfokálním mikroskopem.  $E_{x\max\text{GFP}}$ : 390 – 470 nm,  $E_{m\max\text{GFP}}$ : 509 nm.



**Obrázek 1.** Modelové znázornění fimbrinu svazkujícího aktinová filamenta. Detail vazebné interakce mezi vazebnými doménami fimbrinu (ABD1 a 2) a aktinovými filamenti.

### Úkol:

Pozorujte mikrofilamenta v buňkách exprimujících FABD2-GFP a popište struktury, které vidíte. Lokalizujte struktury do jednotlivých kompartmentů buňky.

Zamyslete se nad klady a zápory použité metody. Je tento způsob zobrazení aktinového cytoskeletu ideální? Jaký postup byste zvolili pro dosažení maximální věrohodnosti detekovaného uspořádání?