

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Vliv oxidativního stresu na fenotyp nadexpresní linie
profilinu 2 u *Arabidopsis***

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: **Kateřina Hlaváčková**

Studijní program: B1406 Biochemie

Studijní obor: Biotechnologie a genové inženýrství

Forma studia: Prezenční

Vedoucí práce: **Mgr. Olga Šamajová, Dr.**

Rok: 2017

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne.....

.....

Kateřina Hlaváčková

Ráda bych poděkovala především své školitelce, Mgr. Olze Šamajové, Dr., za cenné rady, připomínky, pomoc a vstřícnost při vypracování mé bakalářské práce. Zároveň bych chtěla poděkovat i celému oddělení buněčné biologie Centra regionu Haná za ochotu vždy pomoci.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení	Kateřina Hlaváčková
Název práce	Vliv oxidativního stresu na fenotyp nadexpresní linie profilinu 2 u <i>Arabidopsis</i>
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Oddělení buněčné biologie CRH
Vedoucí práce	Mgr. Olga Šamajová, Dr.
Rok obhajoby práce	2017

Abstrakt

Teoretická část bakalářské práce se zabývá rostlinou *Arabidopsis thaliana* jako významným modelovým organismem. Je popsán cytoskelet rostlin, konkrétně mikrotubuly a aktinová mikrofilamenta. V další části jsou charakterizovány aktin- vázající proteiny (ABP), přičemž byl kladen důraz především na profiliny. Profilin je jedním z všudypřítomných zástupců ABP a hraje důležitou roli v dynamice aktinového cytoskeletu. Pozornost je věnována také MAPK signalizaci a vlivu abiotických stresů, konkrétně oxidativního a solného na růst a vývoj rostlin.

Prvním cílem experimentální části bylo sledování dlouhodobého působení solného a oxidativního stresu na viabilitu a růst *A. thaliana* divého typu Col-0, transgenní nadexpresní linie exprimující konstrukt *35S::PRF2:GFP* a transgenní linie stabilně exprimující konstrukt pro cytoplazmatický fúzní protein *35S::pMAT:GFP*.

V druhé části experimentální práce byla histochemickou metodou detekována tvorba volných kyslíkových radikálů (ROS) v nadexpresní linii s konstruktem *35S::PRF2:GFP* po krátkodobém působení oxidativního a solného stresu.

Posledním cílem experimentální části byla *in vivo* lokalizace PRF2-GFP v odpovědi rostlinných buněk na oxidativní stres a inhibitory cytoskeletu. Sledovala se interakce PRF2-GFP s mikrotubuly a aktinovým cytoskeletem za použití konfokálního laserového skenovacího mikroskopu. Pomocí fluorescenčně značeného faloidinu byl vizualizován F-aktin u divého typu Col-0 a transgenní linie exprimující konstrukt *35S::PRF2:GFP*.

Sledovala se orientace F- aktinu v hypokotylových, epidermálních a kořenových buňkách.

Klíčová slova profilin, aktin, cytoskelet, MAPK signalizace, oxidativní stres, solný stres

Počet stran 64

Počet příloh 0

Jazyk Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Kateřina Hlaváčková
Title	Effect of oxidative stress on phenotype of <i>Arabidopsis</i> profilin 2 overexpression line
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of cell biology CRH
Supervisor	Mgr. Olga Šamajová, Dr.
The year of presentation	2017

Abstract

Theoretical part of the bachelor thesis is dealing with *Arabidopsis thaliana* as an important model organism. The plant cytoskeleton is also introduced, mainly microtubules, actin microfilaments and actin-binding proteins (ABPs) where the emphasis is put on profilin. Profilin is an ubiquitous representative of ABPs and plays an important role in the dynamics of actin cytoskeleton. Last part is devoted to MAPK signalling and effects of various abiotic stresses, such as oxidative and salt stress, on plant growth and development.

The first goal of the experimental part of this work was to observe the long-term effect of salt and oxidative stress on *A.thaliana* growth and viability. Different lines of *A. thaliana*- wild type Col-0, transgenic line overexpressing *35S::PRF2:GFP* construct and transgenic line stably expressing cytoplasmic fusion protein *35S::pMAT:GFP* construct were used in experiments.

Production of reactive oxygen species (ROS) in transgenic line overexpressing *35S::PRF2:GFP* construct after short-term salt and oxidative stresses was examined by histochemical staining.

Another goal was to monitor *in vivo* effect of oxidative stress and cytoskeletal inhibitors on cells of transgenic line carrying PRF2-GFP by using confocal laser scanning microscopy. An interaction between PRF2-GFP, actin cytoskeleton and microtubules

was observed. This part includes visualization of F-actin in transgenic line overexpressing *35S::PRF2:GFP* construct and Col-0 using fluorescently tagged phalloidin. Orientation of F-actin was observed in hypocotyl, root and epidermal cells.

Keywords	profilin, actin, cytoskeleton, MAPK signaling, oxidative stress, salt stress
Number of pages	64
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1	Úvod	11
2	Současný stav řešené problematiky	12
2.1	<i>Arabidopsis thaliana</i> - Huseníček rolní	12
2.2	Rostlinný cytoskelet	12
2.2.1	Mikrotubuly	13
2.2.2	Aktinová mikrofilamenta	14
2.3	Proteiny vázající aktin.....	18
2.3.1	Profilin	20
2.4	Mitogen- aktivované protein kinasy.....	24
2.5	Abiotický stres	26
2.5.1	Solný stres	27
2.5.2	Oxidativní stres	28
3	Materiál a metody	30
3.1	Materiál	30
3.1.1	Rostlinný materiál	30
3.1.2	Chemikálie	30
3.1.3	Roztoky a média.....	31
3.1.4	Přístroje	34
3.1.5	Software	34
3.2	Metody	34
3.2.1	Příprava médií pro kultivaci rostlin <i>in vitro</i>	34
3.2.2	Optimalizace podmínek kultivace rostlin ve stresových podmínkách <i>in vitro</i>	35
3.2.3	Histochemická detekce distribuce ROS v nadexpresní linii PRF2-GFP .	36
3.2.4	<i>In vivo</i> lokalizace PRF2- GFP v odpovědi rostlinných buněk na oxidativní stres a inhibitory cytoskeletu.....	37
3.2.4.1	Vizualizace F- aktinu u nadexpresní linie PRF2- GFP	38
4	Výsledky.....	39
4.1	Optimalizace podmínek kultivace rostlin ve stresových podmínkách <i>in vitro</i> ...	39
4.1.1	Působení solného a oxidativního stresu na růst a viabilitu rostlin	39
4.2	Histochemická detekce produkce ROS u nadexpresní linie PRF2-GFP..	42
4.3	Vliv oxidativního stresu a inhibitorů cytoskeletu na <i>in vivo</i> lokalizaci fúzního proteinu PRF2- GFP u transgenní linie PRF2-GFP	45
4.3.1	Vliv oxidativního stresu na intenzitu fluorescence fúzního proteinu PRF2- GFP u transgenní linie PRF2-GFP	45

4.3.2	Vliv inhibitorů cytoskeletu na intenzitu fluorescence fúzního proteinu PRF2- GFP u transgenní linie PRF2-GFP	46
4.3.3	Vizualizace F-aktinu v buňkách transgenní linie PRF2-GFP	49
5	Diskuze	54
6	Závěr	56
7	Literatura	57
8	Seznam použitých zkratek	63

CÍLE PRÁCE

Teoretická část

1. Zpracování literární rešerše na téma cytoskelet a MAPK signaling v odpovědi rostlinných buněk na oxidativní stres.

Experimentální část

1. Optimalizace podmínek kultivace rostlin v stresových podmínkách *in vitro*.
2. Histochemická detekce produkce ROS v nadexpresní linii PRF2- GFP v podmínkách oxidativního stresu.
3. *In vivo* lokalizace PRF2- GFP v odpovědi rostlinných buněk na oxidativní stres a inhibitory cytoskeletu.

1 ÚVOD

Rostliny, které jsou svým kořenovým systémem ukotvené v půdě, skalách nebo bažinách, se nejsou schopny samy vyhnout nepříznivým podmínkám životního prostředí. Jejich přežití spočívá v rychlé adaptaci, která vyžaduje zapojení soustavy propojených mechanismů zabezpečujících vnímání signálů, jejich přenos, odpovědi a přizpůsobování se stresům (Smékalová *et al.*, 2014). Signalizační dráhy mitogen-aktivovaných protein kinas (MAPK) jsou propojené multienzymatické komplexy, přítomné u všech eukaryot. MAPK hrají u rostlin důležitou úlohu při adaptačních procesech a jsou zahrnuty v odpovědi na hormony, biotický a abiotický stres (Colcombet a Hirt, 2008; Rodriguez *et al.*, 2010; Liu, 2012; Sinha *et al.*, 2011; Šamajová *et al.*, 2013a). MAPK se také podílejí na regulaci buněčného dělení, růstu, diferenciaci nebo programované buněčné smrti (Franklin-Tong a Gourelay, 2008; Beck *et al.*, 2011; Müller *et al.*, 2010; Sasabe a Machida, 2012; Šamaj *et al.*, 2004; Šamajová *et al.*, 2013b). Aktinový cytoskelet je tvořen sítí jednotlivých vláken aktinu a tzv. aktinových svazků (Henty-Ridilla *et al.*, 2013). Je schopen se přetvářet a poměrně rychle odpovídat na biotické a abiotické podněty (Li *et al.*, 2014; Henty-Ridilla *et al.*, 2013). Profilin je malý, aktin-vázající protein (ABP) o molekulové hmotnosti 12- 15 kDa (Fan *et al.*, 2013). Profilin je důležitý pro dynamiku aktinu a spolu s jinými ABPs reguluje rovnováhu mezi globulárním aktinem (G- aktin) a filamentárním aktinem (F- aktin) a interakce mezi samotnými aktinovými filamenty (Fan *et al.*, 2013; Valenta *et al.*, 1993). U *A. thaliana* existuje celkem pět isoform profilinu, které se rozdělují do dvou tříd- generativní a vegetativní (Wang *et al.*, 2009; Fan *et al.*, 2013). Profiliny se účastní také interakce aktinového cytoskeletu s plasmatickou membránou, vezikulárního transportu nebo lokalizace organel (Sun *et al.*, 2013). Profiliny mají u *A. thaliana* vliv na prodlužování buněk, udržování architektury buněk a kvetení (Ramachandran *et al.*, 2000).

Jedním z cílů experimentální části bylo sledování vlivu dlouhodobého působení solného a oxidativního stresu na viabilitu a růst rostlin transgenní nadexpresní linie exprimující konstrukt *35S:PRF2:GFP* (PRF2- GFP).

Pomocí histochemické metody se sledovala distribuce ROS ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2) po krátkodobém působení solného a oxidativního stresu u transgenní linie exprimující PRF2-GFP.

Posledním cílem experimentální části bylo *in vivo* pozorování fúzního proteinu PRF2-GFP v odpovědi rostlinných buněk *A. thaliana* na oxidativní stres a inhibitory cytoskeletu. V této experimentální části bylo provedeno i barvení F- aktinu u rostlin divého typu Col-0 a transgenní linie exprimující PRF2-GFP. Sledovala se orientace F- aktinu v hypokotylových, epidermálních a kořenových buňkách.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 *Arabidopsis thaliana*- Huseníček rolní

A. thaliana je malá kvetoucí rostlina patřící do čeledi *Brassicaceae* s širokým rozšířením ve všech oblastech Evropy, Asie a Severní Ameriky (Meinke *et al.*, 1998).

A. thaliana patří mezi nejdůležitější modelové organismy v rostlinné biologii. Jeho uplatnění je především v oblasti molekulární biologie a genetiky. Ze všech známých druhů kvetoucích rostlin patří *A. thaliana* mezi nejpodrobněji prostudované. Mezi nejdůležitější znaky, kterými disponuje a které ho činí vhodným modelovým organismem v mnoha oblastech výzkumu, patří krátká generační doba, malá velikost, předvídatelná mutageneze, malý genom a efektivní reprodukce zajištěna samoopylením (Koornneef a Meinke, 2010). Výhodnou vlastností všech modelových organismů je krátký životní cyklus, ten je u *A. thaliana* včetně klíčení semen, vytvoření růžice, vybílání hlavního stonku a zrání prvních semen dokončen za 6 týdnů (Meinke *et al.*, 1998).

A. thaliana je jako modelový organismus důležitý také pro identifikaci genů a určení jejich funkce. U *A. thaliana* došlo v průběhu vývoje k duplikaci celého genomu, následně ke ztrátám genů a zároveň k rozsáhlým lokálním duplikacím. Analýzou genové sekvence bylo zjištěno, že genom *A. thaliana* je velký 125 Mb a obsahuje 25 498 genů, kódujících proteiny až z 11 000 různých rodin (*Arabidopsis Genome Initiative*, 2000).

2.2 Rostlinný cytoskelet

Cytoskelet eukaryot vytváří propojenou síť vláknitých polymerů a regulačních proteinů, zajišťujících schopnost eukaryotických buněk odolávat deformacím, transportovat mezibuněčný náklad a měnit během pohybu tvar buňky (Fletcher a Mullins, 2010). Rostlinné buňky se projevují jednotnou stavbou, vyžadující strukturně a funkčně jedinečný cytoskelet a specifické kontrolní mechanismy (Kost a Chua, 2002).

Cytoskelet se vyznačuje určitými klíčovými znaky. Cytoskeletální systémy jsou velmi dynamické, což umožňuje rychlou adaptivní organizaci, přičemž je stále zachováno dobré uspořádání systému.(Huber *et al.*, 2013).

Mezi funkce cytoskeletu patří především prostorová organizace obsahu buňky, propojení buňky s extracelulárním prostředím, intracelulární transport, pohyb buňky, udržování jejího tvaru, polární růst kořenových vlásků a pylóvé láčky (Fletcher a Mullins, 2010; Staiger a Lloyd, 1991). Mimo jiné i správný průběh mitózy a meiózy je závislý na cytoskeletu (Staiger a Lloyd, 1991).

Mezi základní typy cytoskeletálních polymerů se řadí mikrotubuly a aktinová filamenta, která kontrolují tvar, zabezpečují vnitrobuněčný transport a účastní se dělení eukaryotických buněk. Všechny tyto typy polymerů jsou uspořádány do sítí, které odolávají deformaci a v důsledku působení vnějších vlivů mohou měnit svou organizaci (Fletcher a Mullins, 2010). Pro rostlinný cytoskelet je důležitá přítomnost motorových proteinů, jejichž úlohou je transport buněčných organel a molekul (Kost a Chua., 2002). Mezi nejdůležitější rozdíly hlavních typů cytoskeletálních polymerů patří mechanická tuhost, dynamika jejich seskupování, polarita a motorové proteiny, se kterými asociují (Fletcher a Mullins, 2010).

2.2.1 Mikrotubuly

Mikrotubuly (MT), patřící mezi cytoskeletální proteinové polymery, jsou duté tuhé trubice s průměrem přibližně 25 nm a jsou složeny z 13 protofilamentů (Burbank a Mitchison, 2006; Hashimoto, 2015).

Mikrotubuly jsou tvořeny polymerizací podjednotek skládajících se z heterodimerů $\alpha\beta$ -tubulinu (Burbank a Mitchison, 2006). Mikrotubuly se vyznačují také vlastností, nazvanou strukturní polarita. Heterodimery α - a β -tubulinu se na sebe skládají vždy pravidelně, a to α -tubulin s β -tubulinem a obráceně. Stejně typy tubulinu se na sebe nikdy nenavazují. Důsledkem tohoto skládání je, že MT obsahuje (+) a (-) konec, přičemž β -tubulin se nachází na (+) konci MT, zatímco α -tubulin je přítomen na (-) konci MT (Nogales *et al.*, 1999; Wade, 2009).

Během interfáze slouží mikrotubuly jako dráha, na které jsou organely a jádro umístěny pomocí motorových proteinů. Během mitózy vytvářejí mikrotubuly strukturu mitotického vřeténka, které fyzicky rozděljuje chromosomy pro dvě dceřiné buňky (Burbank a Mitchison, 2006). Mikrotubuly rostou elongací tubulinových listů, které

se později uzavírají a vytvářejí cylindrickou stěnu, zatímco jejich depolymerizace nastává svinutím jednotlivých protofilamentů a podélným uvolňováním svinutých oligomerů o poloměru 18-20 nm (Müller-Reichert *et al.*, 1998).

Mikrotubuly jsou typické tím, že mají nejsložitější dynamiku a mohou náhodně přepínat mezi dvěma stavy- stálým růstem a rychlým zmenšováním (Fletcher a Mullins, 2010). V jakýkoliv okamžik jedna skupina mikrotubulů rapidně roste, zatímco jiná se rychle zmenšuje (Burbank a Mitchison, 2006). Tato zajímavá vlastnost a kombinace růstu, zmenšování se a rychlých změn je známá jako dynamická nestabilita (Burbank a Mitchison, 2006). Energie, která tento nerovnovážný stav řídí, pochází z hydrolyzy guanosintrifosfátu (GTP) a je vyžadována k narušení mřížky mikrotubulů. GTP navázaný na β -tubulin je hydrolyzován na guanosindifosfát (GDP) během- nebo krátce po shromáždění mikrotubulů (Müller- Reichert *et al.*, 1998).

Ve vyšších rostlinách se nachází celá škála proteinů asociovaných s MT (MAP- microtubule- associated- proteins), (Hamada, 2007). U *A. thaliana* je známých několik MAP, zmínit lze například MAP65- 1, MAP65- 2, MAP65- 3 nebo MAP65-8 (Krtková *et al.*, 2016). Polymerizace MT začíná z γ - tubulinového komplexu (γ TuC- γ -tubulin complex), který je součástí nukleace MT. MAP200/MOR1 společně s kataninem regulují délku MT tím, že aktivují jejich dynamickou nestabilitu. Proteiny z rodiny MAP65 a některé kinesinové proteiny hrají důležitou roli ve svazování MT. Na (+) konec MT se váží proteiny (+TIPs), které jsou zahrnuty v intracelulárním transportu a účastní se vazby MT k jiným buněčným strukturám, jako jsou kinetochor, cytoplazmatická membrána a Golgiho aparátu (GA), (Hamada, 2007).

2.2.2 Aktinová mikrofilamenta

Aktin je globulární, nukleotid- vázající protein, jehož hmotnost činí přibližně 42 kDa a řadí se mezi hlavní cytoskeletální proteiny (Staiger a Blanchoin, 2006; Li *et al.*, 2014). F- aktin se skládá z podjednotek G- aktinu. Podjednotky G- aktinu jsou stočeny do dvouvláknové šroubovice a vytvářejí helikální strukturu. G- aktin je vysoce konzervovaný protein, obsahující dva hlavní laloky. Ty jsou oddělené rýhou, obsahující nukleotid-vázající místo a místo pro vazbu dvouvalentního kationtu (Li *et al.*, 2014).

Aktinový cytoskelet je tvořen sítí jednotlivých vláken aktinu a výše uspořádaných struktur tzv. aktinových svazků (Henty- Ridilla *et al.*, 2013). Je schopen se přetvářet a poměrně rychle odpovídat na biotické a abiotické podněty, například během přirozené

obranné reakce proti patogenům (Li *et al.*, 2014; Henty- Ridilla *et al.*, 2013). Obecně je známa účast aktinového cytoskeletu při buněčném růstu, polarizaci, morfogenezi, cytokinezi, transportu vezikul nebo biogenezi organel (Higaki *et al.*, 2007). Aktinové svazky jsou spojovány podélně k buněčné ose, zatímco jednotlivá aktinová mikrofilamenta (AF) jsou náhodně rozptýlena v kortikální cytoplasmě. AF vykazují oproti aktinovým svazkům nižší fluorescenční aktivitu, větší dynamiku a kratší dobu existence (Henty- Ridilla *et al.*, 2013). Rostlinné buňky využívají aktinová filamenta jako určité dráhy pro transport na dlouhé vzdálenosti. Aktinové svazky zároveň zajišťují pohyb organel a pomáhají v buňkách umisťovat kompartmenty vázané na membránu. Podle nedávných studií se aktinová vlákna účastní transportu sekretorických vezikul a elementů buněčné stěny na plasmatickou membránu. Jsou zahrnuta také do obnovy membrán a integrálních membránových proteinů během endocytózy. Aktin má tedy stěžejní úlohu v zakládání polarity, buněčné morfogenezi a sestavování buněčné stěny (Li *et al.*, 2014).

U rostlin vznikají nová AF třemi způsoby: *de novo* v cytoplasmě, mohou být iniciována ze strany jiných aktinových vláken a svazků nebo z konce pre-existujícího AF či fragmentu (Staiger *et al.*, 2010). Obvykle převládá nukleace ze strany již vznikajícího vlákna (Henty- Ridilla *et al.*, 2013). AF jsou zapojena do řady buněčných procesů včetně proudění cytoplasmy, lokalizace jádra a buněčného dělení (Valster *et al.*, 1997; Staiger a Blanchoin, 2006).

Aktinová vlákna disponují vlastní polaritou, kterou jim udělují asymetrické podjednotky AF a rozdíly nukleotidů v monomerech orientovaných podél vláken. Monomery obsahující adenosintrifosfát (ATP) se přidávají na rychle rostoucí (+) konec AF, zatímco monomery obsahující adenosindifosfát (ADP) se ztratí nebo dojde k jejich rozložení na pomalu rostoucím (-) konci. Po připojení podjednotky k (+) konci nastává hydrolýza za vzniku ADP a fosfátu. Fosfát je po určité době z aktinu uvolněn a ADP- vázající aktin obsahuje starší oblasti aktinového vlákna. (Li *et al.*, 2014).

Rostliny kódují nejméně dvě rozdílné skupiny aktinu- vegetativní a reprodukční, přičemž každá skupina produkuje několik isovariant aktinu. Vegetativní skupina obsahuje dvě další podskupiny genů, nacházející se téměř ve všech vegetativních orgánech. První podskupina je tvořena dvěma isotypy ACT2 a ACT8. Druhá podskupina, je jednočlenná a patří do ní ACT7. Pod reprodukční skupinu patří tři podskupiny genů a všechny jsou orientovány především do zralého pylu a rostoucích pylových láček. Jedna podskupina je jednočlenná a zahrnuje ACT11 Dvě podskupiny

jsou dvoučlenné a obsahují příbuzné isovarianty aktinu ACT1/ACT3 a ACT4/ACT12 (Tab. 1), (Kandasamy *et al.*, 2002a).

V kortikální cytoplasmě epidermálních buněk u *Arabidopsis* dochází ke komplexnímu a konstantnímu sestavování a rozkládání svazků mikrofilament. Rychlost tohoto pohybu patří mezi nejrychleji zaznamenané v eukaryotických buňkách. Sestavování vláken na (+) konci mikrofilament probíhá rychlostí $\sim 2 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ a tento jev bývá označován jako stochastická dynamika (Henty- Ridilla *et al.*, 2013).

Polymerizace aktinu je indukována přidáním solí do roztoku G- aktinu za vzniku F- aktinových mikrofilament. Polymerizace aktinu se dá rozdělit do tří postupných fází. První fáze bývá označována jako *lag fáze*. Během této fáze dochází ke shlukování G- aktinu do malých, nestabilních oligomerů. Jakmile oligomer dosáhne určité délky, chová se jako stabilní jádro, které se ve druhé fázi rychle prodlužuje přidáním monomerů aktinu na oba jeho konce a vytváří vlákno. Při růstu F- aktinu se koncentrace G- aktinu snižuje, dokud nedosáhne rovnováhy s vláknem. Třetí fáze bývá označována jako *steady state* a dochází v ní k výměně G- aktinu na konci vláken (Lodish *et al.*, 2003). Aktin vázající proteiny využívají v přítomnosti ATP vlastností aktinu, kterými disponuje ve *steady state* fázi. Tím dochází ke kontrole poměru F- aktin/ G- aktin a vzniku AF. Capping proteiny a profilin, které patří mezi ABP, usměrňují velikost F- aktinu a ještě nesestavených vláken ovlivňováním *steady state* koncentrace ATP- G- aktinu (Carlier a Pantaloni, 1997).

Tab. 1 Isovarianty aktinu rozdělené do vegetativní a reproduktivní třídy

Třída	Podskupina	Isovarianta aktinu
Vegetativní	1	ACT2 a ACT8
	2	ACT7
Reproduktivní	3	ACT11
	4	ACT1 a ACT3
	5	ACT4 a ACT12

Koncentraci monomerů aktinu, které jsou v rovnováze s aktinovými filamenti, vyjadřuje tzv. kritická koncentrace (C_c). Kritická koncentrace určuje schopnost roztoku G-aktinu polymerizovat mikrofilamenta. Za normálních *in vitro* podmínek je hodnota kritické koncentrace pro G- aktin 0,1 μM . Pokud je koncentrace G- aktinu větší než hodnota C_c , dochází k růstu filament. V případě, že je koncentrace G- aktinu nižší, dochází k depolymerizaci vláken (Lodish *et al.*, 2003).

Další vlastností aktinu, důležitou pro jeho rovnováhu *in vitro*, je tzv. „treadmilling“, podle kterého je růst na (+) konci AF vyvažován zkracováním aktinového vlákna na (-) konci (Li *et al.*, 2014). K dosažení této funkce kontrolují dynamiku aktinu nezávisle na sobě dva proteiny- aktin depolymerizující faktor (ADF-actin depolymerizing factor) a zakrývající proteiny (capping proteins- CP), (Pantaloni *et al.*, 2001). Podle určitých zdrojů vykazují aktinová filamenta „treadmilling“ především v živých buňkách (Li *et al.*, 2014).

Podle nedávných studií hrají aktinová filamenta významnou roli při vzniku buněčné přepážky a zároveň poskytují mechanickou oporu cytoplasmatickým vláknům v interfázních buňkách (Li *et al.*, 2015). Aktinová filamenta jsou rozmístěna napříč celým fragmoplastem a uspořádána paralelně k mikrotubulům. AF se mohou na vzniku buněčné přepážky podílet jejich spoluprací s myosinovými motory při transportu Golgiho vezikul. Tyto vezikuly obsahují prekursory buněčné stěny, umístěné na okraji vznikající buněčné přepážky a AF jsou potom svým (+) koncem lokalizována v její blízkosti (Valster *et al.*, 1997, Li *et al.*, 2015).

S aktinem jsou spojeny i inhibitory ovlivňující jeho aktivitu. Po krátkém působení latrunkulinu B (latB) v nízkých koncentracích na epidermální buňky hypokotylu došlo ke změnám dynamiky jednotlivých aktinových vláken. Vazbou na G- aktin inhibuje latB přidávání monomeru na konce vláken (Henty- Ridilla *et al.*, 2013). Dalším inhibitorem aktinu je 2, 3- butandion monoxim (BDM). BDM se řadí mezi inhibitory myosinu II v savčích buňkách, ale ovlivňuje také některé procesy v rostlinách a má výrazný účinek především na přestavbu aktinu. Prieurianin (Pri) je limonoidní sloučenina, která byla původně identifikována jako inhibitor endomembránového transportu. Pri stabilizuje AF jak v rostlinách, tak v savčích buňkách (Henty- Ridilla *et al.*, 2013). Jasplakinolid (Jas) vyvolává polymerizaci aktinu a stabilizuje AF (Sánchez- López *et al.*, 2013).

2.3 Proteiny vázající aktin

V mnoha buněčných procesech mají důležitou úlohu zejména aktinová filamenta. Dynamiku aktinu regulují přídavné proteiny, označované jako aktin- vázající proteiny (ABPs, actin-binding proteins), (Staiger a Blanchoin, 2006). Je známo nejméně 75 rostlinných ABPs (Porter a Day, 2016). ABPs se vyznačují neobvyklými vlastnostmi a jde o komplexní a multidoménné proteiny disponující jednou či více funkcemi (Staiger a Blanchoin, 2006; Li *et al.*, 2014). ABPs se mohou vázat buď na G- nebo F-aktin, případně na oba typy aktinu (Li *et al.*, 2014). Mezi nejznámější ABPs patří především profilin, forminy, cofilin, krycí proteiny (CP), ADF, nebo například aktin- asociované proteiny 2/3 (ARP 2/3), (Porter a Day, 2016).

Monomer- vázající proteiny (např. profilin, ADF a cyklasa- asociovaný protein CAP) regulují velikost a aktivitu podjednotky vazbou na monomer (Li *et al.*, 2014). Profilin byl prvním objeveným ABPs v pylu krytosemenných rostlin a později bylo zjištěno, že patří mezi alergeny pocházející z břízy. Rostlinný CAP nabývá i v jiných organismech několik funkcí, spojených především s profilinem. Ačkoli na rostliny disponuje jedinečným molekulárním mechanismem, řadí se mezi klíčové regulátory aktinové dynamiky (Staiger *et al.*, 2010). Nukleační faktory (např. ARP2/3 komplex, forminy) vytvářejí zdroje pro vznik vláken, a to buď z monomeru nebo komplexu aktin - profilin, čímž dochází k tzv. *de novo* nukleaci AF (Li *et al.*, 2014; Hussey *et al.*, 2002). Mezi nejlépe popsané rostlinné forminy patří FORMIN1, který vytváří nová dceřiná vlákna svazkováním aktinu ze strany již existujících svazků (Staiger *et al.*, 2010). Nukleační faktor aktinu u *A. thaliana*, který je zodpovědný za tvorbu podélných aktinových vláken v pylových láčkách, se nazývá formin3 (AFH3). AFH3 se skládá z FH1 a FH2 domény. *In vitro* analýza prokázala, že AFH3 FH1FH2 domény interagují s (+) koncem AF a v přítomnosti G- aktinu nebo G aktin- profilinu vykazují aktin nukleační aktivitu. Navíc bylo zjištěno, že nadexprese AFH3 zvyšuje tvorbu AF v pylových láčkách (Ye *et al.*, 2009). Stříhající proteiny (severing proteins, např. ADF/cofilin, villin, některé forminy) zkracují AF, čímž vytváří zlomy a produkují nové konce vedoucí ke vzniku nebo rozložení vláken. Zakrývající proteiny (capping proteins, např. villin) se váží s vysokou afinitou na (+) konec AF a řídí ztrátu nebo přidání další podjednotky. Pomocí postranních proteinů (side-binding proteins) jsou AF chráněna před jejich rozložením. Síťující a svazkující proteiny (cross-linking and bundling proteins, např. villin, fimbrin- FIM a některé forminy) vytvářejí výše organizované struktury,

jakými jsou sítě a svazky (Li *et al.*, 2014). Tyto proteiny jsou důležité pro jejich tvorbu a stabilizaci (Staiger *et al.*, 2010). U *A. thaliana* jsou v pylu nejvíce zastoupené především FIM3, FIM4 a FIM5, přičemž FIM4 a FIM5 patří mezi nejčastěji se vyskytující (Pina *et al.*, 2005). Spectrin, band 4.1, ankyrin a adducin jsou dalšími zástupci ABPs zajišťující membránové interakce (Hussey *et al.*, 2002).

Cílem Hussey *et al.* (2002) bylo najít homology nejstudovanějších ABPs v genomové databázi *Arabidopsis*. Z celkem 67 analyzovaných ABPs nevykazovalo v genomové databázi žádnou bližší homologii 37 z nich. V této databázi se nenacházejí žádné proteiny, které by byly podobné proteinům důležitých při fokálních adhezích (vinculin, talin, paxillin, integrin). Nacházejí se zde proteiny zodpovědné především za vznik a rozkládání aktinu. Mezi tyto proteiny patří ADF a profilin. Přítomny jsou i forminy, které se svou činností zapojují do regulace profilinu. V databázi se vyskytuje i velká genová rodina villinu, ve které se ale mezi jejími členy nevyskytují žádné výrazné odlišnosti, jako je tomu například u gelsolinu a villinu v živočišných buňkách. Pozoruhodné je, že se zde nachází proteiny komplexu ARP2 a ARP3, které jsou potřebné pro *de novo* vznik aktinových filament, ale nevyskytuje se tam homolog WASP. Jako malá skupina genů je zde přítomný fimbrin. Fimbrin je identifikován jako humánní homolog, avšak nenachází se zde jasný homolog spektrinu. V interakcích plasmatické membrány a aktinového cytoskeletu je zahrnutý band 4.1, jehož homolog se zde nachází. Naopak ankyrin a adducin přítomny nejsou (Hussey *et al.*, 2002).

Myosiny se jako mechanochemické enzymy vyznačují konzervovanou hlavovou motorovou doménou, která zajišťuje vazbu na aktin i ATPasovou aktivitu (Li *et al.*, 2014). Z evolučního hlediska lze rostlinné myosiny v super rodině eukaryotních myosinů rozdělit na třídu VIII a třídu XI (Sparkes, 2011). Vzájemné klouzáni AF a klouzáni AF na membráně je zprostředkováno myosinovými molekulárními motory těchto dvou tříd (Henty- Ridilla *et al.*, 2013). V ocasové oblasti disponují myosiny náklad- vázající doménou, která zajišťuje transport organel a vezikul podél aktinových vláken (Li *et al.*, 2014).

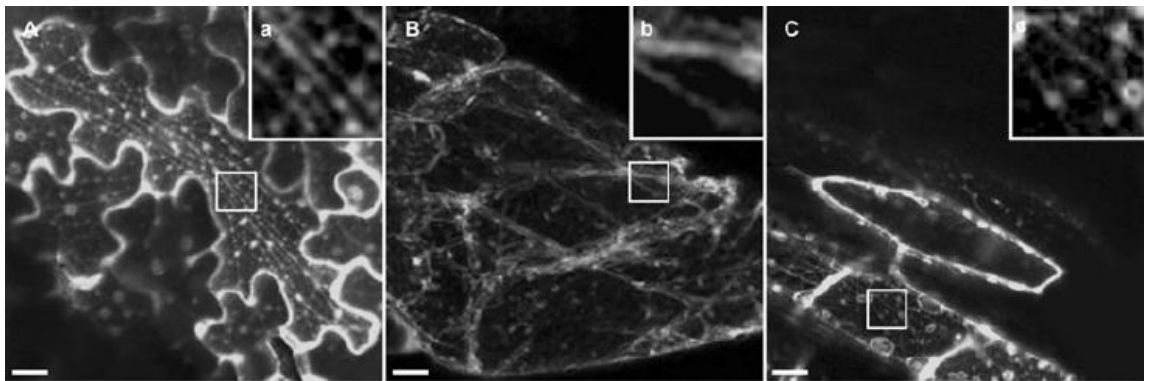
2.3.1 Profilin

Profilin je všudypřítomný, aktin vázající protein, vyskytující se ve všech eukaryotech od hub až po zvířata. Molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí 12- 15 kDa (Fan *et al.*, 2013). Profilin se řadí mezi hlavní ABPs. Jako ABPs se profilin nachází u jednoděložných i dvouděložných krytosemenných rostlin. Důležitou aktin- vázající doménou je u rostlinných profilinů COOH terminální část (Valenta *et al.*, 1993). Profilin se také vzájemně ovlivňuje s poly- L- prolinem (PLP) a fosfoinositidy, přičemž je jeho významnou úlohou regulovat polymerizaci aktinu (Jockush *et al.*, 2007).

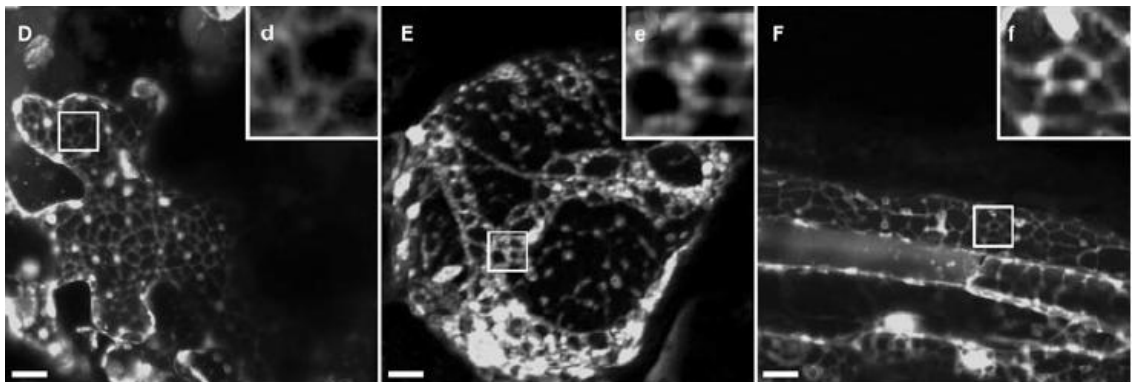
Profilin je důležitý pro dynamiku aktinu a spolu s jinými ABPs reguluje rovnováhu mezi G- aktinem a F- aktinem, stejně jako interakce mezi samotnými AF (Valenta *et al.*, 1993, Fan *et al.*, 2013). Profilin interaguje s aktinem za tvorby profilin- aktinového komplexu, který zachovává jeho monomerní podobu v buňce. Vazbou na polyfosfoinositidy dochází k regulaci vzájemného působení profilinu s aktinem (Valenta *et al.*, 1993). Profilin se může vázat i na molekuly jako fosfatidylinositol 4,5- bisfosfát (PIP2), annexiny, forminy nebo Arp 2/3 (Fan *et al.*, 2013).

U *A. thaliana* existuje celkem pět isoform profilinu (Wang *et al.*, 2009). Isoformy PRF1, PRF2 a PRF3 patří do vegetativní třídy, zatímco PRF4 a PRF5 se řadí do třídy generativní (Fan *et al.*, 2013). V mladých listech je nejvíce zastoupen PRF2, o něco méně PRF1, přičemž PRF3 je zastoupen jen zřídka (Müssar *et al.*, 2015). Vegetativní třída vykazuje vyšší afinitu k PLP, sekvestruje větší množství G- aktinu a v živých buňkách narušuje cytoplasmatickou stavbu aktinu (Fan *et al.*, 2013). Isoformy PRF1 a PRF2 vykazují rozdíly v různých oblastech. PRF1 je zapojený do prodlužování buněk, udržování tvaru buňky, ale také má důležitou úlohu při signalingu uvnitř buňky a při buněčné stavbě. Fúzaný konstrukt GFP-PRF1 má vyšší afinitu k PLP i G- aktinu než konstrukt GFP-PRF2. Při lokalizačních studiích těchto isoform v epidermálních buňkách listu, trichomech a kmenových buňkách epidermis se GFP-PRF1 projevoval vláknitou strukturou (Obr. 1), a proto je možná jeho asociace s aktinovými filamenti. Naopak GFP-PRF2 tvořil polygonální síť (Obr. 2), čímž připomínal strukturu endoplasmatického retikula. Tyto výsledky prokazují, PRF1 a PRF2 jsou pravděpodobně funkčně odlišnými isovariantami profilinu (Wang *et al.*, 2009). Nadexprese PRF3 se oproti divému typu projevuje změnami ve fenotypu, konkrétně v kratších kořenech a hypokotylech. Mimo jiné dochází touto nadexpresí i k novému

uspořádání F- aktinu. PRF3 je přítomný ve všech vegetativních pletivech *A. thaliana* (Fan *et al.*, 2013). Kandasamy *et al.* (2002b) zkoumali použitím monoklonálních protilátek vůči profilinu tkáňově specifickou expresi různých isovariant profilinu. Isoformy PRF1, PRF2 a PRF3 jsou exprimovány téměř ve všech orgánech rostlinného těla včetně vajíčka v různých stádiích vývoje a také v mikrosporách v brzkém stádiu mikrosporogeneze (Kandasamy *et al.*, 2002b). Exprese PRF4 a PRF5 je přítomna především ve zralém pylu (Müssar *et al.*, 2015).



Obr. 2 Filamentární uspořádání GFP- PRF1 v epidermálních buňkách (A), trichomech (B) a kmenových buňkách epidermis (C) *A. thaliana*, (Wang *et al.*, 2009).



Obr. 1 Polygonální síť tvořená GFP- PRF2 v epidermálních buňkách (D), trichomech (E) a kmenových buňkách epidermis (F) *A. thaliana*, (Wang *et al.*, 2009).

Během vývoje samčího gametofytu dochází ke změně v expresi jednotlivých isovariant z vegetativní na reproduktivní třídu. Naopak během vývoje samičího gametofytu zůstává vegetativní třída po celou dobu hlavní složkou. Imunocytochemické studium vegetativních a reproduktivních buněk *Arabidopsis* ukázalo, že isoformy profilinu jsou hojně zastoupeny a poměrně rovnoměrně rozptýleny v cytoplasmě a jaderné membráně (Kandasamy *et al.*, 2002b).

V eukaryotických buňkách je profilin schopen sekvestrovat monomery aktinu a tím kontrolovat jeho polymerizaci (Valenta *et al.*, 1993). Schopnost profilinu vázat se na aktin je nezbytná pro růst rostlinného vrcholu. Růst vrcholu je složitý proces, který řídí řadu buněčných procesů. Předpokládá se jeho závislost na prodlužování buněčné stěny a turgorem řízené buněčné expanzi. Pro správnou organizaci F- aktinu jsou také důležité interakce profilinu s aktinem a PLP. Profilin pro svou aktivitu potřebuje aktin vázající místo a pro polymerizaci růstu je nutné poly-L-prolin vázající místo na profilinu (Vidali *et al.*, 2007). Profilin reguluje interakce mezi aktinovým cytoskeletem a plasmatickou membránou. Tyto interakce zprostředkovává PIP₂, který se nachází na vnitřní straně plasmatické membrány. Důležitou úlohou profilinu je také transport vezikul a umístění organel. Profiliny jsou známé pro svůj význam při endocytóze a membránovém transportu (Sun *et al.*, 2013).

Podle Ramachandran *et al.* (2000) je pro elongaci buněk rozhodující míra exprese profilinu. Snížením exprese profilinu v transgenních rostlinách o 50 % došlo k poruchám elongace. U rostlin nadexprimujících PRF1 byly naopak kořeny a kořenové vlásky viditelně delší (Ramachandran *et al.*, 2000). Profiliny u *A. thaliana* ovlivňují také zachování tvaru buněk. Ke zvětšení epidermálních, kortikálních a endodermálních buněk došlo v důsledku snížení exprese profilinu. Jiné epidermální buňky byly na pokraji rozpadu, způsobeného oslabením struktury buněčné stěny. Snížení úrovně profilinu v buňkách vedlo ke zkrácení doby kvetení. To potvrzuje skutečnost, že divý typ i rostliny nadexprimující profilin kvetly později, než rostliny se sníženou expresí profilinu (Ramachandran *et al.*, 2000).

U *A. thaliana* byl charakterizován profilinový mutant *prf1-1* s T-DNA inzercí v oblasti promotoru PRF1 před počátečním místem transkripce (McKinney *et al.*, 2001). McKinney *et al.* (2001) zjistili, že u mutantu *prf1-1* došlo oproti divému typu k několika defektům, projevujících se opožděným klíčením a opožděným vývojem kotyledonů i pravých listů. Mutant *prf1-1* vykazoval oproti divému typu delší kotyledony i kořenové vlásky. Dále byla analyzována regulace hladiny PRF1 světlem. Semenačky divého typu,

kteře klíčily ve tmě, měly 3x až 4x vyšší hladinu PRF1, než semenáčky, které klíčily na světle. Naopak mutantní semenáčky vykazovaly reprodukovatelně stejnou nebo nižší hladinu PRF1 při klíčení ve tmě v porovnání s klíčením na světle (McKinney *et al.*, 2001).

Charakterizací T-DNA inzerčních mutantů PRF1, PRF2 a PRF3 bylo zjištěno, že mutantní alely *prf1-4* a *prf2-1* jsou po 28 dnech klíčení znatelně defektní ve vývoji listové růžice a květenství. Jejich listy byly menší v celkové délce, šířce i délce čepele listu. Mutantní alela *prf3-2* se projevovala prodlouženými řapíky (Müssar *et al.*, 2015). Vytvořením tří dvojitých T-DNA mutantů (*prf1-4 prf2-1*, *prf1-4 prf3-2*, *prf2-1 prf3-2*) vyhodnocovali Müssar *et al.* (2015) kvantitativní účinek vegetativní třídy na vývoj *Arabidopsis*. Dvojití mutanti byli oproti divému typu v celkové délce, délce čepele listu i šířce znatelně menší. Pro životaschopnost rostlin je důležitá přítomnost alespoň jednoho profilinu vegetativní třídy (Müssar *et al.*, 2015).

Profilin katalyzuje výměnu ADP na ATP a také může zabránit nukleaci a růstu na (-) konci AF. Naopak profilin-aktinový komplex může interagovat s forminy a zvýšit vznik AF na (+) konci. Bylo prokázáno, že profilin je nezbytný pro tvorbu aktinových svazků (Pei *et al.*, 2012).

Brefeldin A (BFA) je inhibitor, který narušuje dráhy sekundárního a recyklujícího vezikulárního transportu. Při studiu účinků BFA na kořenové buňky *A. thaliana* se ukázalo, že se PRF2 jako cytoskeletální protein v těchto buňkách oproti kontrole hromadil ve velké míře především v BFA kompartmentech a kolem nich. To bylo doprovázeno přestavbou aktinového cytoskeletu. Dále byla po ošetření BFA zjištěna zvýšená abundance dvou ABPs, konkrétně PRF2 a EF- 1- alpha (Takáč *et al.*, 2011). Podle Takáč *et al.* (2011) se PRF2 v závislosti na BFA účastní vzájemného působení vezikulárního transportu s aktinovým cytoskeletem.

Bylo zjištěno, že při nízkých teplotách byla zvýšena transkripce genů PRF1 a PRF2. Z vegetativní třídy všech profilinů vykazoval PRF2 nejvyšší expresi po 6 h působení nízkých teplot. Z těchto výsledků vyplývá, že PRF2 je při odpovědi na nízké teploty velmi důležitý. Zkoumáním AF v hypokotylových buňkách *Arabidopsis* bylo zjišťováno, zda odpověď na nízké teploty ovlivňuje také změny v organizaci aktinového cytoskeletu. Ošetření 4 denních semenáčků latrunkulinem B (inhibitor polymerizace aktinu) se prokázalo sníženou schopností semenáčků odolávat stresu z nízkých teplot. Naopak po ošetření faloidinem (stabilizátor) byla schopnost semenáčků snášet nízké teploty zvýšena (Fan *et al.*, 2015).

Rostlinné profiliny jsou významnými panalergeny podílejícími se na mnoha potravinových a pylových alergiích (Paulus *et al.*, 2012). Jeho všudypřítomnost je základem cross- reaktivity imunoglobulin E (IgE) protilátek proti rostlinným profilinům z pylu, potravin rostlinného původu a latexu. Z tohoto důvodu se profilin označuje jako panalergen. Jako potravinový alergen způsobuje profilin spíše slabé reakce a vyvolává alergii na vodní meloun, banán, rajčata, citrusové plody a tomel (Santos a Van Ree, 2011).

2.4 Mitogen- aktivované protein kinasy

Kaskády mitogen- aktivovaných protein kinas (MAPK) jsou univerzální a vývojově zachované signalizační moduly, které převádějí informace ze životního prostředí na příslušnou odpověď fosforylací substrátových proteinů (Pitzschke, 2015). Signalizační dráhy MAPK jsou propojené multienzymatické komplexy přítomné u eukaryot (Šamaj *et al.*, 2004; Colcombet a Hirt, 2008; Rodriguez *et al.*, 2010; Liu, 2012; Sinha *et al.*, 2011; Šamajová *et al.* 2013a, b). Přežití rostlin v nepříznivých podmínkách prostředí spočívá v síti masivních a hustě propojených systémů na vnímání signálu, reakcí a přizpůsobování se stresům (Smékalová *et al.*, 2014).

MAPK mají u rostlin důležitou úlohu při adaptativních procesech a jsou zahrnuty v odpovědi na hormony a stres (Colcombet a Hirt, 2008; Rodriguez *et al.*, 2010; Liu, 2012; Sinha *et al.*, 2011). MAPK se také podílejí na regulaci buněčného dělení, růstu, diferenciaci nebo programované buněčné smrti (Franklin- Tong a Gourlay, 2008; Beck *et al.*, 2011; Müller *et al.*, 2010; Sasabe a Machida, 2012).

Každá kaskáda MAPK je složena ze tří postupně se aktivujících protein kinas. MAPK je fosforylována a tím aktivována MAPK kinasou (MAPKK). Aktivita MAPKK je řízena fosforylací nejvýše umístěného člena MAPK kaskády- MAPKK kiny (MAPKKK), který přímo nebo nepřímo přijímá signál z receptorů (Xu a Zhang, 2015). Řízení aktivity MAPK a jejich deaktivace je řízeno tyrosin a serin/threonin specifickými fosfatasami (Rodriguez *et al.*, 2010). Pro vzájemné působení mezi MAPKs a MAPKKs je důležitá tzv. „D-doména“ nebo kinasový interakční motiv (KIM- kinase interaction motif) blízky N- konci MAPKK a komplementární CD- doména v příbuzné MAPK (Šamajová *et al.*, 2013b). V genomu *Arabidopsis thaliana* se nachází 20 MAPK, 10 MAPKK a 60-80 MAPKKK (Rodriguez *et al.*, 2010, Ichimura *et al.*, 2002).

MAPK se účastní téměř každého aspektu růstu a vývoje rostlin včetně gametogeneze, embryogeneze, morfogeneze, senescence, fertilizace a tvorby semen. Jejich funkce je důležitá také při proliferaci a diferenciaci buněk (Xu a Zhang, 2015). Některé MAPK jsou umístěny v subcelulárních kompartmentech, kde se nacházejí také jejich substráty jako transkripční faktory, cytoskeletální proteiny nebo deaktivující fosfatasy. MPK3 a MPK6 jsou lokalizovány v jádře, zatímco MPK4 a MPK6 jsou přítomny v cytoskeletu (Šamajová *et al.*, 2013).

Signaling je zahrnutý také v rostlinné imunitě. Vrozený imunitní systém rostlin je tvořený dvěma vrstvami, které rostlinu chrání před mikrobiálními patogeny. První vrstvu tvoří transmembránové receptory, nazývané rozpoznávací receptory (pattern recognition receptors- PRRs). PRRs zaznamenávají patogenem asociované molekulární vzory (patogen- associated molecular patterns- PAMPs) a tím vyvolávají obrannou odpověď, kterou je přeprogramování genové exprese hostitele a tvorba antimikrobiálních sloučenin (Rodriguez *et al.*, 2010).

MAPK kaskády se účastní odpovědi rostlin na podněty z okolního prostředí, zapříčiněnými biotickým i abiotickým stresem. Abiotické a biotické podněty se přeměňují na vývojové a růstové odpovědi. Takové procesy jsou spojené s jinými signálními molekulami jako hormony a reaktivní formy kyslíku (ROS), (Rodriguez *et al.*, 2010). Působením některých abiotických stresů jako chladu, soli, vysokých teplot, sucha, poranění, UV záření, ozonu nebo intoxikace těžkými kovy dochází k aktivaci MAPK drah (Šamajová *et al.*, 2013b).

Pomocí *in vivo* screeningu Lee a Ellis (2007) zjistili, že pátý člen rodiny MAPK fosfatas (MKPs) u *Arabidopsis*- AtMKP2 způsobuje inaktivaci MPK3 i MPK6 a zároveň příznivě ovlivňuje schopnost rostlin tolerovat oxidativní stres. Vzhledem k tomu, že je u *Arabidopsis* gen AtMKP2 exprimován v přiměřené míře ve všech pletivech i vývojových stupních a jeho exprese není ovlivněna ozonem, patří AtMKP2 mezi tzv. „housekeeping“ geny (Lee a Ellis, 2007).

ROS signaling má spolu s drahami MAPK důležitou úlohu při kontrole vývoje a některých dynamických dějů, mezi které patří vývoj květu nebo vytváření průduchů. Zejména MPK3 a MPK6 jsou díky své pleiotropní funkci zapojeny do řady procesů kontrolovaných ROS. MPK3 a MPK6 plní kromě úlohy hlavních regulátorů odpovědi vůči patogenům také funkci kontrolních mechanismů při vývoji a dynamice průduchů nebo při toleranci stresu vyvolaného ozonem (Pitzschke a Hirt, 2009).

Specifická aktivace rostlinných MAPKs je spojena s různými stádii buněčného dělení. MMK3 u vojtěšky nebo Ntf6 u tabáku jsou lokalizovány k rovině buněčného dělení a během mitózy dochází k jejich aktivaci (Rodriguez *et al.*, 2010).

Substráty MAPK mají úlohu při přetváření chromatinu, transkripci, metabolismu RNA a translaci. MAPKs kontrolují transkripční, post- transkripční a translační regulaci, čímž buňce poskytují proteiny zapojené do biochemických dějů buňky. Buněčná lokalizace a re-kompartimentalizace proteinů na místo jejich aktivace nebo funkce je také úlohou kontrolní funkce MAPKs. (Lee *et al.*, 2015).

2.5 Abiotický stres

Rostliny si ve snaze přežít nepříznivé podmínky prostředí vyvinuly mechanismy, pomocí kterých jsou schopny reagovat na odlišné typy stresů. Mezi takové stresy patří chlad, osmolarita, poranění rostlin, sucho, působení těžkých kovů a UV záření (Jones a Dangl, 2006; Tena *et al.*, 2011). Základní taktikou, jakou se rostliny adaptují na změny způsobené abiotickým stresem je změna genové exprese (Sham *et al.*, 2015). Rostlinné organismy si navíc vyvinuly i vlastní imunitní mechanismy na ochranu proti patogenům a býložravcům (Jones a Dangl, 2006; Tena *et al.*, 2011). Těmito mechanismy jsou PTI (pathogen- associated molecular pattern- triggered immunity) a ETI (effector- triggered immunity), (Rasmussen *et al.*, 2012). U *Arabidopsis* jsou pro odpověď na oba tyto mechanismy významné MAPK. Nejvýznamnějšími stres indukujícími MAPK jsou u *Arabidopsis* MPK3, MPK4 a MPK6 (Colcombet a Hirt, 2008). Rostlina je v přírodě obvykle vystavena několika stresům současně, čímž je schopna spustit speciální stresovou odpověď (Rizhsky *et al.*, 2004; Atkinson a Urwin, 2012). Takovou stresovou odpověď může představovat obranný mechanismus rostlin způsobený kombinací stresu z tepla a sucha. Teplotním stresem dochází ke zvýšenému dýchání a otevírání průduchů, zatímco stres ze sucha je obvykle doprovázen potlačením fotosyntézy a zavíráním průduchů. Jejich kombinace se poté projevuje zvýšením dýchání a potlačením fotosyntézy (Rizhsky *et al.*, 2004).

Působení abiotického stresu se neprojevuje pouze po fyziologické a biochemické stránce, ale také změnami v anatomii a vývoji rostlin. Mezi tři hlavní procesy patří inhibice elongace buněk, lokalizovaná stimulace buněčného dělení a změny v diferenciaci buněk. To se projevuje změnami anatomických vlastností u základních orgánů rostlin, jakými jsou kořeny, xylém a listy (Patakas, 2012).

Jedním z prvních signálů při abiotickém stresu je vznik ROS a reaktivních forem dusíku (RNS), (Cramer *et al.*, 2011). ROS, mezi které patří například peroxid vodíku nebo superoxidový radikál, jsou tvořeny aerobními procesy v chloroplastech, mitochondriích a peroxisomech (Apel a Hirt, 2004). ROS i RNS vytvářejí koordinovanou síť a způsobují modifikaci enzymové aktivity a regulaci genů (Cramer *et al.*, 2011).

Podle Cramer *et al.* (2011) mají hormony neméně důležitou úlohu také při rostlinné odpovědi na abiotický stres. Mezi dva nejdůležitější patří kyselina abscisová (ABA) a ethylen. ABA je hlavním regulátorem mnoha rostlinných reakcí na stres vyvolaného životním prostředím, především na osmotický stres. Ethylen je naopak zapojený v odpovědi na stres způsobeným suchem, ozonem, chladem, teplem, poraněním nebo působením UV záření (Cramer *et al.*, 2011).

2.5.1 Solný stres

Rostliny jsou vystaveny solnému stresu v případě, že je v půdě přítomna vysoká koncentrace solí. Taková situace má nepříznivé účinky především na růst rostlin, jejich vývoj a přežití (Yadav *et al.*, 2011; Carillo *et al.*, 2011). Chlorid sodný (NaCl), jakožto hlavní sůl v přírodě, způsobuje u rostlin osmotický stres a iontovou toxicitu (Kader a Lindberg, 2010). Toxicita sodíku patří mezi hlavní spouštěče solného stresu (Munns a Tester, 2008). Převážná část rostlin patří mezi glykofyty, které nejsou schopny tolerovat koncentrace Na^+ převyšující 50 mmol.l^{-1} (Munns a Tester, 2008). Druhou skupinou rostlin jsou halofyty, které se přirozeně vyskytují v zasoleném prostředí a rostou v takových podmínkách poměrně dobře (Kader a Lindberg, 2010). Za normálních podmínek je v rostlinných buňkách větší osmotický tlak, který rostliny prostřednictvím kořenů využívají pro příjem vody a minerálních látek z půdy. Pokud na rostliny působí solný stres, je z důvodu nadměrného zasolení osmotický tlak prostředí větší, než osmotický tlak uvnitř buněk a tím je snížena schopnost přijímat vodu nebo minerální látky (Kader a Lindberg, 2010). Ionty Na^+ a Cl^- mohou mít uvnitř buněk toxické účinky na buněčné membrány a metabolickou aktivitu v cytosolu (Kader a Lindberg, 2010). Rostliny se proti zasolení typicky brání odstraněním Na^+ z buněk pomocí SOS1 (salinity overly sensitive) Na^+/H^+ antiporteru citlivého na sůl, udržováním vysokého vnitrobuněčného poměru K^+/Na^+ prostřednictvím HKT transportérů a vakuolární sekvestrací Na^+ přes NHX1 antiporter (Munns a Tester, 2008).

Mezi hlavní nepříznivé účinky působení solného stresu patří inhibice růstu rostlin způsobená toxicitou Na^+ nebo Cl^- . Mezi druhotné účinky solného stresu se řadí snížení buněčné expanze nebo tvorby a funkce membrán (Kader a Lindberg, 2010). Solný stres spouští řadu signálních procesů jako tvorbu ROS (Miller *et al.*, 2010), dočasné zvýšení cytosolické koncentrace Ca^{+2} (Laohavisit *et al.*, 2012) a hromadění oxidu dusnatého (Khan *et al.*, 2012).

Bylo prokázáno, že sůl indukuje především u kvasinek a rostlin programovanou buněčnou smrt, způsobenou iontovou nerovnováhou (Huh *et al.*, 2002).

2.5.2 Oxidativní stres

Oxidativní stres a tvorba ROS vznikají v případě, že dojde za určitých podmínek k narušení redoxní homeostáze (Asada, 1994). ROS jsou vedlejšími produkty aerobního metabolismu a tvoří se během abiotického stresu, například při působení extrémních teplot, genotoxickým zářením nebo stresem ze sucha a vody (Suzuki *et al.*, 2011). Mezi zástupce ROS patří především peroxid vodíku (H_2O_2), superoxidový radikál ($\text{O}_2^{\cdot-}$), hydroxylový radikál (OH^{\cdot}) a singletový kyslík ($^1\text{O}_2$), (Perl- Treves a Perl, 2002).

ROS jsou v rostlinách tvořeny především v chloroplastech. Ty účinně pohlcují světelnou energii, produkují redukované ekvivalenty jako je NADPH a vytvářejí kyslík. Chloroplasty však nejsou jediným zdrojem ROS, ale tvořit je jsou schopny také mitochondrie, endoplasmatické retikulum, peroxisomy, glyoxysomy, plasmatická membrána a kompartmenty apoplastu. ROS vznikají také po působení některých herbicidů. Paraquat a diquat jsou bypyridiniové herbicidy, které získávají elektrony z fotosystému I a na světle tvoří superoxid (Perl- Treves a Perl, 2002).

ROS mají úlohu při programované buněčné smrti, vývoji rostlin i odpovědi na stres. Významnou roli při ROS signalingu mají MAPK dráhy, které jsou ROS nejen indukovány, ale regulují jejich vznik. Konkrétně MPK3 a MPK6 jsou zahrnuty v několika procesech týkajících se ROS. Kromě regulace odpovědi vůči patogenům se podílejí také na vývoji průduchů a jejich dynamice nebo toleranci k ozonu (Pitzschke a Hirt, 2009). Rostliny produkují peroxid vodíku a superoxidový radikál jako druhotné posly v procesech, které se týkají rostlinného růstu a vývoje. Tvorbou superoxidového radikálu na plasmatické membráně navíc rostlina přenáší informace o změnách životního prostředí (Foyer a Noctor, 2005).

Procesy, během kterých dochází ke zvýšené tvorbě ROS, bývají charakterizovány jako oxidativní stres a v tom případě by se mělo jednat o škodlivý proces. Pravdou je, že v mnoha případech je situace opačná a zvýšená oxidace je nutnou součástí signálů, které rostliny využívají k příslušné opravě genové exprese nebo buněčné struktury, způsobené vývojovými podněty a podněty z prostředí (Foyer a Noctor, 2005).

Mezi enzymy s antioxidační aktivitou patří superoxid dismutasa (SOD), glutathion peroxidasa, glutathion reductasa a katalasa (Perl- Treves a Perl, 2002). Molekulární chaperony a methionin sulfoxid reductasa jsou obrannými mechanismy a důležitými prvky v rezistenci na oxidativní stres (Greene, 2002).

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Materiál

3.1.1 Rostlinný materiál

Ve všech experimentech byla použita semena modelové rostliny *Arabidopsis thaliana*, konkrétně ekotyp Columbia-0 (Col-0, divoký typ) a transgenní nadexpresní linie exprimující konstrukt *35S::PRF2:GFP* (v textu jako PRF2-GFP). Pro kontrolu byla použita semena transgenní linie *A. thaliana* stabilně exprimující konstrukt *35S::pMAT:GFP* (v textu pMAT-GFP), (Mano *et al.*, 1999). Všechna semena byla nejdříve pomocí ethanolu (etOH) povrchově vysterilizována a to následujícím způsobem:

- 1) promytí semen po dobu 5 min. v 70% etOH
- 2) promytí semen po dobu 2 min. v 96% etOH
- 3) promytí semen 3x po dobu 5 min. v destilované vodě. Mezi jednotlivým promýváním byla vždy napipetována čistá destilovaná voda.

Vysterilizovaná semena byla nanášena na filtrační papír v Petriho miskách, po vysušení filtračního papíru byly misky uzavřeny parafilmem a skladovány v chladu při teplotě 4°C.

3.1.2 Chemikálie

Tab. 1 Seznam použitých chemikálií I

<i>Duchefa Biochemie:</i>
Murashige & Skoog základní směs solí (MS salts)

Tab. 2 Seznam použitých chemikálií II

<i>Fluka:</i>
peroxid vodíku (H ₂ O ₂)

Tab. 3 Seznam použitých chemikálií III

<i>Invitrogen:</i>
Alexa Fluor 568 Phalloidin

Tab. 4 Seznam použitých chemikálií IV

<i>Penta:</i>
70% a 96% ethanol

Tab. 5 Seznam použitých chemikálií V

<i>Sigma Aldrich:</i>
1,1-dimethyl-4,4-bipyridium dichlorid (PQ – paraquat)
3,3'- diaminobenzidin (DAB)
dihydrát hydrogenfosforečnanu sodného (Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O)
dihydrogenfosforečnan draselný (KH ₂ PO ₄)
dimethylsulfoxid (DMSO)
Glutaraldehyd
Glycerol
heptahydrát síranu hořečnatého (MgSO ₄ · 7H ₂ O)
hydroxid draselný (KOH)
chlorid sodný (NaCl)
kyselina ethylenglykol-bis-(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraoctová (EGTA)
kyselina octová
latrunkulin B
nitrotetrazoliová modř (NBT)
Paraformaldehyd
Phytigel
piperazin-N,N'-bis-(ethansulfonová kyselina)- PIPES
Sacharosa
Taxol
Triton X-100
Tween 20

3.1.3 Roztoky a média

Pevné ½ MS médium

2,2 g.l ⁻¹	Murashige & Skoog základní směs solí (MS salts)
10 g.l ⁻¹	sacharosa
8 g.l ⁻¹	phytagel
1000 ml	dH ₂ O
	pH 5,8; sterilizace média probíhala autoklávováním

Tekuté ½ MS médium

2,2 g.l ⁻¹	Murashige & Skoog základní směs solí (MS salts)
10 g.l ⁻¹	sacharosa
1000 ml	dH ₂ O
	pH 5,8; sterilizace média probíhala autoklávováním

Pevné kultivační ½ MS médium s obsahem 100 mmol.l⁻¹ NaCl

2,2 g.l ⁻¹	Murashige & Skoog základní směs solí (MS salts)
10 g.l ⁻¹	sacharosa
8 g.l ⁻¹	phytagel
5,844 g.l ⁻¹	NaCl
1000 ml	dH ₂ O

pH 5,8; sterilizace média probíhala autoklávováním

Pevné kultivační ½ MS médium s obsahem 0,5 µmol.l⁻¹ PQ

2,2 g.l ⁻¹	Murashige & Skoog základní směs solí (MS salts)
10 g.l ⁻¹	sacharosa
8 g.l ⁻¹	phytagel
1000 ml	dH ₂ O

pH 5,8; sterilizace média probíhala autoklávováním

500 µl.l ⁻¹	paraquat (PQ), přidán až k vysterilizovanému a vychladnutému médiu ve sterilním laminárním boxu
------------------------	---

Tekuté kultivační ½ MS médium s obsahem 150 mmol.l⁻¹ NaCl

2,2 g.l ⁻¹	Murashige & Skoog základní směs solí (MS salts)
10 g.l ⁻¹	sacharosa
1000 ml	dH ₂ O

pH 5,8; sterilizace média probíhala autoklávováním

8,766 g.l ⁻¹	NaCl, přidáno až k vysterilizovanému médiu ve sterilním laminárním boxu
-------------------------	---

Tekuté kultivační ½ MS médium s obsahem 15 µmol.l⁻¹ PQ

2,2 g.l ⁻¹	Murashige & Skoog základní směs solí (MS salts)
10 g.l ⁻¹	sacharosa
1000 ml	dH ₂ O

pH 5,8; sterilizace média probíhala autoklávováním

15 000 µl	PQ, přidáno až k vysterilizovanému médiu ve sterilním laminárním boxu
-----------	---

Roztok DAB pro histochemické barvení peroxidu vodíku- H₂O₂

1 g.l ⁻¹	DAB
1000 ml	dH ₂ O
50 ml	200 mM Na ₂ HPO ₄
500 µl	Tween 20
	pH 5,02

Roztok NBT pro histochemické barvení superoxidových radikálů- O₂^{•-}

3,5 g.l ⁻¹	NBT
1000 ml	10 mM K- fosfátový pufr
	pH 7,8

Stabilizační roztok

94, 275 µl	300 µmol.l ⁻¹ BSE
9 695, 725 µl	1x MTSB
10 µl	Triton X- 100 (0,1%)
200 µl	DMSO (2%)

Fixační roztok

2,5 ml	PFA (8%)
160 µl	GA (25%)
5, 33 ml	1x MTSB
2,48 µl	200 µM BSE
8 µl	Alexa Fluor 568 phalloidin/ Alexa Fluor 488 phalloidin

Extrakční roztok

500 µl	DMSO (5%)
100 µl	Triton X- 100 (1%)
9,4 ml	1x MTSB

3.1.4 Přístroje

Tab. 6 Seznam použitých přístrojů

analytické váhy XA110/2X	Radwag
binokulární lupa	Leica
digestoř	Merci
elektromagnetická míchačka MSH- 420	BOECO
fotoaparát	Nikon
fytotronová komora	Weiss Gallenkamp
konfokální laserový skenovací mikroskop LSM 710	Zeiss
laboratorní předvážky S1502	BEL- Engineering
pH metr PC 2700	Eutech Instruments
Stereolupa MSZ5000	Krüss
sterilní laminární box	Merci
třepačka s nastavitelnou teplotou a časem ES-20	Biosan
vakuum	Bachofer

3.1.5 Software

Microsoft Office Excel 2007, Microsoft Office PowerPoint 2007, ImageJ (<http://fiji.sc/>), ZEN Blue 2011, ZEN Black 2011, Cytospectre 1.2, Oriana 4.

3.2 Metody

3.2.1 Příprava médií pro kultivaci rostlin *in vitro*

Ve všech experimentech bylo použito ½ pevné MS médium. Toto médium bylo připraveno tak, že v 1 l destilované vody bylo za stálého míchání na elektromagnetické míchačce rozpuštěno 2,2 g MS salts a 10 g sacharosu. Pomocí KOH se upravilo pH roztoku na 5,8. Do každé ze 4 termolahví o objemu 1 l se přidaly 2 g phytagelu, ke kterým bylo přidáno 250 ml připraveného média. Médium bylo sterilizováno autoklávováním.

Testování dlouhodobého působení abiotických stresů na rostliny probíhalo pomocí jejich kultivace na pevných médiích, přičemž solný a oxidativní stres byly navozeny přidáním 100 mmol.l⁻¹ NaCl respektive 0,5 μmol.l⁻¹ PQ k médiu. NaCl byl přidán spolu s ostatními složkami do média před autoklávováním. Zásobní roztok PQ (1mM) byl

sterilizován přes bakteriologický filtr a byl v příslušné koncentraci přidán k již vysterilizovanému médiu ve sterilním laminárním boxu.

Při histochemickém stanovení ROS bylo použito ½ pevné MS médium (viz výše) a ½ tekuté MS médium, které bylo připraveno stejným způsobem jako ½ pevné MS médium, avšak bez přidání phytagelu. Médium bylo sterilizováno autoklávováním. K testování vlivu krátkodobého oxidativního a solného stresu byly rostliny podrobeny 3 h ošetření v tekutém ½ MS médiu, v tekutém ½ MS médiu s obsahem 150 mmol.l^{-1} NaCl a v tekutém ½ MS médiu s $15 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$ PQ. Obě tyto složky byly přidány v laminárním boxu do vysterilizovaného média před ošetřením rostlin.

Při *in vivo* lokalizaci PRF2- GFP v odpovědi rostlinných buněk na působení oxidativního stresu a inhibitory cytoskeletu bylo použito pevné a tekuté ½ MS médium (viz výše).

3.2.2 Optimalizace podmínek kultivace rostlin ve stresových podmínkách *in vitro*

Vysterilizovaná semena *A. thaliana* (Col-0, pMAT-GFP a PROF2-GFP) byla nasazena na Petriho misky, obsahující pevné ½ MS médium. Petriho misky s nasazenými semeny byly následně na 72 h uloženy v lednici při 4°C , a poté byly vloženy do fytotronové komory. Ve fytotronové komoře se kultivovaly 3 dny ve vertikální poloze při konstantních podmínkách (21°C , vlhkost 71%, denní režim 16/8 h). Práce probíhala po celou dobu ve sterilním laminárním boxu. Po 3 denní kultivaci byly vyselektovány semenáčky s nejlepší expresí transgenní linie exprimující PRF2-GFP a pMAT-GFP, které byly dále přeneseny na kulaté Petriho misky, obsahující pevné ½ MS médium, pevné ½ MS médium se 100 mmol.l^{-1} NaCl a pevné ½ MS médium s $0,5 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$ PQ. Petriho miska obsahující pouze ½ MS médium sloužila jako kontrola. Misky byly poté vloženy do fytotronové komory, kde byly kultivovány v horizontální poloze za konstantních podmínek (viz výše). Po 14 a 21 dnech byly rostliny ve sterilním laminárním boxu vyfoceny fotoaparátem a byla vyhodnocena viabilita a růst rostlin po dlouhodobém působení oxidativního a solného stresu.

3.2.3 Histochemická detekce distribuce ROS v nadexpresní linii PRF2-GFP

Na Petriho misky obsahující ½ MS médium byla nasazena semena *A. thaliana* (Col-0, pMAT-GFP a PRF2-GFP). Misky byly po dobu 48 h uloženy v ledničce při teplotě 4°C, a poté byly vloženy do fytotronové komory při konstantních podmínkách (viz výše), ve které probíhala jejich kultivace ve vertikální poloze po dobu 14 dní. Po dvou týdnech byly semenáčky přeneseny do ½ tekutého MS média, ½ tekutého MS média obsahujícího 150 mmol.l⁻¹ NaCl a ½ tekutého MS média s 15 µmol.l⁻¹ PQ. Na třepačce byly semenáčky při laboratorní teplotě podrobeny krátkodobému 3 h ošetření k navození oxidativního a solného stresu.

Po ošetření byly semenáčky vystaveny histochemickému barvení barvivy NBT a DAB. Roztok NBT byl použit k histochemické detekci produkce superoxidových radikálů (O₂^{•-}). Do skleněných vialek s víčkem byly přidány 14 dní staré semenáčky a k nim napipetováno 5 ml roztoku NBT. Po vakuové infiltraci (10 min) v roztoku NBT v 10 mmol.l⁻¹ K-fosfátovém pufru se nechaly celé semenáčky barvit po dobu 20 minut ve tmě. Nabarvené semenáčky byly na vroucí vodní lázni po dobu 5 min povařeny v odbarvovacím roztoku (kyselina octová: glycerol: etanol, v poměru 1:1:3), pomocí kterého byl z listů odstraněn chlorofyl. Rostliny byly pak uchovávány ve směsi 20% glycerol a 96% ethanol v poměru 1:3. Redukovaná NBT byla vizualizovaná jako tmavě modrý formazan.

Peroxid vodíku (H₂O₂) byl vizualizován pomocí barviva DAB. Do vialek s víčkem bylo napipetováno 10 ml roztoku DAB a přidány 14 dní staré semenáčky. Po vakuové infiltraci (1 h) v roztoku DAB v 4,7 mmol.l⁻¹ Na-fosfátovém pufru byly semenáčky barveny po dobu 8 h ve tmě. Obarvené semenáčky byly odbarveny povařením ve vroucí vodní lázni po dobu 5 min v odbarvovacím roztoku (viz výše) a uloženy ve směsi 20% glycerol a 96% ethanol, v poměru 1:3. Produkce H₂O₂ byla vizualizovaná jako hnědá sraženina oxidovaného DAB.

Obarvené semenáčky, ze kterých byl odstraněn chlorofyl, byly namontovány na podložní sklíčka tak, že se rozložily do kapky glycerolu a zakryly krycím sklíčkem. Nafoceny byly pomocí binokulárního mikroskopu. Nastavení mikroskopu bylo pro všechny snímky experimentu stejné. Ke zhodnocení intenzity barvených listů a kotyledonů byl použit software ImageJ. Získaná data byla statisticky vyhodnocena pomocí Studentova t- testu (Takáč *et al.*, 2014).

3.2.4 *In vivo* lokalizace PRF2- GFP v odpovědi rostlinných buněk na oxidativní stres a inhibitory cytoskeletu

Na pevné ½ MS médium v kulatých Petriho miskách byla nasazena semena *A. thaliana* (transgenní linie exprimující PRF2- GFP). Petriho misky byly uloženy na 48 h v ledničce při 4°C, a poté kultivovány ve vertikální poloze ve fytotronové komoře při konstantních podmínkách (viz výše). Čtyřdenní semenáčky byly umístěny do mikromůrky, kterou tvořilo podložní a krycí sklíčko. Na podložní sklíčko se po stranách nalepila oboustranná lepicí páska a do kapky tekutého ½ MS média byl vložen semenáček, který byl poté přikryt krycím sklíčkem. Připravený preparát byl pozorován konfokálním laserovým skenovacím mikroskopem LSM 710 v programu Zen 2011 Black software.

Sledování změn profilinu 2 po působení oxidativního stresu bylo navozeno přidáním H₂O₂ o koncentraci 15 μmol.l⁻¹. Nejprve byly nasnímány hypokotylové buňky v kontrolních podmínkách, a poté byl perfúzí přidáván roztok H₂O₂ v tekutém ½ MS médiu. Roztok H₂O₂ byl přidáván pipetou po objemu 100 μl směrem od kotyledonů ke kořenům, u kterých byl odsáván filtračním papírem. Poté byly hypokotylové buňky snímány každých 10 min po dobu 60 min. Změny v intenzitě fluorescence byly vyhodnoceny pomocí Zen 2001 Blue software.

Sledování změn profilinu 2 po působení inhibitorů cytoskeletu bylo navozeno přidáním inhibitoru taxolu, který stabilizuje MT a latrunkulinu B, způsobujícího depolymerizaci AF. V případě inhibitoru taxolu se po 60 min působení provedlo vymytí taxolu ½ MS médiem pro sledování návratu intenzity fluorescence buněk do původního stavu. Také se provedla kombinace obou inhibitorů. Po aplikaci latrunkulinu B a jeho vymytí ½ MS médiem se aplikoval taxol. Nejprve byly nasnímány hypokotylové buňky v kontrolních podmínkách a perfúzí byly poté přidán roztok latrunkulinu B (10 μmol.l⁻¹) a roztok taxolu (1 μmol.l⁻¹) v tekutém ½ MS médiu. Roztoky inhibitorů byly přidávány pipetou po objemu 100 μl směrem od kotyledonů ke kořenům, kde byly odsávány filtračním papírem. Poté byly hypokotylové buňky snímány každých 10 min po dobu jedné hodiny. Změny v intenzitě fluorescence byly vyhodnoceny pomocí Zen 2001 Blue software.

3.2.4.1 Vizualizace F- aktinu u nadexpresní linie PRF2- GFP

Na pevné ½ MS médium v kulatých Petriho miskách byla nasazena semena *A. thaliana* (divoký typ Col-0 a transgenní linie exprimující PRF2-GFP) a uložena v ledničce při 4°C na 48 h. Semena byla ve fytotronu kultivována ve vertikální poloze za konstantních podmínek (viz výše). Ve třídenních semenáčcích byl lokalizován F- aktin pomocí faloidinu značeného Alexa Fluor 568 (PRF2- GFP, Col-0). Nejprve byly třídenní semenáčky umístěny na 15 min při pokojové teplotě za tmy do stabilizačního roztoku pro stabilizaci aktinu. Poté byly semenáčky fixovány ve fixačním roztoku při pokojové teplotě za tmy s použitím vakua (2x 2 min) po dobu 1 h. Zafixované semenáčky byly promyty v MTSB (3x 2 min). Následně byla v extrakčním roztoku při pokojové teplotě za tmy provedena extrakce po dobu 15 min. Po extrakci byla aktinová filamenta barvena při teplotě 37°C ve tmě pomocí 10% faloidinu značeného Alexa Fluor 568 v MTSB v poměru 20:200 po dobu 1 h.

Následně byly připraveny preparáty tak, že do kapky 1x MTSB byly vloženy obarvené semenáčky divého typu Col-0 a transgenní linie exprimující PRF2-GFP a zakryty krycím sklíčkem. Preparáty byly vyhodnocovány pomocí konfokálního laserového skenovacího mikroskopu LSM 710 od firmy Zeiss. Distribuce a orientace F- aktinu byla vyhodnocena pomocí Cytospectre 1.2 a Oriana 4.

4 VÝSLEDKY

V této kapitole jsou představeny výsledky, které byly získány v experimentální části bakalářské práce.

V první části je popsána optimalizace podmínek kultivace rostlin ve stresových podmínkách *in vitro*. Konkrétně je popsán vliv dlouhodobého působení solného a oxidativního stresu na viabilitu a růst rostlin u transgenní linie exprimující PRF2- GFP, pMAT- GFP a u divého typu Col-0. Druhá část se zabývá výsledky histochemické detekce produkce ROS v nadexpresní linii PRF2- GFP v podmínkách oxidativního stresu. Ve třetí části je popsáno působení oxidativního stresu a inhibitorů cytoskeletu na buňky rostlin transgenní linie exprimující PRF2-GFP. V této části byla provedena i vizualizace F- aktinu pomocí Alexa Fluor 568 faloidin za použití konfokálního laserového skenovacího mikroskopu.

4.1 Optimalizace podmínek kultivace rostlin ve stresových podmínkách *in vitro*

4.1.1 Působení solného a oxidativního stresu na růst a viabilitu rostlin

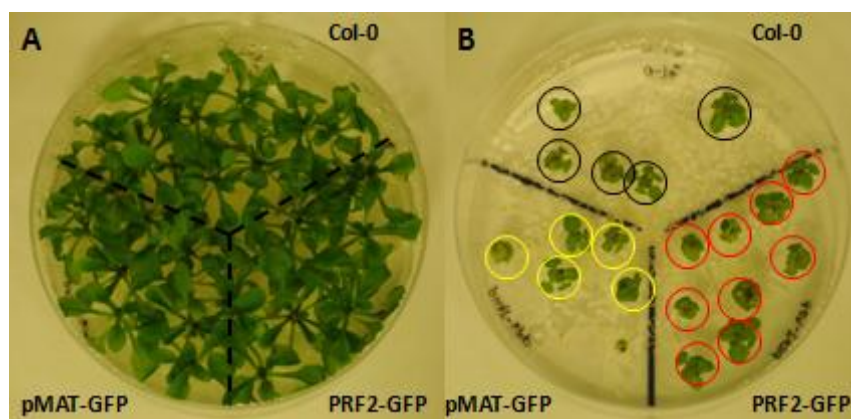
Pro sledování vlivu dlouhodobého působení solného a oxidativního stresu na viabilitu a růst rostlin byly použity transgenní linie exprimující PRF2- GFP, pMAT-GFP a jako kontrola divý typ Col-0. Oxidativní stres byl navozen pomocí PQ a solný stres přidavkem NaCl. Čtyřdenní semenáčky byly z ½ MS média přeneseny na kulaté Petriho misky, které obsahovaly 100 mmol.l⁻¹ NaCl a 0,5 μmol.l⁻¹ PQ. Miska s ½ MS médiem sloužila jako kontrola. Petriho misky byly vyfotografovány 14. a 21. den po přenosu.

Rostliny na kontrolním médiu mají v porovnání s rostlinami na médiu se 100 mmol.l⁻¹ NaCl a 0,5 μmol.l⁻¹ PQ viditelně lépe vyvinuté listové růžice i kořenový systém (Obr. 3A, 4A, 5A, 6A).

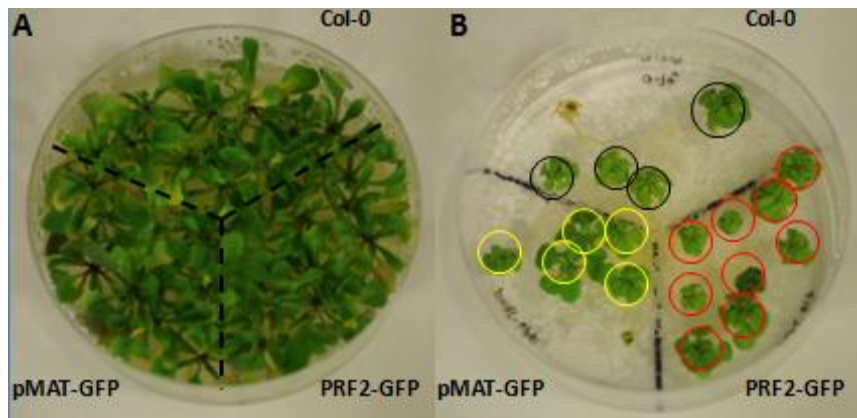
Při dlouhodobém působení solného stresu byly po 14 i 21 dnech kultivace u rostlin na médiu se 100 mmol.l⁻¹ NaCl patrné změny v růstu i viabilitě, byl redukovaný vývoj listové růžice i kořenového systému (Obr. 3B, 4B). Na médiu s přidavkem 100 mmol.l⁻¹ NaCl přeživalo po 14 dnech 90% PRF2-GFP, 50% pMAT-GFP a 50% Col-0 (Obr. 3B- zvýraznění kruhy). Po 21 dnech přeživalo na tomto médiu 90% PRF2-GFP, 50% pMAT- GFP a 40% Col-0 (Obr. 4B- zvýraznění kruhy). Z těchto výsledků lze usoudit, že rostliny transgenní linie exprimující PRF2-GFP jsou na

působení NaCl odolnější než rostliny transgenní linie pMAT-GFP a kontrolní rostliny Col-0.

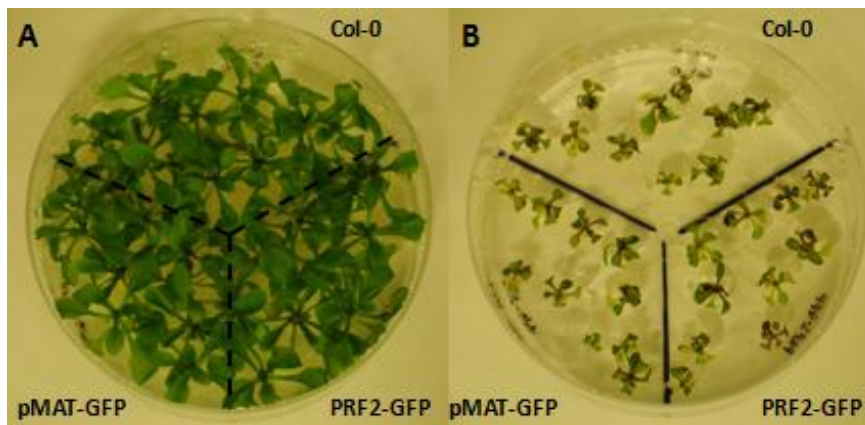
Oxidativní stres byl navozen 0,5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ PQ a na tomto médiu přežívaly 14 dní po přenosu téměř všechny transgenní rostliny exprimující PRF2-GFP, pMAT-GFP a divého typu Col-0 (Obr. 5B). Po 21 dnech přežívalo na médiu s PQ 90% PRF2-GFP, 50% pMAT-GFP a 50% Col-0 (Obr. 6B). Všechny rostliny na médiu s PQ měly oproti rostlinám na kontrolním médiu redukovaný vývoj listové růžice i kořenového systému (Obr. 5B, 6B). Listy byly u transgenní linie exprimující PRF2-GFP, pMAT-GFP a divého typu Col-0 po 14 dnech kultivace na stresovém médiu s PQ stočené (Obr. 5B). Po 21 denní kultivaci nebylo stočení listů u transgenní linie exprimující PRF2-GFP téměř viditelné (Obr. 6B). U některých semenáčků transgenní linie exprimující PRF2-GFP byly po 21 dnech kultivace oproti transgenní linii pMAT-GFP a kontrolním rostlinám Col-0 viditelné výhonky květu (Obr. 6B). Z těchto výsledků tedy vyplývá, že rostliny transgenní linie exprimující PRF2-GFP snášely působení oxidativního stresu lépe a jsou vůči jeho dlouhodobému působení odolnější než transgenní rostliny pMAT-GFP a kontrolní rostliny Col-0.



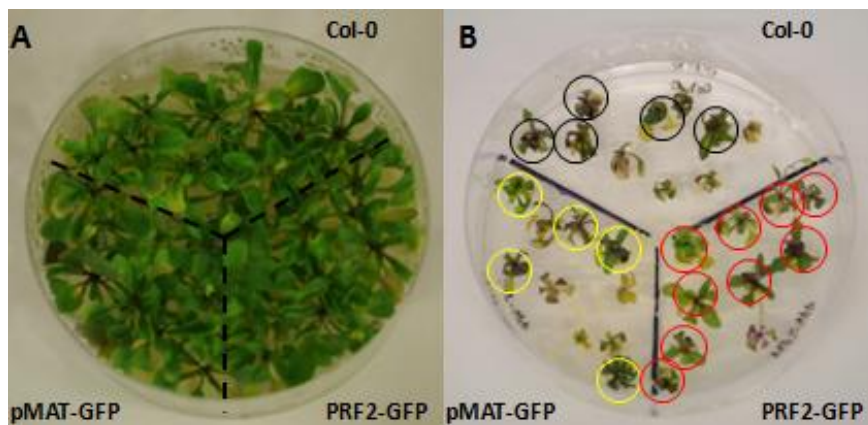
Obr. 3 Vliv solného stresu na viabilitu a růst rostlin *A. thaliana* – Col-0, pMAT-GFP a PRF2-GFP po 14 dnech kultivace na kontrolním $\frac{1}{2}$ MS médiu (A) a na médiu se 100 mmol.l^{-1} NaCl (B)



Obr. 4 Vliv solného stresu na viabilitu a růst rostlin *A. thaliana* – Col-0, pMAT-GFP a PRF2-GFP po 21 dnech kultivace na kontrolním ½ MS médiu (A) a na médiu se 100 mmol.l^{-1} NaCl (B).



Obr. 5 Vliv oxidativního stresu na viabilitu a růst rostlin *A. thaliana* – Col-0, pMAT-GFP a PRF2-GFP po 14 dnech kultivace na kontrolním ½ MS médiu (A) a na médiu s $0,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$ PQ (B).

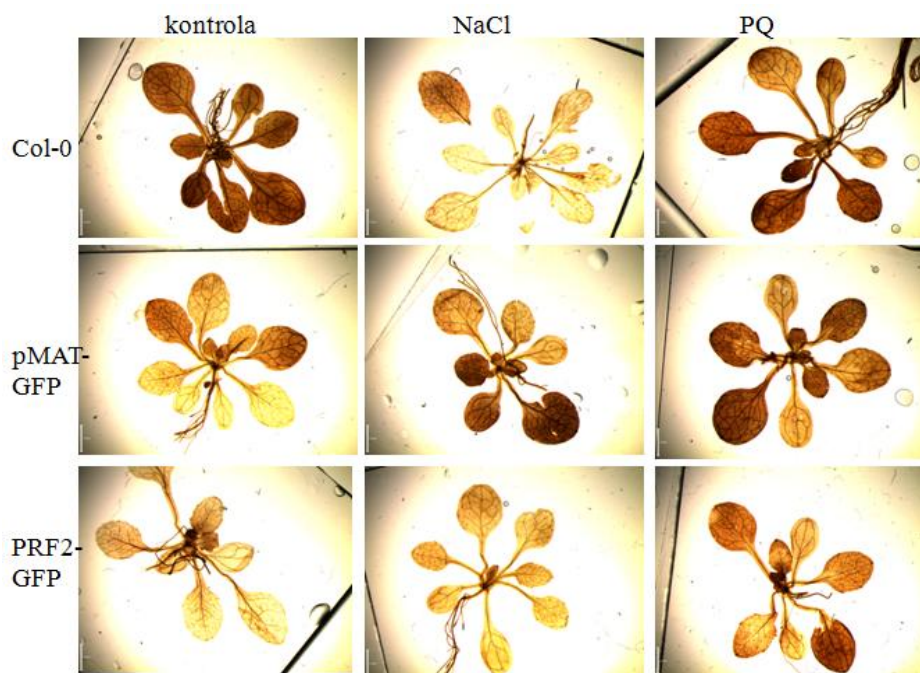


Obr. 6 Vliv oxidativního stresu na viabilitu a růst rostlin *A. thaliana* – Col-0, pMAT-GFP a PRF2-GFP po 21 dnech kultivace na kontrolním ½ MS médiu (A) a na médiu s $0,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$ PQ (B).

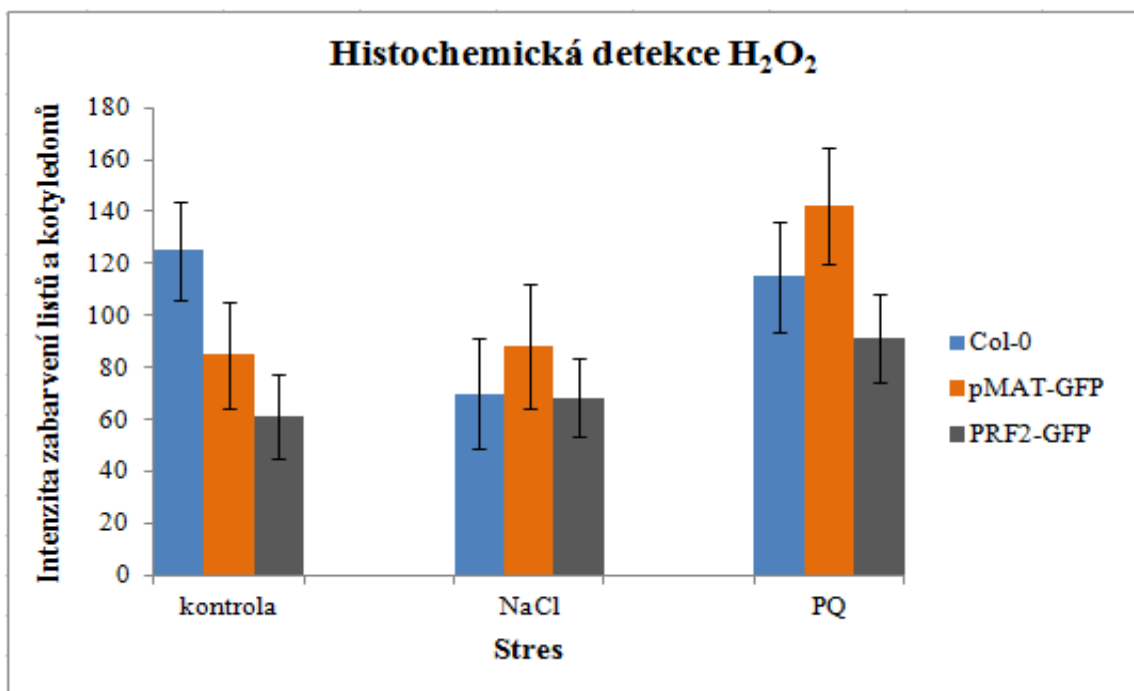
4.2 Histochemická detekce produkce ROS u nadexpresní linie PRF2-GFP

Histochemickou metodou byla v podmínkách oxidativního a solného stresu sledována produkce ROS u transgenní linie PRF2- GFP, pMAT- GFP a divého typu Col-0. Po krátkodobém ošetření (3 h) 14 dní starých semenáčků 150 mmol.l^{-1} NaCl a $15 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$ PQ bylo provedeno histochemické barvení roztokem NBT a DAB. Roztokem NBT byla vizualizována tvorba superoxidových radikálů $\text{O}_2^{\bullet-}$ a roztokem DAB byl vizualizován H_2O_2 .

Rožtokem DAB byla vizualizována produkce H_2O_2 v listech a kotyledonech transgenní linie exprimující PRF2-GFP, pMAT-GFP a divého typu Col-0 (Obr. 7). Oproti kontrolním podmínkám došlo po působení solného a oxidativního stresu ke zvýšené produkci H_2O_2 (Obr. 8). U transgenní linie exprimující PRF2-GFP byla po působení solného i oxidativního stresu naměřena nejnižší intenzita zabarvení listů a kotyledonů. Produkce H_2O_2 tak byla u této linie nízká (Obr. 7, 8). U transgenní linie pMAT-GFP a divého typu Col-0 bylo detekováno větší množství H_2O_2 , což se projevilo intenzivnějším zabarvením listů a kotyledonů (Obr. 7, 8). Z toho vyplývá, že transgenní linie exprimující PRF2- GFP je na krátkodobé působení solného i oxidativního stresu odolnější než transgenní linie pMAT- GFP a divý typ Col- 0.

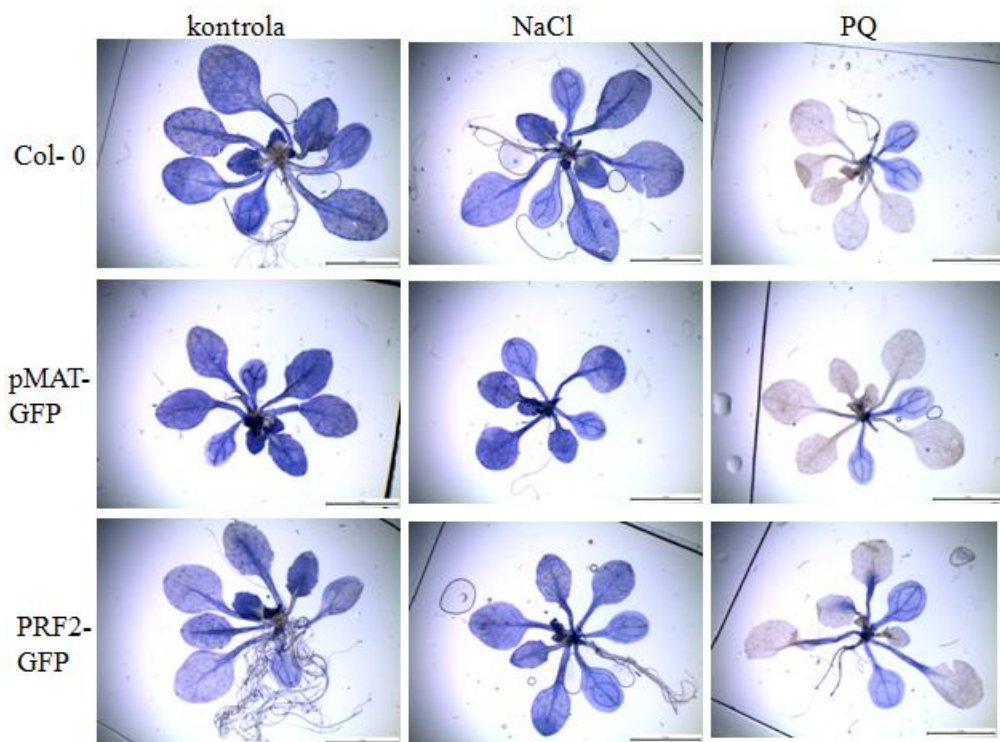


Obr. 7 Histochemicky nabarvené dvoutýdenní semenáčky transgenní linie exprimující PRF2-GFP, pMAT-GFP a divého typu Col-0 roztokem DAB pro detekci produkce H_2O_2 . Měřítko odpovídá 5 μm .

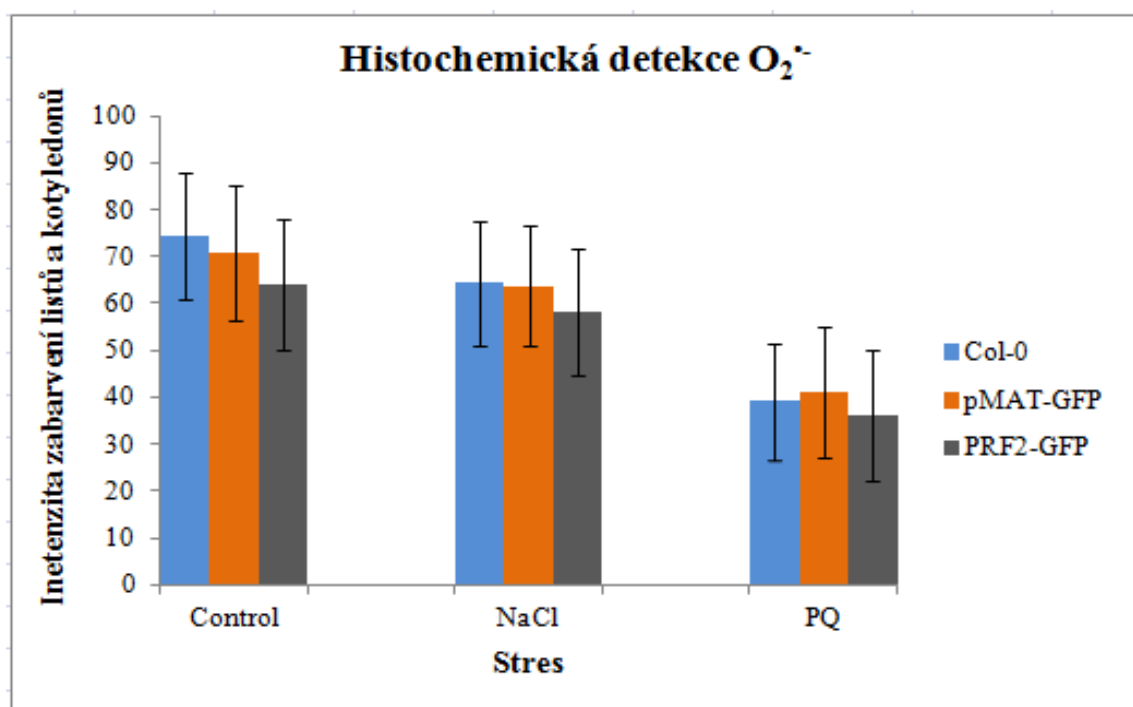


Obr. 8 Intenzita zabarvení listů a kotyledonů u transgenní linie exprimující PRF2- GFP, pMAT- GFP a divého typu Col- 0 po histochemickém barvení H₂O₂ roztokem DAB.

Roztokem NBT byla vizualizována tvorba O₂^{•-} v listech a kotyledonech transgenní linie exprimující PRF2-GFP, pMAT-GFP a divého typu Col-0 (Obr. 9). V tomto případě však došlo oproti kontrolním podmínkám po působení solného a oxidativního stresu ke snížení produkce O₂^{•-} (Obr. 10).



Obr. 9 Histochemicky nabarvené dvoutýdenní semenáčky transgenní linie exprimující PRF2-GFP, pMAT-GFP a divého typu Col-0 roztokem NBT pro detekci produkce $O_2^{\cdot-}$. Měřítka odpovídá 5 μ m.



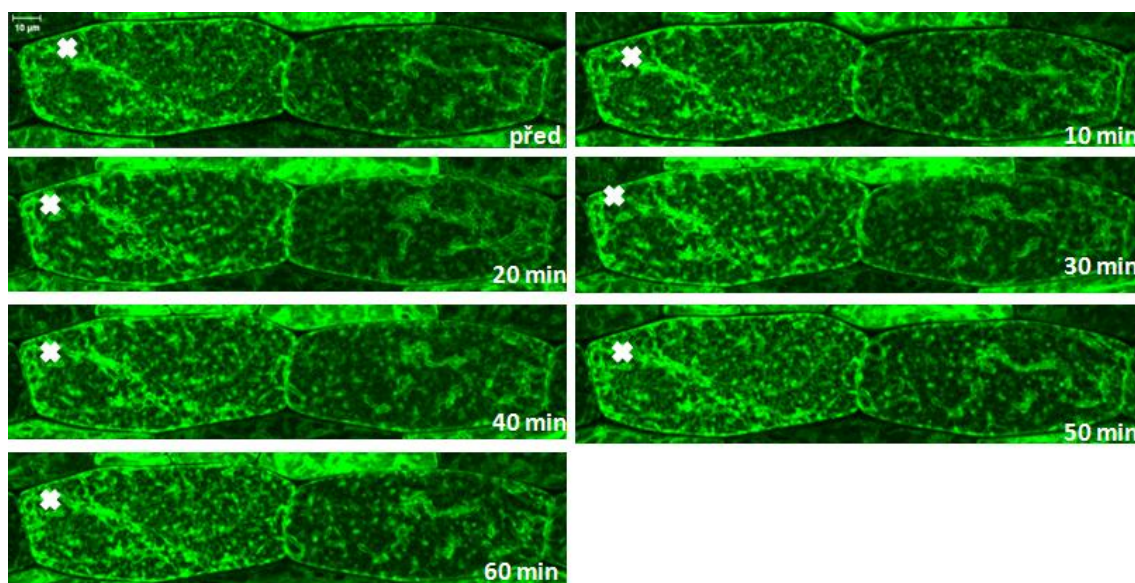
Obr. 10 Intenzita zabarvení listů a kotyledonů u transgenní linie exprimující PRF2- GFP, pMAT- GFP a divého typu Col- 0 po histochemickém barvení $O_2^{\cdot-}$ roztokem NBT.

4.3 Vliv oxidativního stresu a inhibitorů cytoskeletu na *in vivo* lokalizaci fúzního proteinu PRF2- GFP u transgenní linie PRF2-GFP

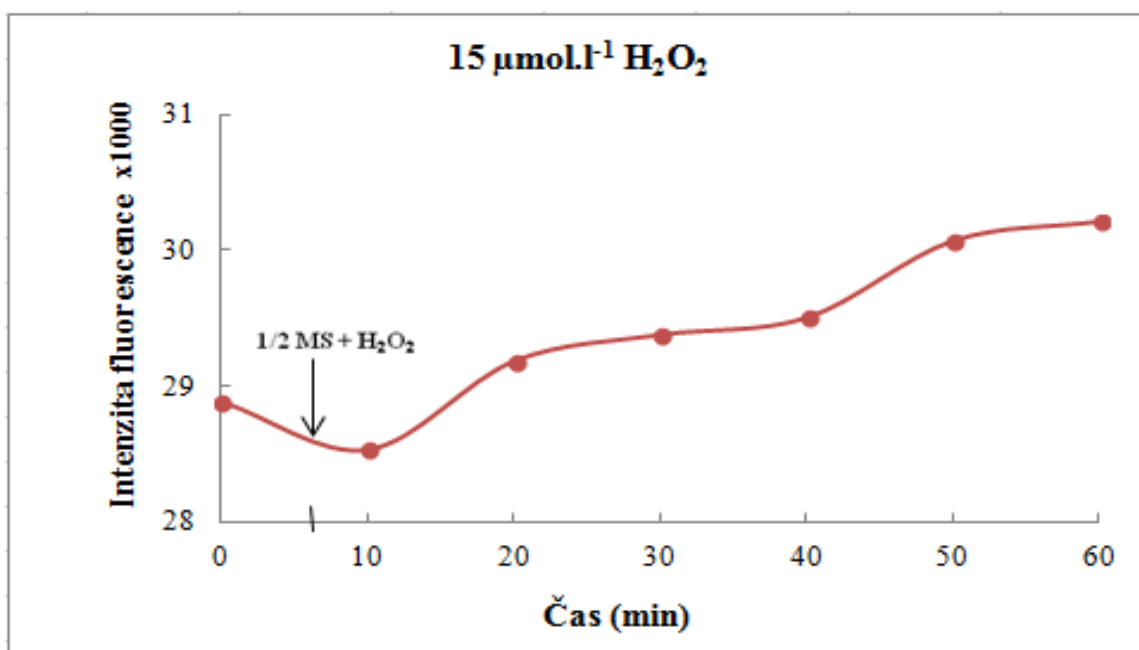
4.3.1 Vliv oxidativního stresu na intenzitu fluorescence fúzního proteinu PRF2- GFP u transgenní linie PRF2-GFP

Ke sledování změn intenzity fluorescence v epidermálních buňkách hypokotylu transgenní linie exprimující PRF2- GFP vlivem oxidativního stresu byl použit H_2O_2 o koncentraci $15 \mu\text{mol.l}^{-1}$. Před i po aplikaci H_2O_2 byly v průběhu celého experimentu snímány konfokálním laserovým skenovacím mikroskopem stejné buňky. Po přidání roztoku H_2O_2 v tekutém $\frac{1}{2}$ MS médiu byly buňky snímány každých 10 min po dobu 60 min. Hodnoty intenzity fluorescence byly naměřeny v ZEN Blue 2011 a zpracovány v programu Microsoft Excel.

Působení oxidativního stresu navozeného prostřednictvím H_2O_2 způsobilo nárůst intenzity fluorescence (Obr. 11, 12). Z tohoto výsledku lze usoudit, že oxidativní stres způsobil zvýšení abundance fúzního proteinu PRF2-GFP.



Obr. 11 Vliv oxidativního stresu (navozený $15 \mu\text{mol.l}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$) na epidermální buňky hypokotylu čtyřdenního semenáčku transgenní linie exprimující PRF2-GFP. Symbolem je označena buňka, ve které byla v průběhu celého experimentu měřena změna v intenzitě fluorescence. Měřítko odpovídá $10 \mu\text{m}$.

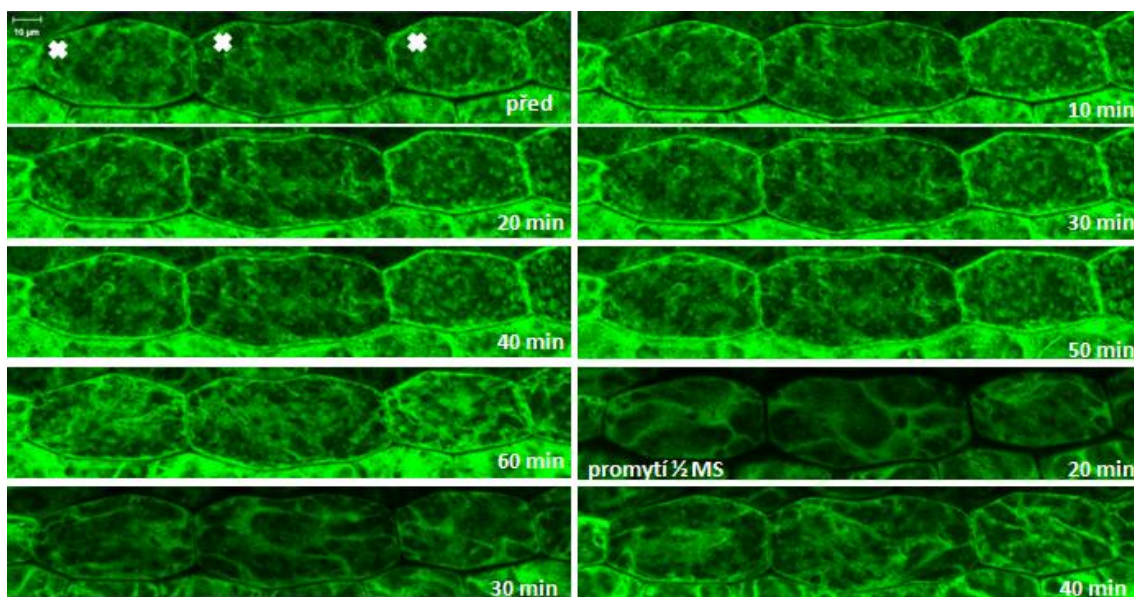


Obr. 12 Intenzita fluorescence v epidermálních buňkách hypokotylu čtyřdenního semenáčku transgenní linie exprimující PRF2-GFP po 60 min působení oxidativního stresu. Oxidativní stres byl navozený působením $15 \mu\text{mol.l}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$.

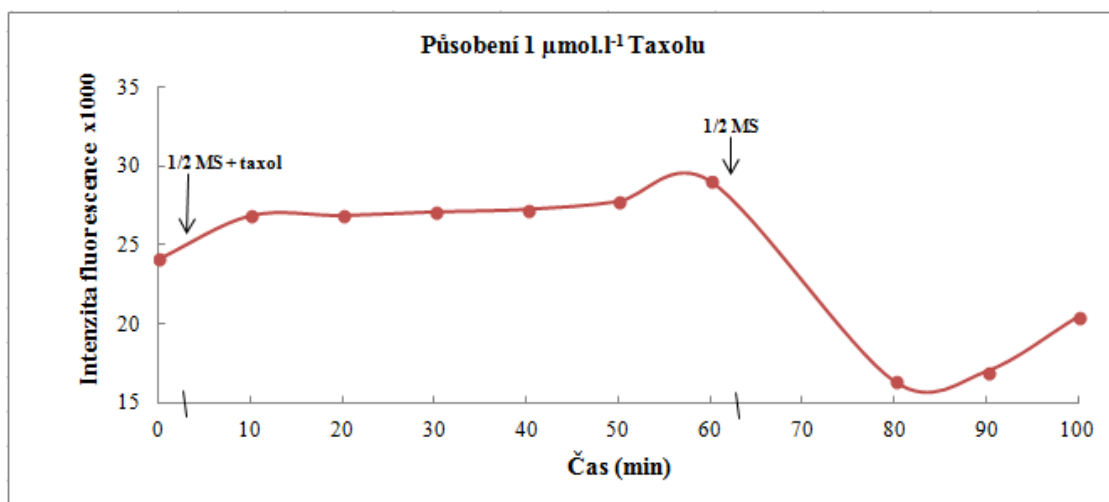
4.3.2 Vliv inhibitorů cytoskeletu na intenzitu fluorescence fúzního proteinu PRF2- GFP u transgenní linie PRF2-GFP

Ke sledování změn intenzity fluorescence v epidermálních buňkách hypokotylu transgenní linie exprimující PRF2- GFP byl použit cytoskeletální inhibitor taxol o koncentraci $1 \mu\text{mol.l}^{-1}$, který stabilizuje MT. Dále byl použit latrunkulin B o koncentraci $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$, způsobující depolymerizaci AF. Třídenní semenáčky PRF2- GFP byly podrobeny ošetření s těmito inhibitory a v průběhu celého experimentu byly snímány konfokálním laserovým skenovacím mikroskopem stejné buňky před i po aplikaci taxolu a latrunkulinu B. V případě taxolu byly buňky snímány každých 10 min v průběhu 60 min a poté byly promyty tekutým $\frac{1}{2}$ MS médiem a snímány opět každých 10 min v průběhu 40 min. Buňky ošetřené latrunkulinem B byly snímány každých 10 min v průběhu 60 min, poté promyty $\frac{1}{2}$ MS médiem a následně byly buňky ošetřeny taxolem a snímány opět každých 10 min v průběhu 60 min. Hodnoty intenzity fluorescence byly naměřeny v ZEN Blue 2011 a zpracovány v programu Microsoft Excel.

Taxol způsobil nárůst intenzity fluorescence fúzního proteinu PRF2-GFP. Po vymytí roztoku taxolu tekutým $\frac{1}{2}$ MS médiem se intenzita fluorescence postupně zvyšovala a přibližovala se hodnotě, která byla naměřena před aplikací taxolu (Obr. 13, 14).

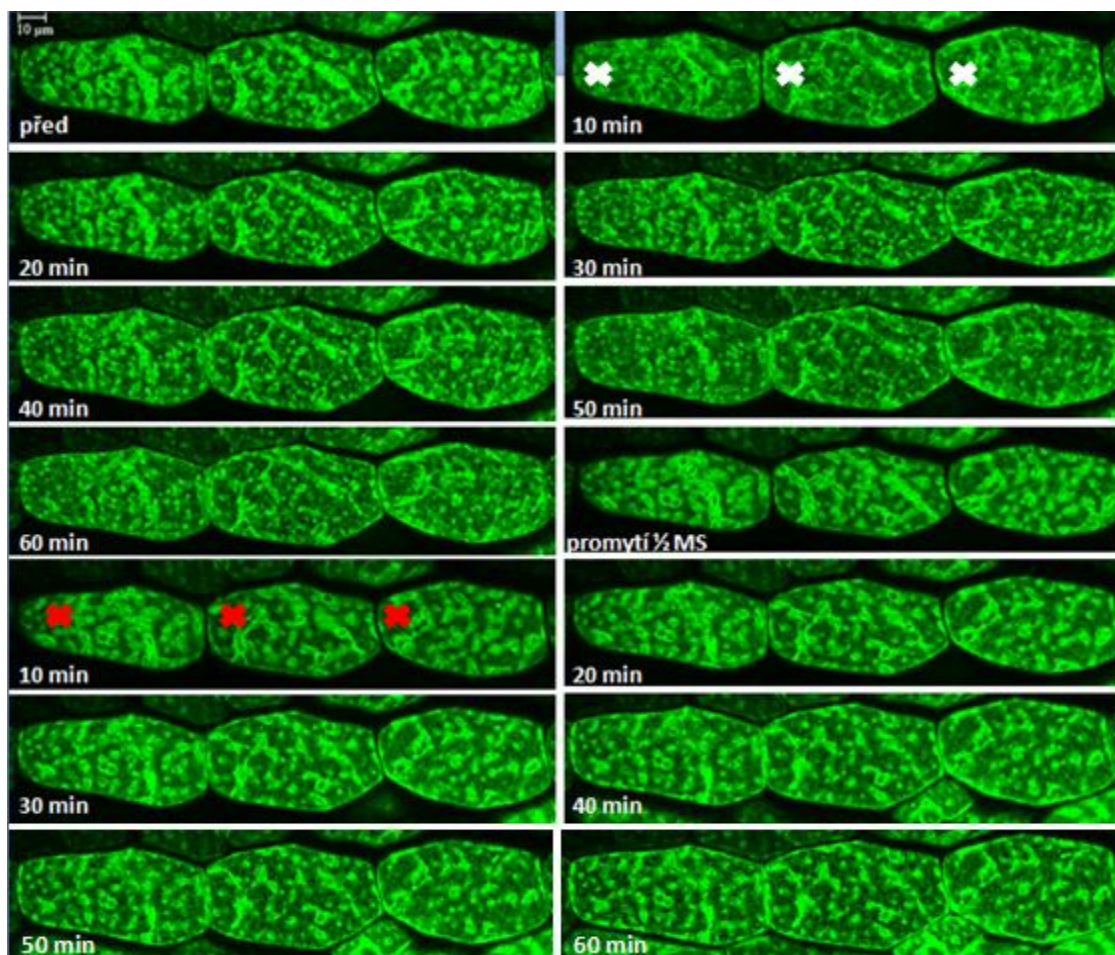


Obr. 13 Vliv $1 \mu\text{mol.l}^{-1}$ taxolu na epidermální buňky hypokotylu třídního semenáčku transgení linie exprimující PRF2-GFP. Symbolem jsou označeny buňky, ve kterých byla měřena změna v intenzitě fluorescence. V průběhu celého experimentu byly měřeny všechny 3 buňky. Měřítka odpovídá $10 \mu\text{m}$.

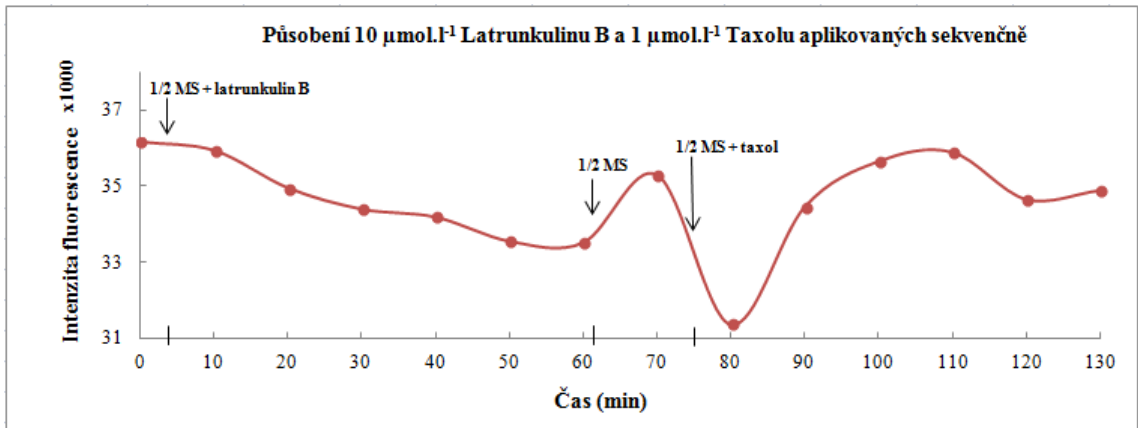


Obr. 14 Intenzita fluorescence v epidermálních buňkách hypokotylu třídního semenáčku transgení linie exprimující PRF2-GFP po 60 min působení taxolu.

Působení latrunkulinu B vedlo naopak ke snížení fluorescence fúzního proteinu PRF2-GFP. Po vymytí latrunkulinu B ½ MS médiem se fluorescence v buňkách zvýšila a po následné aplikaci taxolu intenzita fluorescence narůstala tak, až dosahovala hodnoty, která byla naměřena před aplikací latrunkulinu B (Obr. 15, 16).



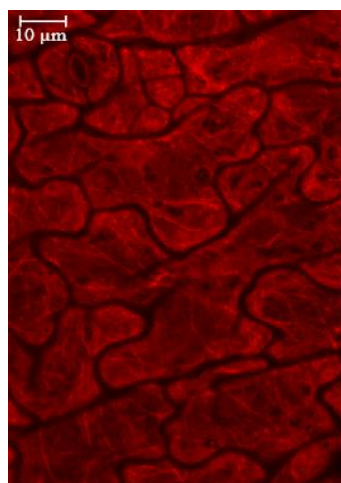
Obr. 15 Vliv $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$ latrunkulinu B a $1 \mu\text{mol.l}^{-1}$ taxolu na intenzitu fluorescence fúzního proteinu PRF2- GFP v epidermálních buňkách hypokotylu u třídenního semenáčku transgenní linie exprimující PRF2-GFP. Bílým symbolem jsou označeny buňky, od kterých byla měřena intenzita fluorescence po přidání latrunkulinu B. Červeným symbolem jsou označeny buňky, od kterých byla měřena intenzita fluorescence po přidání taxolu. V průběhu celého experimentu byla měřena intenzita fluorescence ve všech 3 buňkách. Měřítka odpovídá $10 \mu\text{m}$.



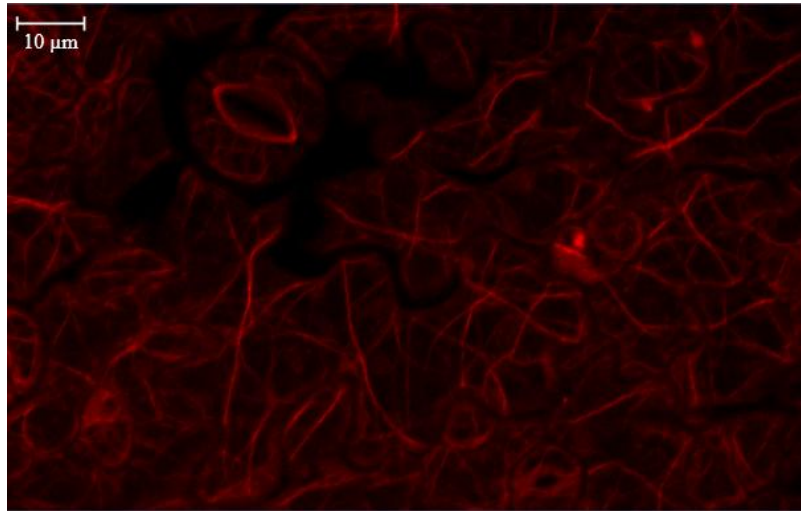
Obr. 16 Intenzita fluorescence fúzního proteinu PRF2-GFP v epidermálních buňkách hypokotylu třídního semenáčku transgenní linie exprimující PRF2-GFP po 60 min působení latrunkulinuB, promytí ½ MS médiem a následným působením taxolu po dobu 60 min.

4.3.3 Vizualizace F-aktinu v buňkách transgenní linie PRF2-GFP

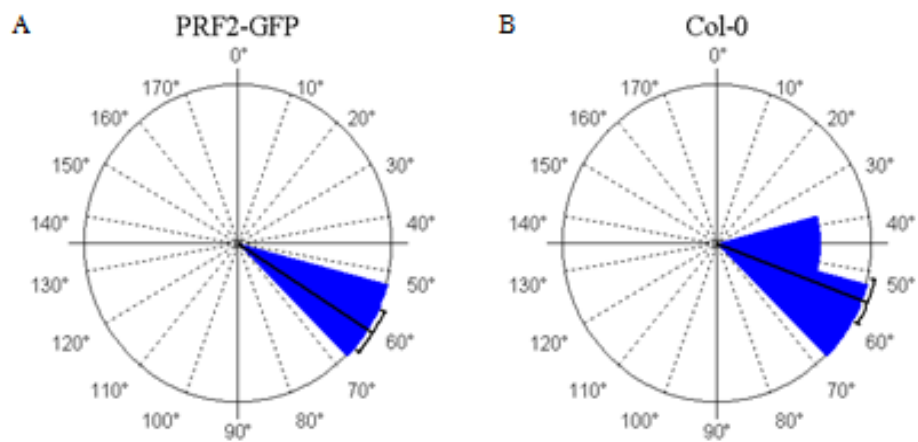
F-aktin byl vizualizován pomocí faloidinu značeného Alexa Fluor 568 v epidermálních buňkách klíčnicích listů, hypokotylů, a kořenů transgenní linie exprimující PRF2-GFP a divého typu Col-0. Buňky s vizualizovaným F-aktinem byly nasnímané a vyexportované obrázky (Obr. 17, 18, 20, 21, 23, 24) byly analyzované pomocí programu Cytospectre, který určil úhel průměrné orientace aktinových mikrofilament v buňkách transgenní linie exprimující PRF2-GFP a divého typu Col-0. V epidermálních buňkách klíčnicích listů není patrný výrazný rozdíl v orientaci F-aktinu mezi transgenní linií exprimující PRF2-GFP a divým typem Col-0. V transgenní linii exprimující PRF2-GFP jsou aktinová vlákna orientována pod úhlem 61°, u Col-0 je orientace F-aktinu v buňkách 53° (Obr. 19A, 19B).



Obr. 17 Vizualizace F-aktinu v epidermálních buňkách klíčnicích listů u transgenní linie exprimující PRF2- GFP pomocí faloidinu značeného Alexa Fluor 568. Měřítko odpovídá 10 μm .

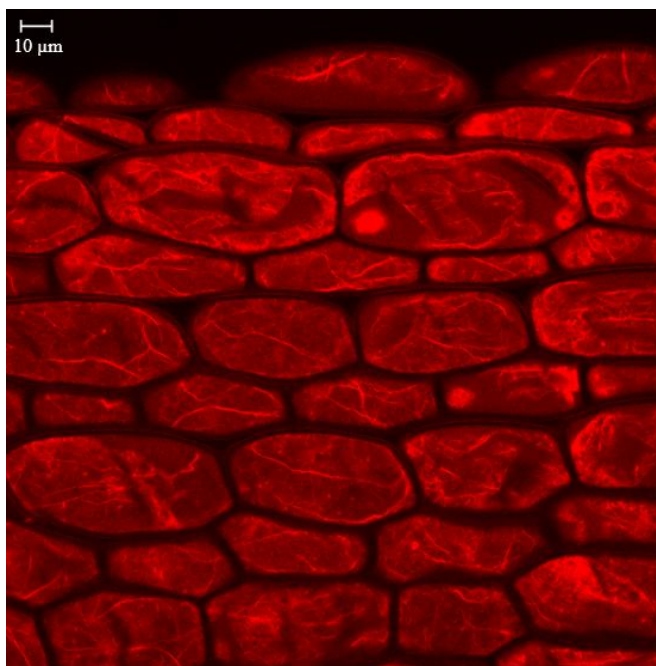


Obr. 18 Vizualizace F-aktinu v epidermálních buňkách klíčnicích listů u Col-0 pomocí faloidinu značeného Alexa Fluor 568. Měřítka odpovídá 10 μm .

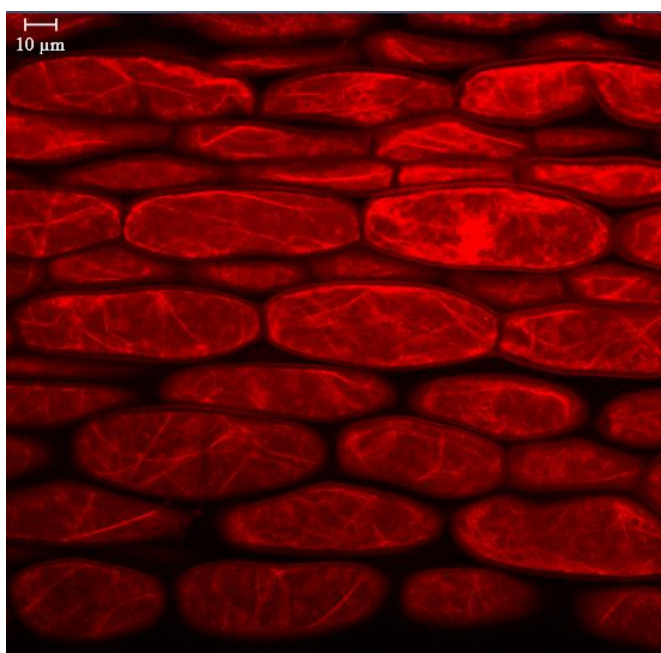


Obr. 19 Graf znázorňující průměrné uhly, pod kterými je F-aktin orientován v epidermálních buňkách klíčnicích listů transgenů exprimujících PRF2- GFP (A) a Col-0 (B).

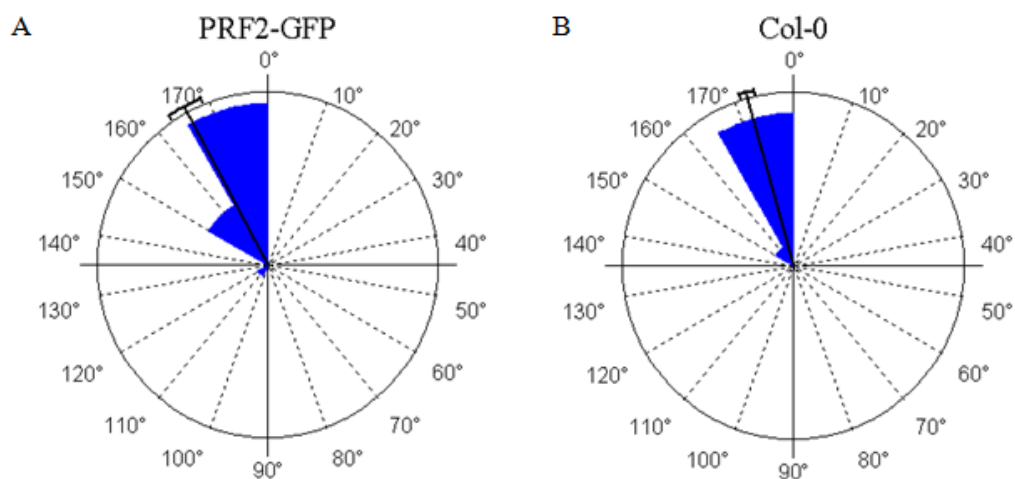
V případě epidermálních buněk hypokotylu nebyl naměřený výrazný rozdíl v úhlu průměrné orientace F-aktinu u transgenní linie exprimující PRF2-GFP a divého typu Col-0. Průměrná hodnota úhlu, pod kterým jsou buňky orientovány v epidermálních buňkách hypokotylu u transgenní linie exprimující PRF2-GFP činí 166° a u Col-0 je tato hodnota 172° (Obr. 22A, 22B).



Obr. 20 Vizualizace F- aktinu v epidermálních buňkách hypokotylu transgenní linie exprimující PRF2- GFP pomocí faloidinu značeného Alexa Fluor 568. Měřítko odpovídá 10 μm .



Obr. 21 Vizualizace F-aktinu v epidermálních buňkách hypokotylu u Col-0 pomocí faloidinu značeného Alexa Fluor 568. Měřítko odpovídá 10 μm .

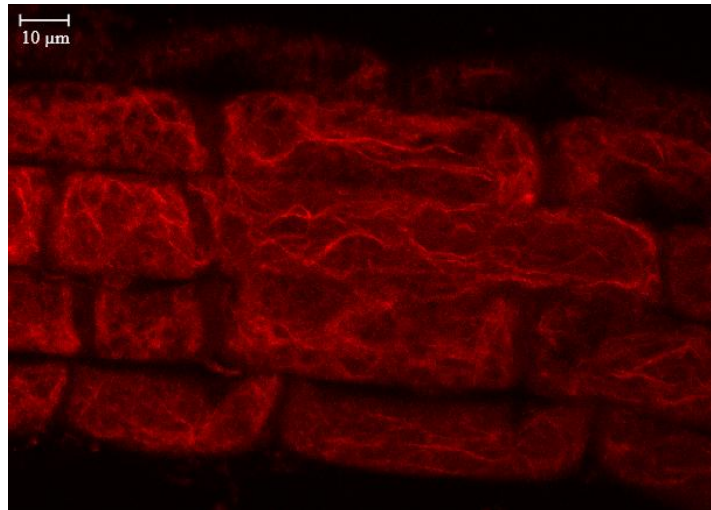


Obr. 22 Graf znázorňující průměrné úhly, pod kterými je F-aktin orientován v epidermálních hypokotylových buňkách transgenní linie exprimující PRF2- GFP (A) a Col- 0 (B).

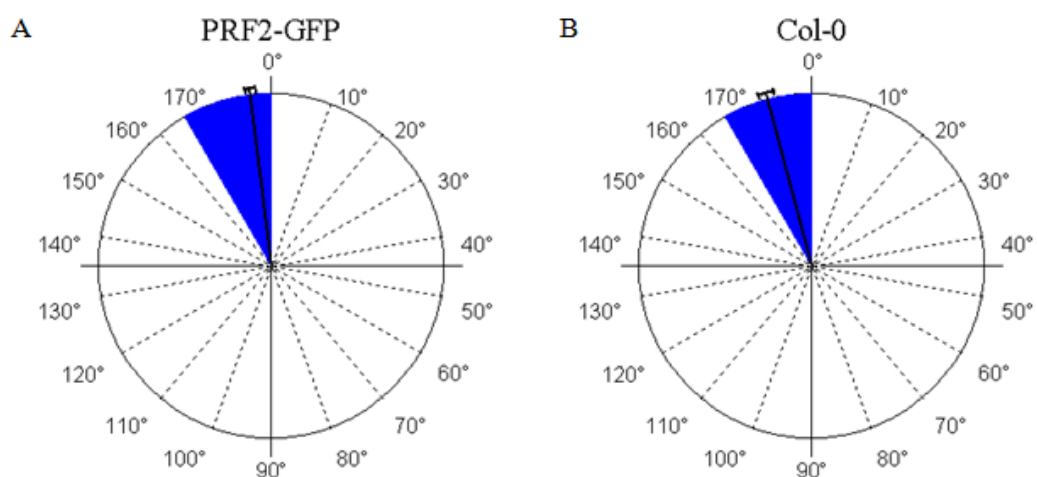
U epidermálních buněk kořene také nebyl naměřený výrazný rozdíl v úhlu průměrné orientace F-aktinu u transgenní linie exprimující PRF2-GFP v porovnání s divým typem Col-0. V epidermálních buňkách kořene transgenní linie exprimující PRF2-GFP jsou aktinová vlákna orientována pod úhlem 177° u divého typu Col-0 činí tato hodnota 172° (Obr. 25A, 25B).



Obr. 23 Vizualizace F-aktinu v epidermálních buňkách kořene transgenní linie exprimující PRF2- GFP pomocí faloidinu značeného Alexa Fluor 568. Měřítko odpovídá $10\ \mu\text{m}$.



Obr. 24 Vizualizace F-aktinu v epidermálních buňkách kořene Col- 0 pomocí faloidinu značeného Alexa Fluor 568. Měřítka odpovídá 10 μm .



Obr. 25 Graf znázorňující úhly, pod kterými je F-aktin orientován v epidermálních buňkách kořene transgenní linie exprimující PRF2- GFP (A) a divého typu Col- 0 (B).

Z těchto výsledků lze usoudit, že mezi transgenními liniemi exprimujícími PRF-GFP a divým typem Col-0 se nenacházejí patrné rozdíly v orientaci F-aktinu v epidermálních buňkách klíčnicích listů, hypokotylu a kořene.

5 DISKUZE

První úlohou experimentální části byla optimalizace podmínek kultivace rostlin v stresových podmínkách *in vitro*. V experimentu byly jako kontrola použity rostliny divého typu Col-0, dále rostliny transgenní nadexpresní linie exprimující konstrukt *35S::PRF2:GFP* a transgenní linie stabilně exprimující konstrukt *35S::pMAT:GFP*. Sledoval se vliv dlouhodobého působení solného ($100 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ NaCl}$) a oxidativního ($0,5 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1} \text{ PQ}$) stresu na viabilitu a růst rostlin.

Solný stres nepříznivě ovlivňuje především vývoj, růst (redukce plochy listů a kořenového systému) a viabilitu rostlin (Yadav *et al.*, 2011; Carillo *et al.*, 2011; Chartzoulakis a Klapaki, 2000). Ionty chloridu sodného (Na^+ a Cl^-) ve zvýšené koncentraci působí uvnitř buněk toxicky na buněčné membrány a cytosol (Kader a Lindberg, 2010). To odpovídá výsledkům získaných při tomto experimentu. Rostliny na stresových médiích měly oproti kontrolním rostlinám méně vyvinuté listové růžice i kořenový systém (Obr. 3B, 4B). Transgenní linie exprimující PRF2-GFP i přes přítomnost solného stresu vykazovala vysokou viabilitu a lepší růst, a proto, jak vyplývá z našich experimentů je na dlouhodobé působení solného stresu odolnější než rostliny transgenní linie pMAT-GFP a divého typu Col-0 (Obr. 3B, 4B). Pro oxidativní stres je typická tvorba ROS, které vznikají vlivem abiotického stresu (Suzuki *et al.*, 2011). Rostliny se nejsou schopny při nadměrné tvorbě ROS přirozeně vyvíjet a růst. To vyplývá i z našeho experimentu. Rostliny na stresových médiích s PQ měly oproti kontrolním rostlinám menší listové růžice, listy byly stočené a kořenový systém hůře vyvinutý (Obr. 5B, 6B). Transgenní linie exprimující PRF2-GFP vykazovala nejvyšší viabilitu, nedošlo u ní k výraznému stočení listů a objevily se u ní i přes přítomnost oxidativního stresu výhonky květů (Obr. 6B). Oproti transgenní linii pMAT-GFP a divému typu Col-0 je tedy transgenní linie exprimující PRF2-GFP na působení dlouhodobého oxidativního stresu odolnější.

Ve druhé části byla provedena histochemická detekce produkce ROS roztokem NBT a DAB v nadexpresní linii PRF2-GFP, transgenní linii pMAT-GFP a divém typu Col-0 po krátkodobém působení solného a oxidativního stresu. ROS jsou vedlejšími produkty aerobního metabolismu a tvoří se během abiotického stresu (Suzuki *et al.*, 2011). I z našich výsledků je patrné, že během působení abiotických stresů k tvorbě ROS došlo, což je patrné z jejich histochemické detekce. Po působení obou abiotických stresů byla u transgenní linie exprimující PRF2-GFP detekována roztokem DAB nižší

tvorba H_2O_2 v porovnání s transgenní linií pMAT-GFP a divým typem Col-0, což se projevilo zvýšenou intenzitou zabarvení klíčních listů a pravých listů listových růžic. Transgenní linie exprimující PRF2-GFP je tedy na krátkodobé působení solného i oxidativního stresu odolnější (Obr. 7, 8). Naopak při histochemické detekci $O_2^{\cdot-}$ roztokem NBT došlo oproti kontrolním podmínkám při působení stresů k jeho snížené tvorbě u všech použitých linií (Obr. 9, 10).

Třetí část experimentální práce byla zaměřena na *in vivo* lokalizaci fúzního proteinu PRF-GFP v buňkách transgenní linie exprimující PRF2-GFP po působení oxidativního stresu a inhibitorů cytoskeletu. Profilin, aktin- vázající protein vyskytující se ve všech eukaryotech, je důležitý pro dynamiku aktinu (Fan *et al.*, 2013). Jeho lokalizace je především v cytoplasmě a jaderné membráně (Kandasamy *et al.*, 2002b). PRF2 jako jedna z pěti isoform aktinu náleží do vegetativní třídy (Fan *et al.*, 2013). Profiliny regulují interakce mezi aktinovým cytoskeletem, cytoplasmatickou membránou a vezikulárním transportem prostřednictvím aktinového cytoskeletu (Sun *et al.*, 2013). Pro sledování vlivu krátkodobého oxidativního stresu byl použit $15 \mu\text{mol.l}^{-1} H_2O_2$. Během působení oxidativního stresu došlo ke zvýšení abundance fúzního proteinu PRF2-GFP. (Obr. 11, 12). Pro sledování vlivu inhibitorů byl použit $1 \mu\text{mol.l}^{-1}$ taxol, způsobující stabilizaci MT a $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$ latrunkulin B, který depolymerizuje AF. Latrunkulin B je inhibitor, který u semenáčků *A. thaliana* zpřičiňuje rychlou depolymerizaci AF už do jedné hodiny od aplikace (Baluška *et al.*, 2001). To se potvrdilo i v našem experimentu, ve kterém došlo po 60 min působení latrunkulinu B k poklesu intenzity fluorescence a tím i abundance PRF2-GFP. Po vymytí latrunkulinu B $\frac{1}{2}$ MS médiem došlo k nárůstu fluorescence a po následném přidání taxolu se intenzita fluorescence opět zvyšovala (Obr. 15, 16). Působením inhibitoru taxolu došlo k nárůstu intenzity fluorescence a po jeho vymytí $\frac{1}{2}$ MS médiem se intenzita fluorescence blížila hodnotě před jeho aplikací (Obr 13, 14). Na základě těchto výsledků byla prokázána interakce PRF2 s aktinovým cytoskeletem i MT. Součástí třetí experimentální části byla i vizualizace F-aktinu v epidermálních buňkách klíčných listů, hypokotylů a kořenů transgenní linie exprimující PRF2-GFP a divého typu Col-0 (Obr. 17, 18, 20, 21, 23, 24). Z těchto výsledků vyplývá, že mezi transgenní linií exprimující PRF2-GFP a divým typem Col-0 se nenacházejí výrazné rozdíly v orientaci F- aktinu v epidermálních buňkách klíčních listů, hypokotylu a kořene (Obr. 19A, 19B 22A, 22B, 25A, 25B).

6 ZÁVĚR

Bakalářská práce byla rozdělena na teoretickou a experimentální část. V teoretické části byla představena modelová rostlina *A. thaliana* a její výhodné využití v mnoha oblastech výzkumu. Dále byl popsán rostlinný cytoskelet, konkrétně struktura a funkce MT a AF. Část literárního přehledu byla také věnována proteinům vázajících aktin, z nichž byly podrobně charakterizovány profily. Popsána byla jejich úloha a vliv na vývoj rostlin. Zmíněn byl i MAPK signaling a funkce rostlinných MAPK. Poslední část se zabývala abiotickým stresem (solný, oxidativní) a jeho dopady na vývoj rostlin.

Součástí experimentální části bylo sledování vlivu dlouhodobého působení solného a oxidativního stresu na viabilitu a růst transgenní linie exprimující PRF2-GFP, pMAT-GFP a divého typu Col-0. Abiotický stres měl na rostliny negativní dopad především v redukovaném vývoji listové růžice a kořenového systému. Dlouhodobé působení oxidativního stresu se navíc projevilo stočením listů. Transgenní linie exprimující PRF2-GFP vykazující v průběhu experimentu vyšší viabilitu a lepší růst byla na dlouhodobé působení obou abiotických stresů oproti transgenní linii pMAT-GFP a divému typu Col-0 odolnější.

Ve druhé části byla provedena histochemická detekce ROS v transgenní nadexpresní linii PRF2-GFP, transgenní linii pMAT-GFP a divém typu Col-0. Po působení solného i oxidativního stresu byla detekována nejnižší tvorba H_2O_2 u transgenní linie exprimující PRF2-GFP, která je tak na jejich působení odolnější. V případě histochemické detekce $O_2^{\cdot -}$ roztokem NBT došlo po krátkodobém působení solného a oxidativního stresu u všech použitých linií k jeho snížené produkci.

Ve třetí části byla provedena *in vivo* lokalizace PRF2-GFP v odpovědi rostlinných buněk na působení oxidativního stresu a inhibitory cytoskeletu (taxol a latrunkulin B). Působením oxidativního stresu došlo ke zvýšení abundance fúzního proteinu PRF2-GFP v epidermálních buňkách hypokotylu. Stejný vliv byl dosažen působením taxolu. V případě latrunkulinu B byla intenzita fluorescence fúzního proteinu PRF2-GFP snížena, po jeho vymytí ½ MS médiem došlo k jejímu nárůstu a po následné aplikaci taxolu se intenzita fluorescence fúzního proteinu opět zvýšila. V této části byla provedena také vizualizace F- aktinu v různých typech epidermálních buněk transgenní linie exprimující PRF2-GFP a divého typu Col-0. Z těchto výsledků vyplývá, že orientace F- aktinu je v epidermálních buňkách klíčních listů, hypokotylu i kořene u transgenní linie exprimující PRF2-GFP a divého typu Col-0 podobná.

7 LITERATURA

- Asada K. (1994): Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissue. In: *In Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants*. Vol. 1, (Foyer C. H. and Mullineaux P. M., eds), Boca Raton, CRC Press, 77-104.
- Baluška F., Jasik J., Edelmann H. G., Salajová T., Volkmann D. (2001): Latrunculin B-induced plant dwarfism: Plant cell elongation is F-actin-dependent. *Developmental Biology*. **231**, 113-124.
- Beck M., Komis G., Ziemann A., Menzel D., Šamaj J. (2011): Mitogen-activated protein kinase 4 is involved in the regulation of mitotic and cytokinetic microtubule transitions in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*. **189**, 1069-1083.
- Atkinson N. J., Urwin P. E. (2012): The interaction of plant biotic and abiotic stresses: From genes to the field. *Journal of Experimental Botany* **63**, 3523-3543.
- Burbank K. S., Mitchison T. J. (2006): Microtubule dynamic instability. *Current Biology* **14**, R516-R517.
- Carillo P., Annunziata M. G., Pontecorvo G., Fuggi A., Woodrow P. (2011): Salinity Stress and salt tolerance. In: *Abiotic Stress in Plants- Mechanisms and Adaptations*. (Prof. Shanket A. ed.), In Tech, 22-38.
- Carrier M. F., Pantaloni D. (1997): Control of actin dynamics in cell motility. *Journal of Molecular Biology* **269**, 459-467.
- Colcombet J., Hirt H. (2008): Arabidopsis MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochemical Journal* **413**, 217-226.
- Cramer G. R., Urano K., Delrot S., Pezzotti M., Shinozaki K. (2011): Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC Plant Biology* **11**, 163.
- Fan T., Zhai H., Shi W., Wang J., Jia H., Xiang Y., An L. (2013): Overexpression of profilin 3 affects cell elongation and F- actin organization in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports* **32**, 149-160.
- Fletcher D. A., Mullins R. D. (2010): Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* **463**, 485-492.
- Foyer C. H., Noctor G. (2005): Oxidant and antioxidant signalling in plants: A re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell & Environment*. **28**, 1056-1071.
- Franklin-Tong V. E., Gourlay C. W. (2008): A role for actin in regulating apoptosis programmed cell death: evidence spanning yeast, plants and animals. *Biochemical Journal* **413**, 389-404.
- Greene R. (2002): Oxidative Stress and Acclimation Mechanisms in Plants. In: *The Arabidopsis Book*. Vol. 49, BioOne Publishers, Washington, 1-20.
- Hashimoto, T. (2015): Microtubules in plants. *The Arabidopsis Book* e0179, 2-20.
- Hamada T. (2007): Microtubule-associated proteins in higher plants. *Journal of Plant Research* **120**, 79-98.

- Henty-Ridilla J. L., Li J., Blanchoin L., Staiger C. J. (2013): Actin dynamics in the cortical array of plant cells. *Current Opinion in Plant Biology* **16**, 678-687.
- Higaki T., Sano T., Hasezawa S. (2007): Actin microfilament dynamics and actin side-binding proteins in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **10**, 549–556.
- Huber F., Schnauß J., Rönicke S., Rauch P., Müller K., Fütterer C., Käs J. (2013): Emergent complexity of the cytoskeleton: From single filaments to tissue. *Advances in Physics* **62**, 1-112.
- Huh G., Damsz B., Matsumoto T. K., Reddy M. P., Rus A. M., Ibeas J. I., Narasimhan M. L., Bressan R. A., Hasegawa P.M. (2002): Salt causes ion disequilibrium-induced programmed cell death in yeast and plants. *The Plant Journal* **29**, 649-659.
- Hussey P. J., Allwood E. G., Smertenko A. P. (2002): Actin- binding proteins in *Arabidopsis* genome database: properties of functionally distinct plant actin- depolymerizing factors/ cofilins. *The Royal Society* **357**, 791-798.
- Chartzoulakis K., Klapaki G. (2000): Response of two greenhouse pepper hybrids to NaCl salinity during different growth stages. *Scientia Horticulturae*. **86**, 247-260.
- Ichimura K., Shinozaki K., Tena G., Sheen J., Henry Y., Champion A., Kreis M., Zhang S., Hirt H., Wilson C., Heberle-Bors E., Ellis B. E., Morris P.C., Innes R.W., Ecker J.R., Scheel D., Klessig D.F., Machida Y., Mundy J., Ohashi Y., Walker J.C. (2002): Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends InPlant Science* **7**, 301-308.
- Jones J. D. G., Dangl J. L. (2006): The plant immune system. *Nature* **444**, 323-329.
- Kader M. A., Lindberg S. (2010): Cytosolic calcium and pH signaling in plants under salinity stress. *Plant Signaling and Behavior* **5**, 233-238.
- Kandasamy M. K., McKinney E. C., Meagher R. B. (2002a): Functional nonequivalency of actin isoforms in *Arabidopsis*. *Molecular Biology of the Cell* **13**, 251-261.
- Kandasamy M. K., McKinney M. C., Meagher R. B. (2002b): Plant profilin isoforms are distinctly regulated in vegetative and reproductive tissues. *Cell Motility and the Cytoskeleton* **52**, 22-23.
- Khan M. N., Siddiqui M. H., Mohammad F., Naeem M. (2012): Interactive role of nitric oxide and calcium chloride in enhancing tolerance to salt stress. *Nitric Oxide* **27**, 210-218.
- Koorneef M., Meinke D. (2010): The development of *Arabidopsis* as a model plant. *The Plant Journal* **61**, 909-921.
- Kost B., Chua N. H. (2002): The Plant Cytoskeleton: Vacuoles and Cell Walls Make the Difference. *Cell Press* **108**, 9-12.
- Krtková J., Benáková M., Schwarzerová K (2016): Multifunctional Microtubule-Associated Proteins in Plants. *Frontiers In Plant Science* **7**, 1-13.
- Laohavisit A., Colaco R., Davies J. (2012): Cytosolic Ca²⁺ determinations in studying plant responses to salinity and oxidative stress. *Methods of Molecular Biology* **913**, 163-71.
- Lee J. S., Ellis B. E. (2007): *Arabidopsis* MAPK Phosphatase 2 (MKP2) positively regulates oxidative stress tolerance and inactivates the MPK3 and MPK6 MAPKs. *The Journal of Biological Chemistry* **282**, 25020-25029.

- Lee J., Eschen-Lippold L., Lassowskat I., Böttcher Ch., Scheel D. (2015): Cellular reprogramming through mitogen-activated protein kinases. *Frontiers in Plant Science* **6**, 1-11.
- Li J., Blanchoin L., Staiger C. J. (2014): Signaling to actin stochastic dynamics. *Annual Review of Plant Biology* **66**, 415-440.
- Liu Y. (2012): Roles of mitogen-activated protein kinase cascades in ABA signaling. *Plant Cell Reports* **31**, 1-12.
- Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser C. A., Krieger M., Scott M. P., Zipursky S. L., Darnell J. (2003): Microfilaments and intermediate filaments. In: *Molecular Cell Biology*. Vol 5, (W. H. Freeman ed.), New York, 779-815.
- Mano S., Hayashi M., Nishimura M. (1999): Light regulates alternative splicing of hydroxypyruvate reductase in pumpkin. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*. **17**, 309-320.
- Mc Kinney E. C., Kandasamy M. K., Meagher R. B. (2001): Small changes in the regulation of one Arabidopsis profilin isoform, PRF1, alter Seedling Development. *The Plant Cell* **13**, 1179-1191.
- Meinke D. W., Cherry J. M., Dean C., Rounsley S. D., Koorneef M. (1998): *Arabidopsis thaliana*: A Model Plant for Genome Analysis. *Science* **282**, 662-682.
- Miller G., Suzuki N., Ciftci-Yilmaz S., Mittler R. (2010): Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant Cell Environment* **33**, 453–67.
- Müller J., Beck M., Mettbach U., Komis G., Hause G., Menzel D. (2010): Arabidopsis MPK6 is involved in cell division plane control during early root development, and localizes to the pre-prophase band, phragmoplast, trans-Golgi network and plasma membrane. *Plant Journal* **61**, 234-248.
- Müller-Reichert T., Chrétien D., Severin F., Hyman A. A. (1998): Structural changes at microtubule ends accompanying GTP hydrolysis: Information from a slowly hydrolyzable analogue of GTP, guanylyl-(α,β)-methylene-diphosphonate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 3661-3666.
- Munns R., Tester M. (2008): Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* **59**, 651–81.
- Müssar K. J., Kandasamy M. K., McKinney E. C., Meagher R.B. (2015): *Arabidopsis* plants deficient in constitutive class profilins reveal independent and quantitative genetic effects. *BMC Plant Biology* **15**, 2-16.
- Nogales E., Whittaker M., Milligan R. A., Downing K. H. (1999): High-resolution model of the microtubule. *Cell* **96**, 79-88.
- Pantaloni D., Le Clainche C., Carlier M. F. (2001): Mechanism of actin- based motility. *Science* **292**, 1502-1506.
- Patakas A. (2012): Abiotic Stress-induced morphological and anatomical changes in plants. In: *Abiotic Stress Responses in Plants*. (Ahmad P., Prasad M.N.V. eds.), Springer-Verlag, New York, 473-474.

- Paulus K. E., Schmid B., Zajic D., Schäfer A., Mahler V., Sonnewald U. (2012): Hypoallergenic profilin – a new way to identify allergenic determinants. *FEBS Journal* **279**, 2727-2736.
- Pei W., Du F., Zhang Y., He T., Ren H. (2012): Control of the actin cytoskeleton in root hair development. *Plant Science* **187**, 10-18.
- Perl-Treves R., Perl A. (2002): Oxidative stress: An introduction. In: *Oxidative Stress in Plants*. (Inzé D., Van Montagu M. eds.). Taylor & Francis, London and New York, 1-32.
- Pina C., Pinto F., Feijó J. A., Becker J. D. (2005): Gene family analysis of the Arabidopsis pollen transcriptome reveals biological implications for cell growth, division control, and gene expression regulation. *Plant Physiology* **138**, 744-756.
- Pitzsche A. (2015): Modes of MAPK substrate recognition and control. *Trends in Plant Science* **20**, 49-55.
- Pitzschke A., Hirt H. (2009): Disentangling the complexity of mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species signaling. *Plant Physiology* **149**, 606-615.
- Porter K., Day B. (2016): From filaments to function: The role of the plant actin cytoskeleton in pathogen perception, signaling and immunity. *Journal of Integrative Plant Biology* **58**, 299-311.
- Ramachandran S., Christensen H. E. M., Ishimaru Y., Dong Ch., Chao- Ming W., Cleary A. L., Chua N. (2000): Profilin plays a role in cell elongation, cell shape maintenance, and flowering in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **124**, 1637-1647.
- Rasmussen M. W., Roux M., Petersen M., Mundy J. (2012): MAP kinase cascades in *Arabidopsis* innate immunity. *Frontiers in Plant Science* **3**, 169.
- Rizhsky L., Liang H., Shuman J., Shulaev V., Davletova S., Mittler R. (2004): When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiology* **134**, 1683-1696.
- Rodriguez M. C., Petersen M., Mundy J. (2010): Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* **61**, 621–649.
- Santos A., Van Ree R. (2011): Profilins: Mimickers of allergy or relevant allergens? *International Archives of Allergy and Immunology* **155**, 191204.
- Sasabe M., Machida Y. (2012): Regulation of organization and function of microtubules by the mitogen-activated protein kinase cascade during plant cytokinesis. *Cytoskeleton* **69**, 913-918.
- Sham A., Moustafa K., Al-Ameri S., Al-Azzawi A., Iratni R., AbuQamar S. (2015): Identification of *Arabidopsis* candidate genes in response to biotic and abiotic stresses using comparative microarrays. *PloS One*. **10**, 1-21.
- Sinha A. K., Jaggi M., Raghuram B., Tuteja N. (2011): Mitogen-activated protein kinase signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signaling and Behavior* **6**, 196-203.
- Smékalová V., Doskočilová A., Komis G., Šamaj J. (2014): Crosstalk between secondary messengers, hormones and MAPK modules during abiotic stress signalling in plants. *Biotechnology Advances* **32**, 2-11.
- Sparkes I. (2011): Recent advances in understanding plant myosin fiction: Life in the fast lane. *Molecular Plant* **4**, 805-812.

- Staiger C. J., Blanchoin L. (2006): Actin dynamics: old friends with new stories. *Current Opinion in Plant Biology* **9**, 554-562.
- Staiger C. J., Lloyd C. W. (1991): The plant cytoskeleton. *Current Opinion in Cell Biology* **3**, 33-42.
- Staiger C. J., Poulter N. S., Henty J. L., Franklin-Tong V. E., Blanchoin L. (2010): Regulation of actin dynamics by actin-binding proteins in pollen. *Journal of Experimental Botany* **61**, 1969-1986.
- Sun T., Li S., Ren H. (2013): Profilin as a regulator of the membrane- actin cytoskeleton interface in plant cells. *Frontiers in Plant Sciences* **4**, 1-7.
- Suzuki N., Miller G., Morales J., Shulaev V., Torres M. A., Mittler R. (2011): Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. *Current Opinion in Plant Biology* **14**, 691-699.
- Šamaj, J., Baluška, F., Hirt, H. (2004): From signal to cell polarity: mitogen-activated protein kinases as sensors and effectors of cytoskeleton dynamicity. *Journal of Experimental Botany*, **55**, 189-198.
- Šamajová O., Plíhal O., Al-Yousif M., Hirt H., Šamaj J. (2013a) Improvement of stress tolerance in plants by genetic manipulation of mitogen-activated protein kinases. *Biotechnology. Advances*. **31**, 118-128.
- Šamajová O., Komis G., Šamaj J. (2013): Emerging topics in the cell biology of mitogen-activated protein kinases. *Trends in Plant Science* **18**, 140-148.
- Takáč T., Pechan T., Richter H., Müller J., Eck C., Böhm N., Obert B., Ren H., Niehaus K., Šamaj J. (2011): Proteomics on Brefeldin A-treated *Arabidopsis* roots reveals profilin 2 as a new protein involved in the cross-talk between vesicular trafficking and the actin cytoskeleton. *Journal of Proteome Research* **10**, 488-501.
- Takáč T., Šamajová O., Vadovič P., Pechan T., Košútová P., Ovečka M., Husičková A., Komis G., Šamaj J. (2014): Proteomic and biochemical analyses show a functional network of proteins involved in antioxidant defense of the *Arabidopsis anp2anp3* double mutant. *Journal of Proteome Research* **13**, 5347-5361.
- Tena G., Boudsocq M., Sheen J. (2011): Protein kinase signaling networks in plant innate immunity. *Current Opinion in Plant Biology* **14**, 519-529.
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000): Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*. **408**, 796-815.
- Valster A. H., Pierson E. S., Valenta R., Hepler P. K., Emons A. M. C. (1997): Probing the plant actin cytoskeleton during cytokinesis and interphase by profilin microinjection. *The Plant Cell* **9**, 1815-1824.
- Vidali L., Augustine R. C., Kleinman K. P., Bezanilla M. (2007): Profilin is essential for tip growth in the moss *Physcomitrella patens*. *The Plant Cell* **19**, 3705-3722.
- Wade R. H. (2009): On and around microtubules: An overview. *Molecular Biotechnology* **43**, 177-191.
- Wang F., Jing Y., Wang Z., Mao T., Šamaj J., Yuan M., Ren H. (2009): *Arabidopsis* profilin isoforms, PRF1 and PRF2 show distinctive binding activities and subcellular distributions. *Journal of Integrative Plant Biology* **51**, 113-121.

- Xu J., Zhang S. (2015): Mitogen-activated protein kinase cascades in signaling plant growth and development. *Trends in Plant Science* **20**, 56-64.
- Yadav S., Irfan M., Ahmad A., Hayat S. (2011): Causes of salinity and plant manifestations to salt stress: a review. *Journal of Environmental Biology* **32**, 667–85.
- Ye J., Zheng Y., Yan A., Chen N., Wang Z., Huang S., Yang Z. (2009): Arabidopsis Formin3 directs the formation of actin cables and polarized growth in pollen tubes. *The Plant Cell* **21**, 3868-3884.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

+ TIPs	proteiny vážící se na (+) konec mikrotubulů
<i>A.thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ABA	kyselina abscisová
ABP	aktin vázající protein
ADF	aktin depolymerizující factor
ADP	adenosindifosfát
AF	aktinová filamenta
ARP 2/3	aktin-asociované proteiny 2/3
ATP	adenosintrifosfát
BDM	2,3- butadion- monoxim
BFA	brefeldin A
CAP	cyklasa asociovaný protein
C _c	kritická koncentrace
Col- 0	ekotyp Columbia- 0
CP	zakrývající protein
F- aktin	filamentární aktin
FIM 3	fimbrin3
FIM 4	fimbrin 4
FIM 5	fimbrin 5
G- aktin	globulární aktin
GA	Golgiho aparát
GDP	guanosindifosfát
GTP	guanosintrifosfát
IgE	imunoglobulin E
Jas	jasplakinolidu
KIM	kinesinový interakční motiv
LatB	latrunkulinB
MAP	proteiny asociované s mikrotubuly
MAPK	mitogen- aktivované protein kinasy
MAPKK	mitogen- aktivované protein kinasy kinasy
MAPKKK	mitogen- aktivované protein kinasy kinasy kinasy
MT	mikrotubuly

PAMPs	patogenem aktivované molekulární vzory
PIP2	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
PLP	poly- L- prolin
pMAT- GFP	transgenní linie <i>A. thaliana</i> stabilně exprimující konstrukt <i>35S::pMAT:GFP</i>
PRF 1	profilin 1
PRF 2	profilin2
PRF 3	profilin 3
PRF2- GFP	transgenní nadexpresní linie exprimující konstrukt <i>35S::PRF2:GFP</i>
PRF4	profilin 4
PRF5	profilin 5
Pri	prieurianin
PRRs	rozpoznávací receptory
RNS	reaktivní formy dusíku
ROS	reaktivní formy kyslíku
SOD	superoxid dismutase
WASP	Wiskott–Aldrich syndrome protein
γ TuC	γ -tubulinový komplex