

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2017**

**Ondřej Jahoda**

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Úloha kryptochromů v regulaci akvaporinů v  
průběhu klíčení semen *Arabidopsis***

**Bakalářská práce**

**Ondřej Jahoda**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2017**

**Vedoucí práce: prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.**

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně za použití uvedených literárních zdrojů pod vedením prof. RNDr. Martina Fellnera, Ph.D.

V Olomouci dne 31. 7. 2017

Rád bych poděkoval svému vedoucímu práce prof. RNDr. Martinu Fellnerovi, Ph.D. za jeho vstřícnost, ochotu a cenné rady, které mi poskytl při zpracování teoretické i experimentální části mé bakalářské práce. Dále bych chtěl poděkovat kolektivu Skupiny molekulární fyziologie za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

# Souhrn

Předložená bakalářská práce je zaměřena na studium citlivosti klíčení semen fotomorfogenních mutantů *Arabidopsis thaliana* L. (Heynh.) v podmínkách *in vitro* k inhibitoru akvaporinů HgCl<sub>2</sub> v závislosti na světelných podmínkách. Cílem práce bylo zjistit, zda rostlinné akvaporiny hrají úlohu v klíčení semen, zda jejich aktivita či množství může být ovlivněno modrým světlem, a kterými fotoreceptory může být účinek světla zprostředkován. Experimentálními rostlinami byly mutanti s defekty ve fotoreceptorech modrého světla kryptochomech (CRY1 a CRY2). Výsledky experimentů ukázaly, že klíčení semen *Arabidopsis* je redukováno inhibitorem HgCl<sub>2</sub>. Dále bylo zjištěno, že u všech genotypů s výjimkou mutanta *cry2-1* modré světlo zvyšovalo toleranci semen k inhibičnímu účinku HgCl<sub>2</sub>.

Na základě výsledků bakalářské práce jsme došli k následujícím závěrům: 1) Rostlinné akvaporiny jsou zapojeny v klíčení semen; 2) Modré světlo může ovlivňovat (zvyšovat) množství akvaporinů; 3) U *Arabidopsis* je ovlivnění akvaporinů modrým světlem pravděpodobně zprostředkováno fotoreceptorem CRY2.

# Summary

The presented bachelor thesis focuses on the study of the sensitivity of seed germination of photomorphogenic mutants of *Arabidopsis thaliana* L. (Heynh.) under *in vitro* conditions to an inhibitor of aquaporins HgCl<sub>2</sub>, depending on the light conditions. The aim of the study was to determine whether the plant aquaporins play a role in seed germination, whether their activity or amount may be affected by blue light, and which photoreceptors can mediate the effect of light. Mutants with a defect in blue light photoreceptors cryptochrome CRY1 and CRY2 were used as experimental plants. The results of experiments showed that the germination of *Arabidopsis* seeds is reduced by inhibitor HgCl<sub>2</sub>. Furthermore, it was found that in all genotypes with the exception of the *cry2-1* mutant blue light increased the tolerance of seeds to the inhibitory effect of HgCl<sub>2</sub>.

Based on these results of the bachelor thesis we came to the following conclusions: 1) Plant aquaporins are involved in seed germination; 2) Blue light could affect (increase) the amount of aquaporins; 3) The effect of blue light on aquaporins is likely mediated by the photoreceptor CRY2 in *Arabidopsis*.

## Obsah

1	Úvod .....	7
2	Literární přehled .....	8
2.1	Vliv světla na růst a vývoj rostlin .....	8
2.1.1	Fotoreceptory .....	8
2.2	Klíčení .....	14
2.2.1	Fytohormony a klíčení .....	14
2.2.2	Faktory vnějšího prostředí ovlivňující klíčení .....	15
2.2.3	Vliv světla na klíčení .....	15
2.3	Akvaporiny .....	19
2.3.1	Struktura akvaporinu .....	20
2.3.2	Regulace akvaporinu .....	21
2.3.3	Akvaporiny a klíčení semen Arabidopsis .....	22
2.3.4	Akvaporiny a světlo .....	23
3	Materiál a metodika .....	24
3.1	Rostlinný materiál .....	24
3.2	Příprava MS média .....	25
3.3	Sterilizace a výsev semen .....	25
3.4	Hodnocení klíčení .....	26
4	Výsledky .....	27
4.1	Vliv světla na citlivost semen mutanta cry1-1 k HgCl <sub>2</sub> .....	27
4.2	Vliv světla na citlivost semen mutanta cry2-1 k HgCl <sub>2</sub> .....	28
5	Diskuze .....	31
6	Závěr .....	34
7	Seznam zkratek .....	35
8	Citovaná literatura .....	36

# 1 Úvod

Klíčení semene je pro rostlinu klíčový proces, který předchází dalšímu vývoji rostliny. Je tedy velice důležité, aby započal za co nejpříznivějších podmínek. Klíčovými faktory pro zahájení klíčení semene jsou světlo a množství vody. Pro rostliny, jakožto přisedlé organizmy, je vnímání vnějších podnětů zásadní pro jejich růst a vývoj. Takovýmto podnětem je i světlo. K vnímání světla slouží rostlinám molekulární senzory tzv. fotoreceptory. Důležitou složkou světelného spektra je modré světlo, neboť hraje u rostlin významnou roli v regulaci a modulaci mnoha různých vývojových procesů. K významným rostlinným fotoreceptorům patří kryptochromy, které jsou citlivé právě ve vnímání modrého světla a podílejí se na percepci a transdukci jeho signálu. Na rozdíl od stimulačního vlivu červeného světla na klíčení semen fotoblastických rostlin, který je zevrubně prostudován, je jen relativně mála pozornost věnována efektu modrého světla na klíčení, a to navzdory tomu, že je prokázáno vnímání modrého světla semeny rostlin (Goggin *et* Steadman, 2012). Rovněž studií a informací o roli kryptochromů ve vegetativních tkáních rostlin, je nepoměrně více, než informací o jejich roli ve vnímání světla v semenech (Goggin *et* Steadman, 2012). Akvaporiny jsou transmembránové kanálové proteiny, které usnadňují přepravu vody, malých neutrálních rozpuštěných látek a plynů přes buněčné membrány. To je předurčuje k zásadnímu významu pro hospodaření rostliny s vodou. I když řada mechanismů regulujících klíčení semen byla odhalena, mnoho dalších procesů není zatím objasněno. Příkladem je úloha akvaporinů v klíčení semen a jejich regulace modrým světlem.

Cílem předložené práce bylo zjistit, zda jsou akvaporiny zapojeny v klíčení semen, zda jejich aktivita, či množství mohou být v průběhu klíčení ovlivněny modrým světlem a pokud ano, zda je toto ovlivnění zprostředkováno kryptochromem 1 nebo kryptochromem 2. Pro odpovědi na tyto otázky byla zvolena strategie genetického přístupu, kdy bylo analyzováno klíčení mutantních semen *cry1-1* a *cry2-1* rostliny *Arabidopsis thaliana* L. (Heynh.) s defekty v genu kódujícím kryptochrom 1 nebo kryptochrom 2 v *in vitro* podmínkách s různou koncentrací inhibitoru akvaporinů a při různém světelném režimu (tma, modré světlo, červené světlo).

Bakalářská práce byla prováděna v Laboratoři růstových regulátorů Univerzity Palackého v Olomouci, ve Skupině molekulární fyziologie pod vedením prof. RNDr. Martina Fellnera, Ph.D.



## 2 Literární přehled

### 2.1 Vliv světla na růst a vývoj rostlin

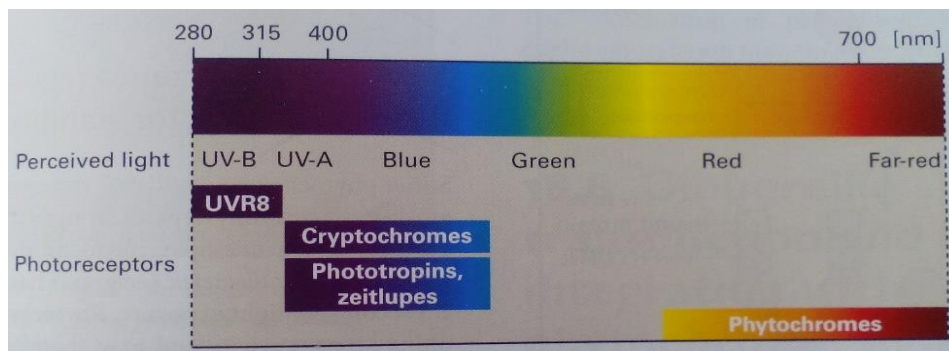
Světlo je jedním z klíčových faktorů vnějšího prostředí, který má vliv na růst a vývoj rostlin. Světlo neslouží jen jako primární zdroj energie pro fotosyntézu, ale je též zdrojem informací pro modulaci mnoha rostlinných vývojových procesů. V závislosti na kvalitě a množství světla rozlišujeme dvě základní cesty v rostlinném vývoji. Skotomorfogenezi (vývoj rostliny ve tmě) a fotomorfogenezi (vývoj rostliny na světle). Pro skotomorfogeneticky se vyvíjející rostliny je typický dlouhivý růst stonku, narušení syntézy a akumulace chlorofylu a potlačený růst listů. Tento skotomorfogenetický vývoj se nazývá etiolizace a je adaptací na dočasnou nepřítomnost světla. Ačkoliv se rostlina v průběhu života může dostat do skotomorfogeneze několikrát (např. hustý porost v jejím okolí, či zasypání půdou), skotomorfogenetický vývoj je typický hlavně pro mladé klíčící rostliny. Poté, co se rostlina dostane na světlo, dochází k de-etiolizaci. Tento přechod je u klíčících rostlin standardně spojen se snížením rychlosti elongace hypokotylu, srovnáním apikálního háčku, růstem listů a syntézou chlorofylu (Taiz *et* Zeiger, 2010).

Kromě morfogenních účinků má světlo též významný vliv na pohybové reakce rostliny. Tyto reakce mají adaptační charakter. Největší význam v indukci pohybových reakcí hraje modrá oblast spektra. Příkladem pohybových reakcí může být pozitivně orientovaný ohyb listů směrem ke zdroji světla, či pohyb samotných chloroplastů směrem ke světlu za účelem zvýšení výtěžku z fotosyntézy. Modré světlo má rovněž významný vliv na stimulaci otevírání průduchů. (Shimazaki *et al.*, 1986). Aby rostlina mohla monitorovat a přijímat vnější světelné signály, musí obsahovat molekulární světelné senzory nazývané fotoreceptory.

#### 2.1.1 Fotoreceptory

Většina fotoreceptorů se skládá z proteinové části (apoproteinu) spojené s chromoforem (světlo-absorbující pigment). Rostliny jsou prostřednictvím svých fotoreceptorů nejcitlivější k akčnímu spektru zahrnujícímu UV-B záření (280 až 320 nm), UV-A (320 až 380 nm), modré světlo (380 až 500 nm), červené světlo (620 až 700 nm) a dlouhovlnné červené světlo (700 až 800 nm) (Obr. č. 1). Obecnou vlastností fotoreceptorů je schopnost absorbovat příslušné světelné kvantum a schopnost měnit tento světelný signál na biologickou odpověď. Absorpce energetického kvanta způsobí konformační změnu fotoreceptoru, která vede ke změně jeho vlastností. Změněný

fotoreceptor posléze odstartuje signální kaskádu, která vede v konečném důsledku k změně transkripční aktivity a posléze k vyvolání samotné biologické odpovědi.



**Obr. č. 1:** Základní typy fotoreceptorů a oblastí, v nichž dochází k absorpci záření. (převzato z Buchanan, *et al.*, 2015)

### 2.1.1.1 Fytochromy

Fytochromy jsou modré pigmenty, které v rostlině slouží jako fotoreceptory červeného světla. Největší schopnost absorpce vykazují fytochromy v oblasti červeného světla a dlouhovlnného červeného světla (FR), ale jsou schopné absorbovat i v modré oblasti spektra (Taiz *et Zeiger*, 2010). Fytochromy se skládají z apoproteinu o velikosti cca 125 kDa, na nějž se kovalentně váže chromofor. Chromoforem je lineární tetrapyrrol, který se syntetizuje, nezávisle na syntéze apoproteinu, v plastidech. Spojení apoproteinu s chromoforem pak probíhá autokatalyticky v cytoplasmě, kdy se chromofor kovalentně váže přes atom síry cysteinového zbytku k N-konci apoproteinu (Pavlová *et Fischer*, 2011). Takto vzniklé monomery se spojují do funkčních dimerů.

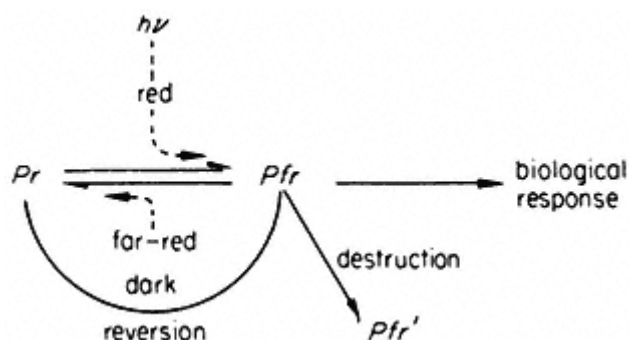
Fytochromové apoproteiny jsou kódovány několika různými geny náležícími jedné genové rodině. Kupříkladu u *Arabidopsis* bylo objeveno 5 příbuzných genů *PHYA-PHYE*, které kódují fytochromové apoproteiny (Mathews *et Sharrock*, 1997). Podle stability fytochromů na světle, se fytochromy dělí do dvou základních skupin – typ I a typ II. Fytochromy typu I jsou foto-labilní a jejich apoprotein je kódován genem *PHYA*. Fytochromy typu II jsou foto-stabilní a jejich apoprotein je kódován geny *PHYB-PHYE*. Bylo zjištěno, že u etiolizovaných klíčnicích rostlin *Arabidopsis* je ve tmě celkové extrahované množství fytochromů 23x vyšší než na světle. Poměr fytochromů A : B : C : D : E je ve tmě 85 : 10 : 1,5 : 1,5 zatímco na světle činí 5 : 40 : 15 : 15 : 25 (Sharrock *et Clack*, 2002).

Funkční fytochrom se může nacházet v jedné ze dvou forem. V inaktivní formě Pr nebo fyziologicky aktivní formě Pfr. Charakteristickou vlastností fytochromů je pak schopnost konverze jedné formy v druhou a naopak (Obr. č. 2; Smith, 1977). Konverze

jednotlivých forem je závislá na vlnové délce světla. Forma Pr má maximum absorpce v oblasti krátkovlnného červeného světla, Pfr forma má absorpční maximum v oblasti dlouhovlnného červeného světla. Přeměna jedné formy v druhou se nazývá fototransformace (Pavlová *et Fischer*, 2011). Za žádných světelných podmínek nedochází k přeměně všech fytochromů do jediné formy, neboť absorpční spektra obou forem se částečně překrývají (Taiz *et Zeiger*, 2010).

**Obr. č. 2:** Přechod mezi fotoreverzibilními formami fytochromů.

Inaktivní forma Pr je schopna vlivem červeného světla přecházet v aktivní formu Pfr (fytochrom je uschopněn přenášet signál získaný absorpcí červeného světla k příslušným efektorům) případně je degradován. Aktivní forma Pfr po ozáření FR, rekonvertuje zpět do původní neaktivní formy (převzato ze Smith, 1977)



U rostlin vyvíjejících se ve tmě jsou fytochromy lokalizovány v cytoplasmě v neaktivní Pr formě. Po absorpci světelného kvanta vlnové délky náležící oblasti červeného světla dochází k translokaci aktivovaných fytochromů do jádra (Sakamoto *et al.*, 1996; Yamaguchi *et al.*, 1999). Aktivace fytochromů spočívá v jejich autofosforylaci a zisku serintreoninové transkinázové aktivity, prostřednictvím níž může fytochrom fosforylovat, a tedy i ovlivňovat další členy signální kaskády. Mezi fytochromy typu I a typu II existuje rozdíl v mechanismu i v rychlosti transportu do jádra. Základním předpokladem translokace fytochromů typu II do jádra je odhalení NLS (z angl. *nuclear localization signal*) místa na fytochromu, ke kterému dojde vlivem změny konformace při přechodu z neaktivní formy Pr na aktivní formu Pfr (Chen *et al.*, 2005). Transport fytochromů typu I je závislý na interakci s proteinem FHY1, který s fytochromem A tvoří komplex a obsahuje potřebnou signální sekvenci pro lokalizaci do jádra (Genoud *et al.*, 2008).

K realizaci změny transkripční aktivity zprostředkované fytochromy jsou nutné proteiny, které jsou schopny signál z fytochromů přijmout a následně se přímo vázat na DNA. Nejlépe charakterizovaná skupina takových proteinů je proteinová rodina PIFs (z angl. *phytochrom interacting factors*). PIFs jsou transkripční faktory, které působí jako represory genů, nezbytných pro přechod do fotomorfogeneze (Shin *et al.*, 2009; Stephenson *et al.*, 2009). Aktivované fytochromy proteiny PIFs v jádře fosforylují, což vede k jejich následné ubikvitinaci a degradaci v 26S proteazomu (Zhu *et al.*, 2015).

Reakce zprostředkované fytochromy jsou kategorizovány dle různých kritérií. Obecně užívaná a uváděná je kategorizace založená na kvalitě světla a množství potřebné energie, které fotomorfogenetickou reakci vyvolá. Dle těchto kritérií rozlišujeme VLFR (z *angl. very low fluence response*), což jsou reakce zprostředkované fytochromy PhyA, k jejichž vyvolání stačí pouze extrémně krátký nepatrný puls světelné energie. Dále pak LFR (z *angl. low fluence response*), což jsou reakce zprostředkované povětšinou fytochromy PhyB, k jejichž vyvolání je nutné určité relativně nízké množství světelné energie, při čemž nezáleží, zda je energie dodána v jednom, či ve více menších pulsech. Pro LFR reakci je typické, že může být zvrácena působení FR. Na příklad, bylo zjištěno, že po pulzu červeného světla či FR byl PhyA translokován do jádra buněk tabáku během 15 minut následující tmy, zatímco detekovatelné množství PhyB bylo v jádře přítomno až po dvouhodinovém působení červeného světla (Kircher *et al.*, 1999). Poslední kategorií je HIR (z *angl. high irradiance response*), což jsou reakce způsobené dlouhodobým nebo stálým působením červeného světla vysoké intenzity na fytochromy (Pavlová *et Fischer*, 2011).

### **2.1.1.2 Kryptochromy**

Kryptochromy jsou skupinou fotoreceptorů, která absorbuje v UV-A a v oblasti modrého světla. Jedná se o 70-80 kDa velké proteiny, které vykazují v oblasti N-domény významnou sekvenční homologii s mikrobiálními DNA fotolyázami (Cashmore *et al.*, 1999). Kryptochromy, stejně jako fotolyázy, váží v konzervativní části N-domény nekovalentně chromofory MTHF (methenyltetrahydrofolát) a FAD (flavinadenindinukleotid), ale neobsahují místa zodpovědná za reparační schopnosti fotolyáz (Todo *et al.*, 1996; Imaizumi *et al.*, 2000).

První kryptochrom byl objeven teprve v devadesátých letech minulého století u *Arabidopsis* analýzou genu mutanta *hy4*, který ve stádiu klíčení nereagoval na modré světlo inhibicí růstu hypokotylu, což je standartní reakce nemutovaných etiolizovaných klíčících rostlin (Ahmad *et Cashmore*, 1993). Analýza produktu genu *HY4* ukázala, že se jedná o fotoreceptor, a tak byl přejmenován na kryptochrom 1 (CRY1) (Lin *et al.*, 1995). Rostliny mají zpravidla více genů kódující kryptochromové apoproteiny. U *Arabidopsis* byl dále objeven kryptochrom 2 (CRY2) (Lin *et al.*, 1996), který je CRY1 funkčně velmi podobný, avšak CRY2 je na světle méně stabilní. Dále byl objeven CRY3 náležící do skupiny speciálních kryptochromů nazývaných CRY-DASH (Brudler *et al.*, 2003). CRY-DASH proteiny mají částečně zachovanou fotolyázovou aktivitu

tzn., že jsou schopny interagovat s jednovláknovou DNA a jsou schopny katalyzovat reparaci pyrimidinových dimerů (Pokorny *et al.*, 2008).

Bylo prokázáno, že se kryptochromy exprimují ve všech zkoumaných rostlinných pletivech. Na buněčné úrovni, jsou v neaktivním stavu, tj. ve tmě, kryptochromy lokalizované v jádře buňky. Na světle je část CRY1 transportována do cytosolu, zatímco CRY2 zůstávají v jádře (Wu *et Spalding*, 2007). Po přijetí fotonu o vlnové délce náležící modré oblasti spektra, dochází k excitaci kryptochromu, spojené s redukcí FAD na FADH, následné konformační změně C-domény proteinu a přenosu signálu vedoucího ke změně genové exprese. Dále bylo zjištěno, že ozářením CRY1 a CRY2 modrým světlem dochází k jejich fosforylaci (Shalitin *et al.*, 2002; Shalitin *et al.*, 2003) a tato fosforylace pozitivně koreluje s jejich fyziologickou aktivitou. U CRY2 bylo prokázáno, že světlem indukovaná fosforylace způsobuje jejich degradaci (Yu *et al.*, 2007). Přestože způsob, jakým je světelný signál transdukován, není ještě zcela detailně popsán, je všeobecně přijímáno, že světlem aktivované kryptochromy interagují s proteiny, které slouží jako regulátory genové exprese. Poměrně dobře prostudovaný způsob, jakým fotoaktivované kryptochromy mění genovou expresi ve prospěch fotomorfogenetického vývoje, je interakce C-domény kryptochromu s COP1 (Yang *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2001).

### **2.1.1.3 Úloha COP1 ve fotomorfogenezi**

COP1 (z *angl. Constitutively Photomorphogenic 1*), je ubikvitin E3 ligáza, která stěžejně ovlivňuje funkci fotoreceptorů a fotomorfogenetickou reakci rostlin (Deng *et al.*, 1991; Deng *et al.*, 1992). Mechanismus účinku COP1 spočívá v ubikvitinaci a následné degradaci řady významných transkripčních faktorů jako jsou HY5, HFR1, či LAF1 v 26S proteazomu (Saijo *et al.*, 2003; Seo *et al.*, 2003; Duek *et al.*, 2004; Jang *et al.*, 2005). Tyto transkripční faktory se váží na promotory genů, jejichž exprese zprostředkovává fotomorfogenetický vývoj. COP1 se rovněž podílí na degradaci fotoreceptorů PhyA a CRY2 (Seo *et al.*, 2004; Shalitin *et al.*, 2002) a je složkou nejen signálu zprostředkovaného kryptochromy, ale i fytochromy. Jak již bylo zmíněno výše, fotoaktivované kryptochromy v jádře interagují s COP1, čímž se podílí na inaktivaci jeho degradační funkce, což má za následek širokou změnu v transkripci genů a může se projevit až na úrovni změny celého vývojového programu.

#### 2.1.1.4 Fototropiny

Fototropiny jsou druhou významnou skupinou fotoreceptorů modrého světla. Podílejí se na světle indukovaných pohybových reakcích rostliny, jako jsou fototropismus, otevírání průduchů, či pohyby chloroplastů. Tyto reakce vedou k maximální fotosyntetické aktivitě. Fototropiny jsou asi 120 kDa velké proteiny, které ve své N-doméně obsahují dvě významné sekvence LOV1 a LOV2 (z *angl. Light/Oxygen/Voltage*), na něž se váží dvě molekuly FMN (flavinmononukleotid), které mají funkci chromoforů (Christie *et al.*, 1998; Christie *et al.*, 1999). Fototropin byl u *Arabidopsis* objeven analýzou mutantu *nph1*, který postrádal fototropní reakci hypokotylu, avšak na rozdíl od mutantu *hy4* (*cry1*) reagoval na modré světlo standardně inhibicí růstu hypokotylu. Gen *NPH1* byl přejmenován na *PHOT1* a jeho produkt byl nazván fototropin 1 (Christie *et al.*, 2007). V genomu *Arabidopsis* byl objeven ještě druhý gen pro fototropin, který byl nazván *PHOT2*. Data získaná při analýze fototropismu mutantní rostliny *phot1*, mutantní rostliny *phot2* a dvojitého mutantu *phot1/phot2* ukazují, že na výsledné fototropické reakci se podílejí oba fototropiny (Taiz *et Zeiger* 2010).

Spektroskopické studie ukázaly, že ve tmě je FMN k LOV sekvenci vázán nekovalentně, avšak po excitaci FMN světlem dochází ke kovalentní interakci mezi excitovaným FMN a cysteinem obsaženým LOV sekvenci (Schleicher *et al.*, 2004). Excitace FMN je spojena s konformačními změnami v C-doméně fototropinu, která se projeví vznikem serino-threoninové kinázové aktivity této domény a autofosforylací.

## 2.2 Klíčení

Klíčení je vývojový proces, kterým se embryo mění, za součinnosti dalších částí semene, v klíčnou rostlinu (Luštinec *et* Žárský 2005). V průběhu klíčení dochází k realizaci nového vývojového programu, který vede k vývoji embrya v autotrofní sporofyt. Pro klíčení je zásadní obnovení růstové a metabolické aktivity embrya. K tomu je ovšem nutné překonání fyziologické dormance semene. Dormance je klidový stav, kdy je metabolická aktivita semene snížena na minimum. Pro semena v dormanci je typické, že ačkoliv jsou životaschopná, neklíčí. Jedná se o fyziologickou adaptaci, která zamezuje vyklíčení semen v nevhodných časových a místních podmínkách.

### 2.2.1 Fytohormony a klíčení

V udržování a v překonání dormance, jakož i v procesu vyvolání klíčení hrají důležitou roli rostlinné hormony, především kyselina abscisová (dále jen ABA) a gibereliny (dále jen GA) (Graeber *et al.* 2012). ABA je charakterizována jako inhibiční fytohormon, jelikož na rozdíl od auxinů, cytokininů a giberelinů růstové procesy většinou inhibuje. Bylo pozorováno, že semena ABA deficientní mutantní rostliny klíčí rychleji, než semena nemutovaná (Frey *et al.*, 2011) a transgenní rostliny s konstitutivní expresí genů zajišťující biosyntézu ABA udržují svá semena ve stavu hluboké dormance (Nonogaki *et al.*, 2014). Zdá se, že inhibiční účinek ABA na klíčení je dán především represivním působením ABA na syntézu enzymů, které rozvolňují buněčné stěny (Muller *et al.*, 2006; Finch-Savage *et* Leubner-Metzger 2006).

Naproti tomu GA stimulují klíčení semen a chovají se při klíčení semen, napříč rostlinnými druhy, jako fyziologičtí antagonisté ABA. Bylo zjištěno, že zatímco GA deficientní mutanti u *Arabidopsis* vykazují hlubokou dormanci, mutantní semena s deaktivovaným genem pro GA degradující enzym GA2 oxidázu, vykazují sníženou dormanci (Yamauchi *et al.*, 2007; Shu *et al.*, 2013). Pozitivní vliv GA na klíčení semen spočívá v syntéze enzymů podílejících se na rozrušení pletiv, která obklopují embryo a v indukci syntézy hydrolytických enzymů, jež mobilizují zásobní látky z děloh a endospermu (Holdsworth *et al.*, 2008).

Kromě opačného vlivu ABA a GA na klíčení existuje mezi těmito fytohormony vztah reciproké suprese. Semena ABA deficientního mutantu *Arabidopsis* obsahují zvýšenou hladinu GA (Seo *et al.*, 2006) a naopak semena GA deficientního mutantu *Arabidopsis* obsahují zvýšenou hladinu ABA, oproti standardnímu stavu (Piskurewicz *et al.*, 2008). Přepínání mezi programem s převahou signalizace GA nad signalizací ABA,

který pozitivně ovlivňuje klíčení a programem opačným, je zajištěno složitou a sofistikovanou sítí vztahů mezi členy jednotlivých signálních kaskád, transkripčními faktory a fytohormony. Jedním z takových přepínačů je u *Arabidopsis* i protein HONSU, který je negativním regulátorem dormance, neboť souběžně inhibuje signalizaci ABA a aktivuje signalizaci GA (Kim *et al.*, 2013). V poměrně nedávné době byl charakterizován membránový transkripční faktor S2P, který přes aktivaci transkripčního faktoru bZIP17, řídí úroveň exprese negativních regulátorů ABA signalizace a oslabuje tak ABA signalizaci během klíčení (Zhou *et al.*, 2015).

### **2.2.2 Faktory vnějšího prostředí ovlivňující klíčení**

Pro nastartování klíčení semene jsou nutné příslušné stimuly např. dostatek vody pro rehydrataci vysušených pletiv semene, dostatek kyslíku pro respiraci, odpovídající teplota a u některých semen i vhodné světelné podmínky (Welbaum *et al.*, 1998). V závislosti na rychlosti příjmu vody, lze dle Bewley (1997), časový průběh klíčení a následný růst rozdělit do tří fází. První fáze, tzv. imbibice, spočívá v bobtnání semene, což je vratný fyzikální děj, kdy semeno díky nízkému vodnímu potenciálu přijímá samovolně vodu z vnějšího prostředí. K této fázi může v principu docházet i u semen, jež obsahují neživotaschopná embrya. Při imbibici semen *Arabidopsis* dochází v průběhu 12 h k prudkému snižování obsahu ABA (Liu *et al.*, 2009). Druhá latentní fáze je charakteristická prakticky nulovým příjmem vody semenem a zvyšující se citlivostí semen k signálům stimulujícím klíčení, např. GA. Vlivem těchto signálů dochází v semeni ke zvýšení respirace, mobilizaci zásobních látek a dlouhivému růstu embrya. Ve třetí fázi pak dochází k dalšímu přijímání vody, dělení buněk embrya a expanzi klíčící rostliny mimo semeno (Bewley 1997; Luštinec *et Žárský* 2005).

### **2.2.3 Vliv světla na klíčení**

Vliv světla na klíčení semen se nazývá fotoblastismus. Na základě toho, jak světlo ovlivňuje klíčení, rozlišujeme fotoblastismus kladný (světlo stimuluje klíčení), záporný (světlo inhibuje klíčení) a neutrální (klíčení probíhá bez ohledu na světelné podmínky). Fotoblastické reakce jsou zprostředkovány rostlinnými fotoreceptory (fytochromy, kryptochromy) a projevují se teprve při určitém stupni hydratace semen. Obecně platí, že kladně fotoblastická semena obsahují obvykle málo zásobních látek a musí být brzy schopna fotosyntézy. Naopak záporný fotoblastismus je typický pro rostliny, jejichž semena obsahují větší množství zásobních látek a jejichž klíčení probíhá v hlubších vrstvách půdy (Pavlová *et Fischer* 2011).

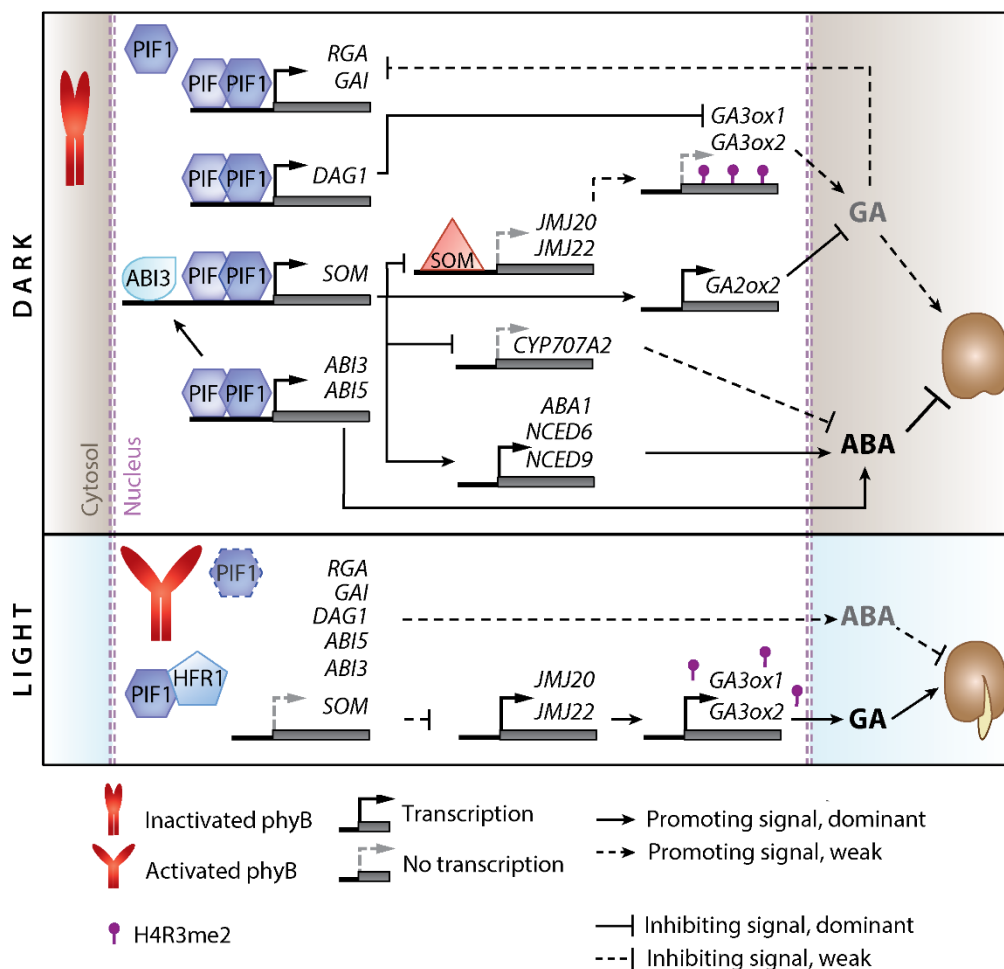


### 2.2.3.1 Červené světlo a klíčení

Červené světlo má stimulační účinek na klíčení semen kladně fotoblastických rostlin. Naproti tomu FR má na klíčení účinek inhibiční. Fenomén vzájemně antagonistického vztahu červeného světla a FR byl vysvětlen existencí dvou forem fytochromů, které jsou vzájemně fotokonvertabilní (viz kapitola Fytochromy). Klíčení *Arabidopsis* je povětšinou řízeno PhyB, přes LFR odpověď. Krátce po imbibici semene je klíčení ovlivňováno PhyB, které mohou být aktivovány prostřednictvím červeného světla, což vede k indukci klíčení, a naopak aktivní forma PhyB může být rekonvertovaná pomocí FR do inaktivní formy, což vede k inhibici klíčení. Na druhou stranu bylo zjištěno, že FR může indukovat klíčení zprostředkované přes PhyA (Shinomura *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2012). Kromě PhyA a PhyB je do klíčení *Arabidopsis* zapojen také PhyE (Hennig *et al.*, 2002).

Jak již bylo výše zmíněno, klíčení je ovlivněno především signalizací prostřednictvím rostlinných hormonů ABA a GA. Na regulaci drah těchto hormonů v semeni se z velké části podílí právě i červené světlo. Světlo totiž prostřednictvím fytochromů reguluje množství transkripčního elementu PIF1, který podporuje expresi genů podílejících se na metabolismu ABA i GA (Oh *et al.*, 2009). Regulace PIF1 je založena na jejich fosforylaci prostřednictvím světlem aktivovaných fytochromů a následné ubikvitinaci a degradaci, která vede k redukci jejich počtu (Zhu *et al.*, 2015). V podstatě se dá říct, že PIF1 potlačuje GA signalizaci, a naopak podporuje signalizaci zprostředkovanou ABA. U semen *Arabidopsis* bylo zjištěno, že PIF1 negativně ovlivňuje GA signalizaci indukcí exprese DELLA proteinů RGA a GAI (Oh *et al.*, 2007). Podstata negativní regulace tkví v podněcování syntézy antagonistické ABA právě prostřednictvím DELLA proteinů a podněcováním syntézy transkripčního regulátoru ABI3 (Piskurewicz *et al.*, 2009). ABI3 je na ABA signalizaci závislý transkripční regulátor, který aktivuje transkripci elementu SOMNUS (Park *et al.*, 2011). SOMNUS pak potlačuje expresi genů GA3 oxidáz, které zodpovídají za biosyntézu GA a zároveň aktivuje gen pro GA2 oxidázu, která se naopak podílí na inaktivaci GA, čímž negativně ovlivňuje množství GA a v semeni a posléze i signalizaci GA. Naproti tomu v případě ABA je situace přesně opačná, neboť SOMNUS aktivuje ABA anabolické geny *NCED6* a *NCDE9* a potlačuje ABA katabolický gen *CYP707A2*, což vede ke zvýšení hladiny ABA v semenech (Kim *et al.*, 2008). Dále bylo zjištěno, že PIF1 aktivuje transkripční faktor DAG1, který potlačuje transkripci genu kódujícího GA3 oxidázu, čímž je podobně jako v případě SOMNUS oslabena GA signalizace (Gabriele

et al., 2010). V poměrně nedávné době byl osvětlen mechanismus, jakým SOMNUS potlačuje expresi genů GA3 oxidáz. Geny pro GA3 oxidázy jsou epigeneticky uzavřeny pro přepis prostřednictvím dimetylace histonů. Takto inaktivovaný chromatin je ovšem pro transkripci aktivován prostřednictvím histon arginin demetyláz. Bylo zjištěno, že negativní regulace exprese GA3 oxidáz prostřednictvím SOMNUS je založena na inhibici exprese aktivačních genů *JMJ20* a *JMJ22*, které kódují histon-arginin demetylázy (Cho et al., 2012). Mechanismy, kterými SOMNUS reguluje jiné cílové geny, nebyly prozatím objasněny.



**Obr. č. 3:** Regulace klíčení světlem prostřednictvím fytochromů (převzato a upraveno podle de Wit M., et al., 2016).

### 2.2.3.2 Modré světlo a klíčení

Přestože v regulaci klíčení jsou zapojeny převážně fytochromy, tato vývojová fáze může být taktéž ovlivněna prostřednictvím modrého světla a kryptochromů. Bylo zjištěno, že modré světlo má různý vliv na klíčení různých druhů rostlin. Zatímco například v případě *Acacia catechu* světlo klíčení stimuluje, v případě *Amaranthus caudatus* je klíčení semen modrým světlem inhibováno (Agrawal et Prakash, 1978;

Nowak *et al.*, 1996). Na rozdíl od červeného světla, jehož percepci zprostředkovávají fytochromy, modré světlo může být rostlinou vnímáno všemi třemi hlavními rostlinnými fotoreceptory. Tedy nejen fotoreceptory modrého světla (kryptochromy a fototropiny), nýbrž právě i fytochromy. Bylo zjištěno, že stejně jako v případě červeného světla, tak i v případě modrého světla je extrémně krátký nepatrný puls světelné energie (tzv. VLFR viz kapitola fytochromy) vnímán prostřednictvím PhyA. Dále bylo zjištěno, že modré světlo má na aktivní P<sub>fr</sub> formu PhyB podobný efekt jako FR tj. konvertuje jej zpět do neaktivní formy Pr. V případě, že množství intenzity modrého přesáhne určitou prahovou hranici, je semeno *Arabidopsis* schopné vnímat světlo prostřednictvím CRY1 i v případě absence Phy (Poppe *et al.* 1998).

Také bylo zjištěno, že modré světlo inhibuje klíčení semen rajčete a může zvyšovat inhibiční účinek osmotického stresu na jeho klíčení (Fellner *et al.*, 2002; Piterková *et al.*, 2012). Modrým světlem zvýšený inhibiční efekt osmotického stresu může být způsoben zvýšením signalizace ABA. Bylo zjištěno, že *7B-1* mutant rajčete, který má pravděpodobně defekt v signalizaci modrého světla, má na modrém světle zvýšenou hladinu oxidu dusnatého proti nemutované rostlině. Oxid dusnatý vede k aktivaci katabolismu ABA a tím pádem snížení jejího množství (Piterková *et al.*, 2012).

U mnoha domestikovaných druhů rostlin není prokázán vliv červeného světla na klíčení, ale bylo zjištěno, že modré světlo inhibuje klíčení semen v dormanci. V případě ječmene bylo pozorováno, že po vystavení semene modrému světlu, je indukován ABA biosyntetický gen *NCED1* a dochází k zvýšení obsahu ABA (Gubler *et al.*, 2008). Dále bylo zjištěno, že pro přijetí a transdukcii tohoto signálu modrého světla, je zapotřebí fotoreceptor CRY1 (Barrero *et al.*, 2014). Na druhou stranu, Kim *et al.* odhalili, že v případě semen *Arabidopsis*, působí během klíčení aktivovaný CRY2 jako negativní regulátor ABA signalizace (Kim *et al.*, 2014).

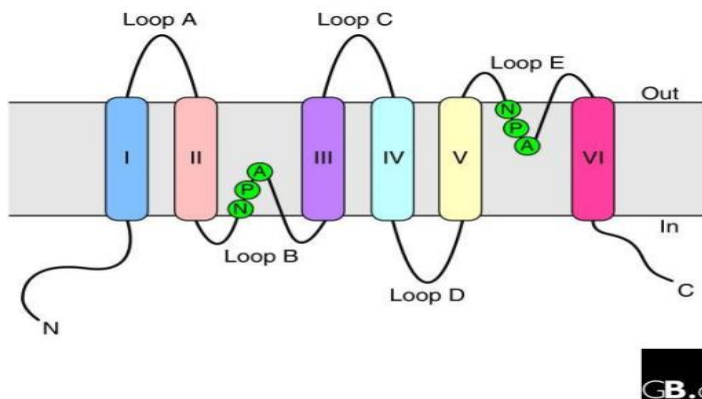
### 2.3 Akvaporiny

Akvaporiny jsou integrální kanálové proteiny přítomné, jak v cytoplazmatické membráně, tak v intracelulárních membránách buněk. Nalézt je můžeme v membránách všech živých organismů s výjimkou intracelulárních bakterií a termofilních archaeí (Abascal *et al.*, 2014). Jejich hlavní funkcí je usnadňovat a urychlovat transport vody přes buněčné membrány, neboť transport zajištěný prostou difuzí je většinou nedostatečný (Maurel *et al.*, 2008). Důvodem je složení membrány, která se stává z fosfolipidové dvojvrstvy, kdy hydrofobní charakter dvojvrstvy téměř vylučuje možnost volného prostupu vody. Objev akvaporinů znamenal klíčový zlom v porozumění, kterak je voda transportována přes buněčné membrány a pomohl vysvětlit řadu pozorovaných jevů, týkajících se vodního transportu v buňkách.

Rostlinné akvaporiny jsou sdruženy ve velké proteinové rodině označované jako MIP (z *angl. major intrinsic proteins*). Tyto proteiny procházejí a zasahují svou strukturou z jedné strany membrány na druhou a vytvářejí v ní póry. Velikost MIP se pohybuje přibližně mezi 25-30 kDa. Na základě sekvenční homologie byly rostlinné akvaporiny rozděleny do pěti skupin. Dvě největší a vzájemně velmi podobné skupiny jsou pojmenovány podle membrán, ve kterých se vyskytují. První skupina náleží akvaporinům plazmatické membrány a nese označení PIP (z *angl. plasma membrane intrinsic proteins*). Do druhé skupiny jsou řazeni zástupci vakuolárních membrán a skupina nese označení TIP (z *angl. tonoplast intrinsic proteins*). Dále následuje skupina NIP (z *angl. nodulin-26-like intrinsic proteins*) a poslední objevené skupiny malých akvaporinů SIP (z *angl. small basic intrinsic proteins*) (Johanson *et al.*, 2002). Existují i nezařazené akvaporiny označované XIP (z *angl. X intrinsic proteins*) (Danielson *et al.*, 2008). V genomu *Arabidopsis* bylo nalezeno 35 genů, zodpovědných za tvorbu různých izoform akvaporinů, z nichž 13 náleží skupině PIP, 10 skupině TIP, 9 skupině NIP a 3 skupině SIP (Maurel *et al.*, 2015). MIP neslouží pouze k transportu vody. Bylo zjištěno, že mohou transportovat i osmoticky aktivní roztoky, jako je například glycerol (Maurel *et al.*, 1994) nebo plyny jako amoniak (Niemetz *et Tyerman*, 2000), či oxid uhličitý (Terashima *et Ono*, 2002). Zatímco PIP a TIP vykazují především vodní transportní aktivitu, NIP zajišťují transport malých organických látek a látek minerální výživy (Ma *et al.*, 2006; Takano *et al.*, 2006). Stejně tak i XIP vykazují aktivitu multifunkčních kanálů.

### 2.3.1 Struktura akvaporinu

Akvaporiny všech skupin vykazují vysokou míru strukturní a funkční konzervativnosti. Akvaporin se skládá z šesti  $\alpha$ -helixů procházejících membránou, přičemž jednotlivé helixy jsou spojeny dvěma intracelulárními smyčkami (značeny B, D) a třemi extracelulárními smyčkami (značeny A, C, E). N- konec i C- konec směřuje do cytosolu (Obr. č. 4).



**Obr. č. 4:** Schématické znázornění proteinu akvaporinu v membráně (převzato z Kruse *et al.*, 2006)

Společně tvoří tyto části bílkovinného řetězce kompaktní a funkční útvar pevně uložený v lipidové dvojvrstvě. Samotný vodní pór se pak fyzicky nachází uprostřed tohoto útvaru, tedy mezi transmembránovými doménami a částmi B a E smyčky. Smyčky B a E totiž obsahují vysoce konzervativní sekvence, kterými jsou zanořeny do centra akvaporinu. Charakteristický motiv těchto konzervativních sekvencí tvoří aminokyseliny asparagin-prolin-alanin, a proto se sekvence nazývají NPA. Vysoká selektivita akvaporinů pro vodu, případně pro jiné akvaporiny transportované substráty, je zajištěna dvěma strukturními konstrikcemi v póru, které fungují jako selektivní filtry. První konstriktce je tvořena právě NPA boxy, které vedou ke středovému zúžení póru. Druhá konstriktce se nachází v blízkosti vnitřního ústí póru a nazývá se Ar/R, neboť je tvořena aromatickými aminokyselinami a argininem (Murata *et al.*, 2000).

Při stanovení terciální struktury akvaporinu SoPIP2 izolovaného ze *Spinacia oleracea*, byla pomocí rentgenové strukturní krystalografie, namodelována jeho otevřená (transportně aktivní) i uzavřená (transportně inaktivní) konformace (Törnroth-Horsefield *et al.*, 2006). U akvaporinů typu PIP a TIP byla rovněž popsána kvarterní struktura, kdy je jeden transportér složen ze 4 akvaporinových proteinů (podjednotek), přičemž každá z nich funguje jako samostatný kanál (Daniels *et al.*, 1999; Kukulski *et al.*, 2005).

### 2.3.2 Regulace akvaporinu

Růst a vývoj rostlin je závislý na přesné regulaci příjmu vody. Rostliny potřebují v průběhu života regulovat tok vody do svých buněk, ze svých buněk i uvnitř buněk v rámci buněčných organel a kompartmentů. Ústřední roli v tomto transportu hrají akvaporiny, jejichž množství i aktivita může být regulována. Regulace množství akvaporinů je ovlivňována změnami jejich exprese. V podstatě tak dochází k změně počtu transportních míst, což vede k změně transportního potenciálu membrán. Ke změnám exprese akvaporinů může docházet v průběhu vývoje rostliny při diferenciaci buněk, při stárnutí buněk nebo jako reakce buněk na změny vnějšího prostředí.

Druhým způsobem regulace je změna jejich aktivity. Aktivita akvaporinu je regulována řadou faktorů vnějšího prostředí jako jsou různé druhy stresu, změny dostupnosti transportovaných roztoků atd. Jak již bylo zmíněno, akvaporin se může nacházet v otevřené nebo uzavřené konformaci. V případě výše zmíněného SoPIP2 bylo zjištěno, že konformace je závislá na pH. Samotný mechanismus uzavření akvaporinu totiž spočívá v pH závislé protonaci histidinu nacházejícího se na pozici 193 v D smyčce, což následně vede k interakci D smyčky s N-koncem proteinu a tím pádem uzavření akvaporinu (Tournaire-Roux *et al.*, 2003). Podobný inhibiční efekt mají na aktivitu akvaporinů dvojmocné kationty (typicky  $\text{Ca}^{2+}$ ), které se přímo váží do uzavřené konformace póru, čímž ji stabilizují (Alleva *et al.*, 2006).

Stejně jako u celé řady proteinů, tak i v případě akvaporinů, jsou významným nástrojem ovládní aktivity fosforylace (zprostředkované kinázami) a defosforylace (zprostředkované fosfatázami). Jedná se o elegantní nástroje rychlé a reverzibilní regulace akvaporinů bez nákladů spojených s jejich syntézou či degradací. Strukturně funkční analýzy TIP, PIP a NIP v oocytech *Xenopus laevis* poukázaly na význam několika fosforylačních míst v regulaci vodního transportu (Maurel *et al.*, 1995; Johansson *et al.*, 1998). Na strukturním modelu SoPIP2 bylo ilustrováno, že fosforylace serinu v pozici 115 vedla k narušení sítě interakcí, vedoucích k uzamčení akvaporinu, což vede k aktivaci jeho otevřené konformace (Maurel *et al.*, 2015).

Dalším z významných způsobů regulace vodní propustnosti je regulace vezikulárního transportu akvaporinů na úrovni tetramerních interakcí. Jak již bylo zmíněno, akvaporiny skupiny PIP a TIP asociují do funkčních tetramerů. Takto mohou vznikat homotetramery (vznikají asociací stejných akvaporinových proteinů) nebo mohou díky vysoké strukturní podobnosti vznikat heterotetramery, tj. tetramery tvořené

různými členy jedné skupiny akvaporinů. Různé kombinace heterotetramerů se liší nejen na molekulární, ale i na funkční úrovni. Například funkční exprese v kvasinkách ukázala, že různé heterotetramerické sestavy izoform PIP mají různý poměr preference k vodě a oxidu uhličitému (Otto *et al.*, 2010). Zároveň byl prokázán vliv tetramerních interakcí na vezikulární transport. Expresní studie PIP1 a PIP2 akvaporinů v oocytech *Xenopus laevis* ukázala význam heteromerizace při intracelulárním transportu. Samostatně exprimované PIP1 se vyskytovali pouze v cytoplazmě, zatímco v případě koexprese a interakce s PIP2 jim bylo umožněno exponovat se na plazmatické membráně (Zelazny *et al.*, 2007). Dále bylo zjištěno, že nadměrná exprese mutantní formy PIP2 v transgenní *Arabidopsis* vedla k indukci intracelulární retence nativních PIP a posléze k snížení transportu vody kořeny (Sorieu *et al.*, 2011).

### 2.3.3 Akvaporiny a klíčení semen *Arabidopsis*

Klíčení je umožněno změnou rovnováhy mezi růstovým potenciálem embrya a mechanickou odolností okolních tkání (osemení, endosperm). Růst embrya vyžaduje dramatické změny obsahu vody v jeho pletivech, přičemž na buněčném i intracelulárním toku vody se podílejí právě i akvaporiny.

Studium exprese akvaporinů v suchých semenech a ranných klíčících rostlinách *Arabidopsis* odhalilo dva odlišné programy exprese. V suchých semenech byly pozorovány vysoké hladiny exprese akvaporinů TIP3 a TIP5, ale jen velmi nízké hladiny všech 13 členů skupiny PIP. Naproti tomu v klíčící rostlině byla zjištěna převládající exprese akvaporinů podskupin TIP1, TIP2 a PIP, zatímco transkripty TIP3 a TIP5 převládající v suchých semenech nebyly v klíčících rostlinách detekovány (Vander Willigen *et al.*, 2006).

V téže studii byl také sledován vliv HgCl<sub>2</sub> (inhibitor akvaporinového transportu) na klíčení semen *Arabidopsis*. Bylo zjištěno, že u semen ošetřených HgCl<sub>2</sub> dochází k snížení rychlosti klíčení oproti kontrole, přičemž charakter křivky klíčení nebyl výrazně pozměněn. To naznačuje, že neexistuje nic inherentně odlišného, pokud jde o klíčivost ošetřených a kontrolních semen, ale pouze o zpomalení mechanismu klíčení. Rovněž bylo potvrzeno, že tyto účinky HgCl<sub>2</sub> byly primárně způsobeny specifickou blokadou akvaporinů, a nikoliv nespecifickými toxickými účinky HgCl<sub>2</sub>. Dále byl studován vliv HgCl<sub>2</sub> na třífázovou kinetiku absorpce vody při klíčení. Zde bylo zjištěno, že HgCl<sub>2</sub> nezměnila I. fázi ve srovnání s kontrolou, a tudíž se akvaporiny pravděpodobně nepodílejí na imbibici semen *Arabidopsis*. Je tedy patrné, že modulace

rychlosti klíčivosti pomocí rtuti, musí být vyvíjena během fáze II nebo ranné fáze III klíčení (Vander Willigen *et al.*, 2006).

Jak již bylo výše zmíněno, existuje mnoho environmentálních faktorů, o nichž je známo, že zasahují do klíčení semen. Jedním z těchto faktorů je právě i světlo. Nabízí se tedy otázka, zda má světlo význam v řízení exprese akvaporinů při klíčení.

#### **2.3.4 Akvaporiny a světlo**

O vztahu mezi světlem a akvaporiny je toho známo jen velmi málo. Nicméně Kaldenhoff *et al.* zjistili, že exprese genu *AthH2*, který kóduje PIP1b u *Arabidopsis*, je indukována modrým a bílým světlem. Podobný efekt na aktivaci promotoru *AthH2* jako mělo bílé a modré světlo, měly i fytohormony GA a ABA. Naproti tomu červené světlo mělo na navození aktivity promotoru jen nepatrný účinek (Kaldenhoff *et al.*, 1996). V případě rostliny *Juglans regia* bylo zjištěno, že hydraulická vodivost listů koreluje s množstvím transkriptu akvaporinů plazmatické membrány JrPIP2,1 a JrPIP2,2 a množství transkriptů je pak regulováno mimo jiné také světelnými podmínkami. Světlo vede ke zvýšení exprese, zatímco v podmínkách tmy dochází k jejímu snížení (Cochard *et al.*, 2007).

Světlo ovšem nemusí regulovat akvaporiny pouze prostřednictvím změny genové exprese. Bylo zjištěno že akvaporiny PIP2;1, které jsou exprimovány v cévách *Arabidopsis* a podílí se na hydraulické vodivosti, jsou regulovány světlem na posttranskripční úrovni. Kvantitativní proteomické analýzy ukázaly, že ve tmě dochází k difosforylaci PIP2; 1 na pozici Ser-280 a Ser-283, což vede k jejich aktivaci a posílení hydraulické vodivosti (Prado *et al.*, 2013).



### 3 Materiál a metodika

#### Pomůcky:

automatická pipeta (20 $\mu$ l, 200 $\mu$ l, 1ml), sterilní špičky k pipetám, lihový kahan, sterilní plastové kulaté Petriho misky (průměr 90 mm), páska z netkané textilie (Batist), 50ml sterilní zkumavka, mikrozukavky, varné láhve (0,5 l), sterilní skalpel, lihová fixa, plastové stojánky na mikrozukavky a na 50 ml zkumavku, alobal, nesterilní kádinka (100 ml), nesterilní sklenička (100 ml)

#### Přístroje:

magnetická míchačka

pH metr

předvážky

analytické váhy

autokláv

laminární box

mikrovlnná trouba

růstové komory (Microclima 1000E, Snijders Scientific B.V., Holandsko)

chladnička s mrazákem (-20°C)

#### Chemikálie:

1,5% NaClO, 10 mM HgCl<sub>2</sub>, pufr MES (kyselina 2-(N-morfolino)-ethansulfonová), sacharóza, směs Murashige-Skoog media (Murashige et Skoog. 1962), Cat. no. M5524, Caisson, USA), fytoagar (Duchefa Biohemie), 1M KOH, 70% a 96% etanol, sterilní destilovaná voda

#### 3.1 Rostlinný materiál

K experimentům byla použita semena mutantní rostliny *Arabidopsis thaliana* (L.) a semena odpovídajících kontrolních genotypů. Jednalo se o recesivního fotomorfogenního mutantu *cry1-1* (*hy4*) s defektem ve fotoreceptoru CRY1 (Ahmad *et* Cashmore 1993) odvozeného od ekotypu Landsberg *erecta* (*Ler*) a fotomorfogenního mutantu *cry2-1* s defektem ve fotoreceptoru CRY2 (Lin *et al.*, 1996) odvozeného od ekotypu Columbia (*Col*). Semena experimentálních rostlin byla poskytnuta ABRC (*Arabidopsis* Biological Research Center, Ohio State University, USA).

### 3.2 Příprava MS média

Pro přípravu 2 litrů MS média bylo naváženo 20 g sacharózy, 8,66 g komerční směsi kultivačního média Murashige-Skoog (Murashige *et* Skoog, 1962) a 0,3904 g pufru MES. Tyto složky média byly za stálého míchání rozpuštěny v cca 1 litru destilované vody. Po jejich rozpuštění byl takto připravený roztok dolit na objem 2 litrů destilovanou vodou. Za využití pH-metru bylo pH roztoku upraveno postupným přidáváním roztoku 1M KOH na požadovanou hodnotu 6,1. Takto připravené médium pak bylo následně rozlito po 400 ml do 0,5 l varných sklenic obsahujících vždy 2,8 g fytoagaru. Médium s agarem bylo sterilizováno v autoklávu a po vychladnutí bylo sterilní médium uchováváno v lednici až do doby použití. Před použitím bylo médium rozeřháto v mikrovlnné troubě. Rozeřháté médium bylo přeneseno do sterilního prostředí laminárního boxu, kde s médiem probíhaly další práce. Pro jeden kompletní experiment bylo potřeba čtyřikrát 120 ml média, aby byla připravena média o různých koncentracích ze zásobního roztoku HgCl<sub>2</sub> o koncentraci 10 mmol/l (viz tabulka 1). Odpovídající množství HgCl<sub>2</sub> ze zásobního roztoku byla přidána až po mírném zchladnutí médií. Připravená média o různých koncentracích HgCl<sub>2</sub> byla přelita kyvetou do příslušných plastových Petriho misek (20 ml/misku). S výsevem se počkalo, dokud médium v miskách neztuhlo.

**Tabulka 1:** Koncentrace a odpovídající objemy inhibitorů pro přípravu 120 ml MS média

Inhibitor akvaporinů	Koncentrace zásobního roztoku inhibitoru [mmol/l]	Testované koncentrace [μmol/l]	Objem zásobního roztoku inhibitoru na 120 ml media [μl]
HgCl <sub>2</sub>	10	0	0
		10	120
		20	240
		30	360

### 3.3 Sterilizace a výsev semen

Pro jeden experiment bylo potřeba alespoň 360 semen od mutantního i kontrolního genotypu. Pro experiment bylo naváženo asi 8 mg semen každého genotypu, což odpovídá cca 400 semenům, čímž byla vytvořena jistá rezerva. Před samotným výsevem byla semena, za účelem stratifikace, 3 dny uchovávána v plastových

zkumavkách v destilované vodě v chladničce (cca. 5°C). Po ukončení stratifikace byla voda ze zkumavek odstraněna pomocí 1ml automatické pipety. Semena byla sterilizována 1 ml 1,5% NaClO po dobu 30 min. Po ukončení sterilizace byla semena přenesena do laminárního boxu, kde byl sterilizační roztok NaClO odstraněn pipetou a semena byla alespoň šestkrát propláchnuta sterilní destilovanou vodou.

Samotný výsev probíhal v laminárním boxu za denního světla pomocí 20 $\mu$ l automatické pipety se zaříznutou špičkou. Pro seřiznutí špičky byl použit skalpel, který byl nejprve opláchnut v 96 % etanolu a poté ožehnut v plamenu lihového kahanu. Na každou misku bylo vyseto alespoň 30 semen. Veškerou práci při výsevu semen bylo nutné provádět za sterilních podmínek, aby se předešlo kontaminaci semen, či misek s mediem mikroorganismy. Po výsevu byly misky uzavřeny víčkem a miska s víčkem byla po obvodu zalepena dvěma vrstvami pásky z netkané textilie. Misky se semeny byly umístěny vertikálně do plastových stojanů a poté byly přeneseny do růstových komor s příslušnou kvalitou světla. Misky se semeny určenými pro experimenty ve tmě byly zabaleny do dvou vrstev hliníkové folie a byly umístěny do libovolné růstové komory. Komory byly temperované na konstantní teplotu 23 °C. Zdrojem modrého světla byly trubice Philips TLD-36W/18-Blue (Philips USA), maximální ozáření bylo 10  $\mu$ mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> při 440 nm. Zdrojem červeného světla byly trubice TLD-36W/15-Red (Philips USA), maximální ozáření bylo 10  $\mu$ mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> při 660 nm.

### **3.4 Hodnocení klíčení**

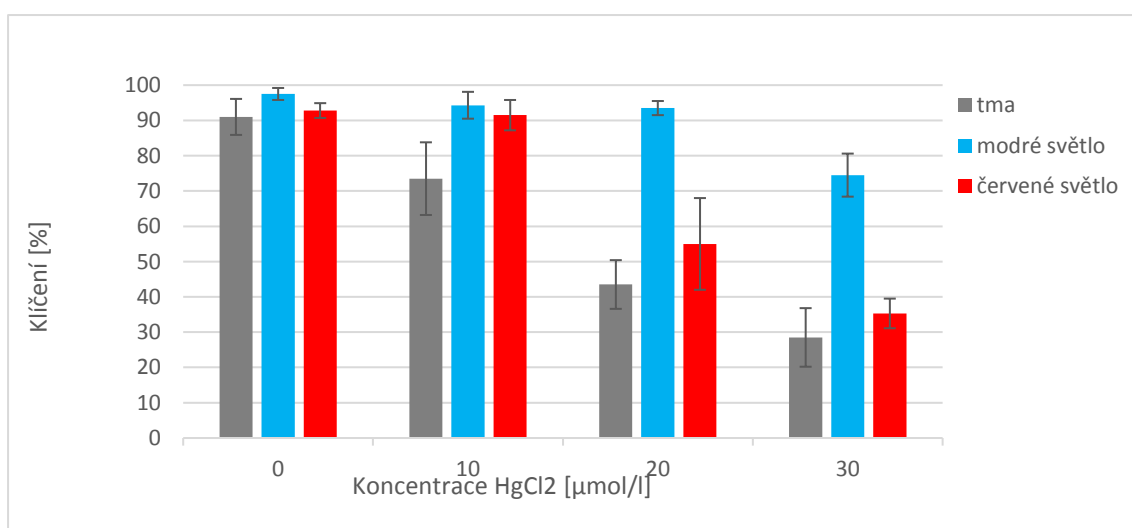
Průběžné klíčení semen bylo sledováno po dobu 5 dnů, a to 3. až 7. den od vysetí. Vyhodnocení probíhalo na bílém světle. Každý experiment byl zopakován alespoň třikrát. Ze získaných dat byly vypočteny průměrné hodnoty počtu vyklíčených semen pro oba testované mutantní genotypy a jejich příslušné kontrolní genotypy (WT). Průměrné hodnoty byly vyneseny do grafů maximální klíčivosti v závislosti na koncentraci HgCl<sub>2</sub>. Statistické výpočty a sestavení grafů bylo provedeno v tabulkovém editoru Microsoft Excel 2016.

## 4 Výsledky

Ke zhodnocení, zda jsou akvaporiny zapojeny v klíčení semen, byl použit farmakologický přístup, který spočívá v použití inhibitoru akvaporinů  $\text{HgCl}_2$  v různé koncentraci (0, 10, 20 a 30  $\mu\text{mol/l}$ ) a sledování, kterak inhibitor ovlivňuje kinetiku klíčení a maximální klíčení semen v podmínkách *in vitro*. Vliv inhibitoru byl studován ve tmě, na modrém a červeném světle, aby bylo odhaleno možné ovlivňování akvaporinů prostřednictvím světla. V experimentech byla využita také semena mutantů s defektem v genech kódujících fotoreceptory CRY1 a CRY2, aby mohlo být genetickým přístupem zjištěno, zda může být případný vliv světla na funkci akvaporinů zprostředkován jedním z těchto fotoreceptorů. Všechny experimenty byly provedeny dle postupu uvedeného v metodice.

### 4.1 Vliv světla na citlivost semen mutantu *cry1-1* k $\text{HgCl}_2$

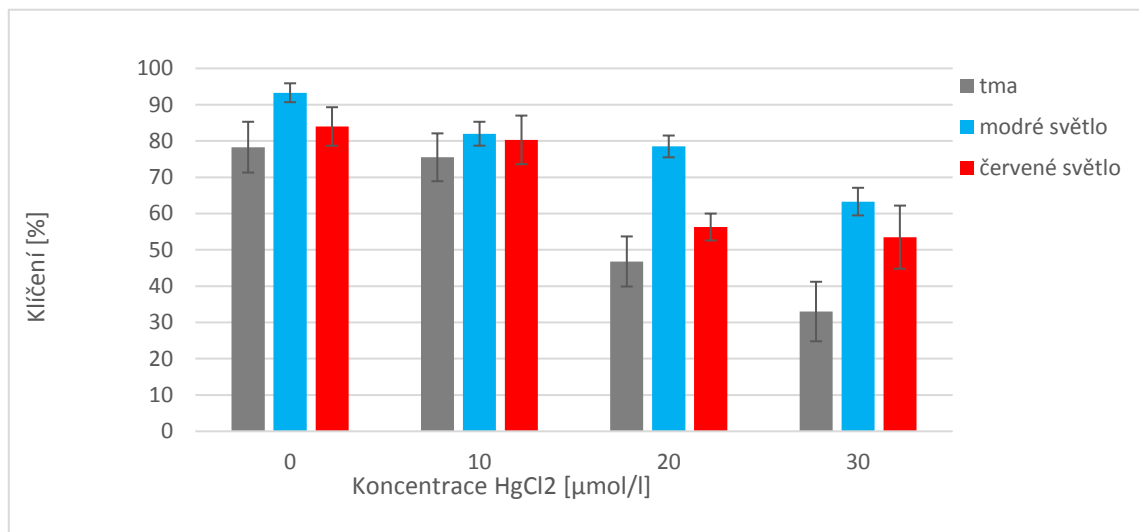
V experimentech jsme sledovali vliv  $\text{HgCl}_2$  a světelných podmínek na klíčení semen fotomorfogenního mutantu *cry1-1* v porovnání s WT *Ler*. Jak ukazuje Obr. 5, blokátor akvaporinů  $\text{HgCl}_2$  inhibuje klíčení semen *Arabidopsis thaliana* (ekotyp *Ler*) a tato inhibice je úměrná jeho zvyšující se koncentraci. Dále bylo zjištěno, že na modrém světle bylo klíčení semen *Ler* na médiu s  $\text{HgCl}_2$  mnohem vyšší než ve tmě. Podobný ale méně výrazný trend byl pozorován při inkubaci semen na červeném světle (Obr. 5).



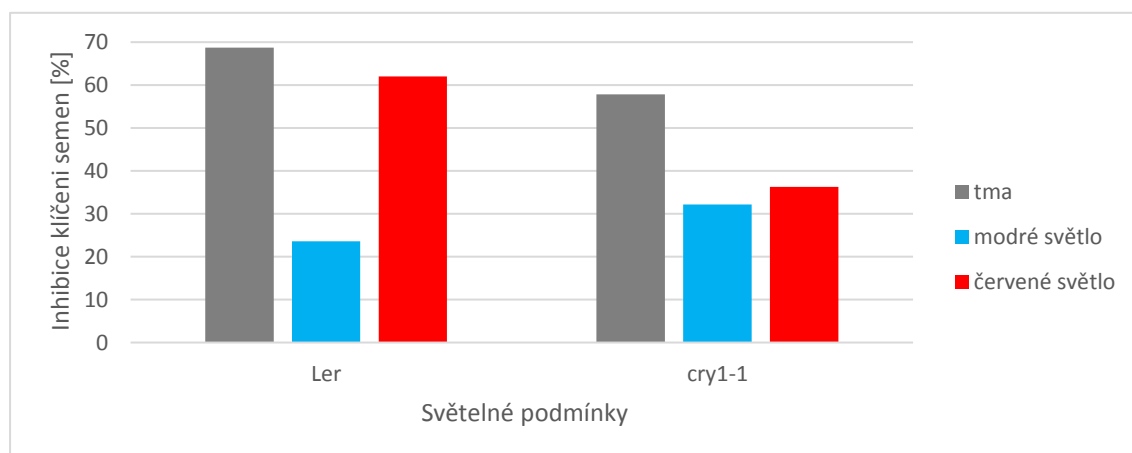
**Obr. 5:** Maximální klíčivost semen *Arabidopsis thaliana* – genotypu *Ler* v podmínkách *in vitro*, ovlivněná rostoucí koncentrací inhibitoru akvaporinů ( $\text{HgCl}_2$ ) ve tmě, na modrém a červeném světle 7. den od výsevu. Data reprezentují průměrné hodnoty  $\pm$  SE, vypočítané ze 4 nezávislých experimentů.

Na Obr. 6 je vidět, že mutant *cry1-1* dosahoval při absenci  $\text{HgCl}_2$  podobné maximální klíčivosti jako genotyp *Ler*. Podobně jako v případě genotypu *Ler*, byl také u mutantu

*cry1-1* patrný inhibiční efekt  $\text{HgCl}_2$  na klíčení semen (Obr. 6) a výrazné snížení inhibice klíčení, pokud byla semena kultivována na modrém světle (Obr. 7).



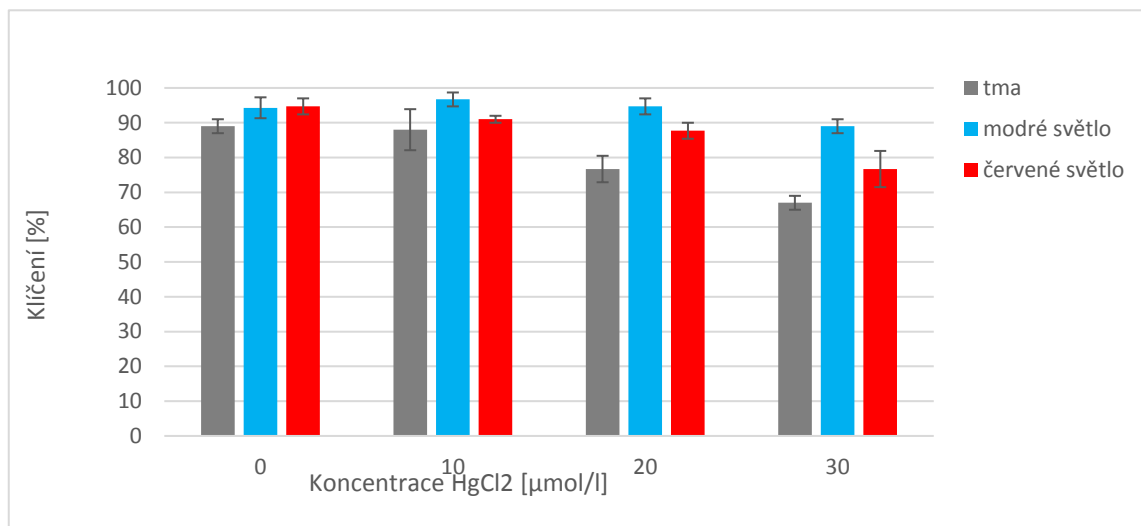
**Obr. 6:** Maximální klíčivost semen *Arabidopsis thaliana* – mutanta *cry1-1* v podmínkách *in vitro*, ovlivněné rostoucí koncentrací inhibitoru akvaporinů ( $\text{HgCl}_2$ ) ve tmě, na modrém a červeném světle 7. den od výsevu. Data reprezentují průměrné hodnoty  $\pm$  SE, vypočítané ze 4 nezávislých experimentů.



**Obr. 7:** Srovnání procent maximální inhibice klíčení *Arabidopsis thaliana* mutanta (*cry1-1*) a odpovídajícího standartního genotypu WT (*Ler*) v podmínkách *in vitro* při koncentraci  $30 \mu\text{mol/l}$   $\text{HgCl}_2$  v závislosti na světelných podmínkách (D, BL, RL) 7. den po výsevu semen.

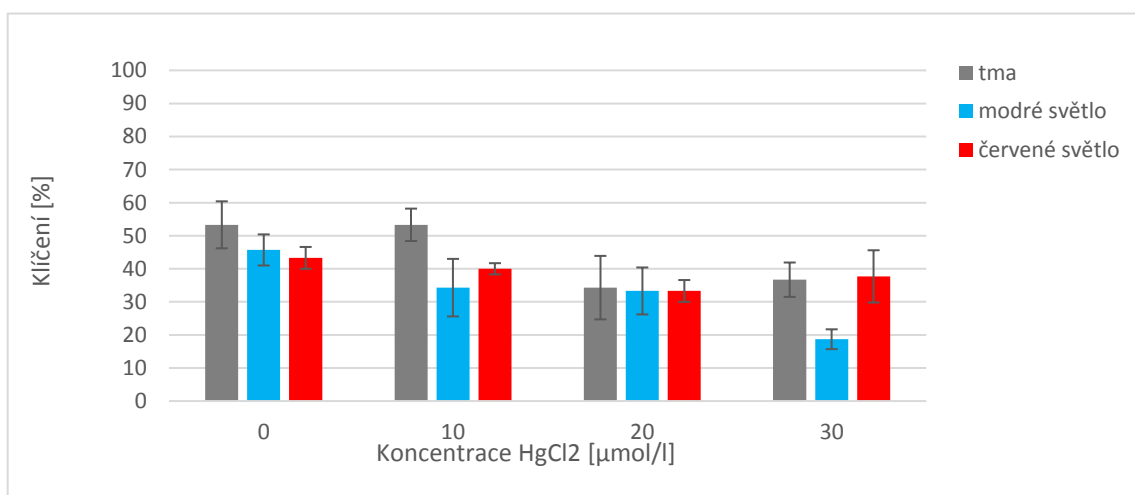
#### 4.2 Vliv světla na citlivost semen mutanta *cry2-1* k $\text{HgCl}_2$

Dále byl sledován vliv  $\text{HgCl}_2$  a světelných podmínek na klíčení semen fotomorfogeního mutanta *cry2-1* v porovnání s odpovídajícím kontrolním genotypem Col. Obdobně jako u dvojice genotypů *Ler* a *cry1-1*, tak i v případě genotypu Col bylo zjištěno, že  $\text{HgCl}_2$  výrazně inhiboval klíčení semen kultivovaných ve tmě. Na světle, především pak na modrém, byly inhibiční účinky  $\text{HgCl}_2$  na klíčení semen Col znatelně slabší než ve tmě (Obr. 8).

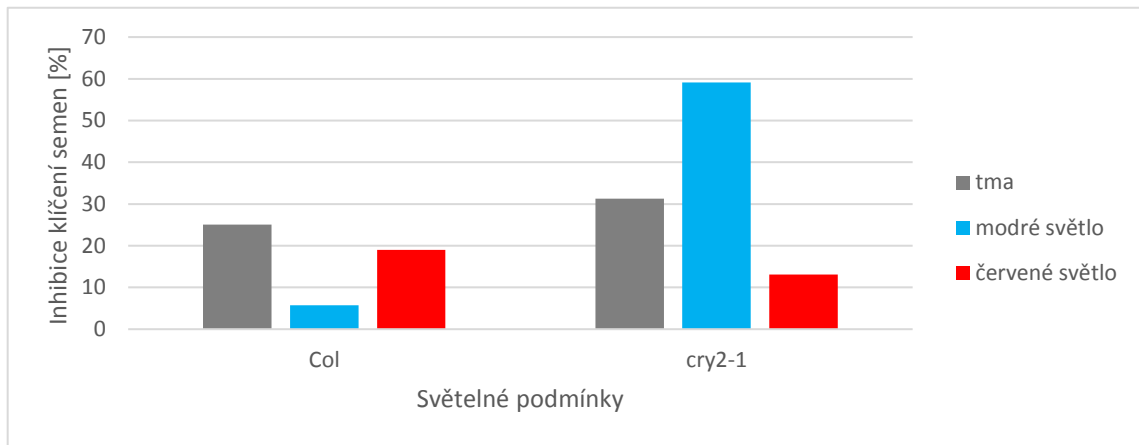


**Obr. 8:** Maximální klíčivost semen *Arabidopsis thaliana* – genotypu Col v podmínkách *in vitro*, ovlivněné rostoucí koncentrací inhibitoru akvaporinů (HgCl<sub>2</sub>) ve tmě, na modrém a červeném světle 7. den od výsevu. Data reprezentují průměrné hodnoty ± SE, vypočítané ze 3 nezávislých experimentů.

Mutant *cry2-1* se vyznačoval v našich experimentálních podmínkách tím, že při absenci HgCl<sub>2</sub> ukazoval ve srovnání s kontrolním genotypem Col sníženou (zhruba poloviční) klíčivost, a to za všech světelných podmínek (Obr. 9). Inhibitor akvaporinů HgCl<sub>2</sub> s rostoucí koncentrací redukoval klíčení semen *cry2-1* za všech světelných podmínek (Obr. 9). Ovšem na rozdíl od všech testovaných genotypů, maximální klíčivost semen *cry2-1* v přítomnosti HgCl<sub>2</sub> nebyla na světle vyšší než u semen kultivovaných ve tmě, ale naopak nižší nebo stejná (Obr. 9). Názorně to ukazuje Obr. 10, na kterém je vidět, že citlivost semen *cry2-1* k 30 μmol/l HgCl<sub>2</sub> byla silně zvýšena na modrém světle.



**Obr. 9:** Maximální klíčivost semen *Arabidopsis thaliana* – mutanta *cry2-1* v podmínkách *in vitro*, ovlivněné rostoucí koncentrací inhibitoru akvaporinů (HgCl<sub>2</sub>) ve tmě, na modrém a červeném světle 7. den od výsevu. Data reprezentují průměrné hodnoty ± SE, vypočítané ze 3 nezávislých experimentů.



**Obr. 10:** Srovnání procent maximální inhibice klíčení *Arabidopsis thaliana* mutanta (*cry2-1*) a odpovídajícího standartního genotypu WT (Col) v podmínkách *in vitro* při koncentraci 30  $\mu\text{mol/l}$   $\text{HgCl}_2$  v závislosti na světelných podmínkách (D, BL, RL) 7. den po výsevu semen.

## 5 Diskuze

V experimentální části předkládané práce jsme se zabývali vztahem mezi akvaporiny a modrým světlem při klíčení a možnou úlohou fotoreceptorů CRY1 a CRY2 coby zprostředkovatelů této interakce. Významem akvaporinů při klíčení semen *Arabidopsis* se zabýval již C. Vander Willigen *et al.* Ten zjistil, že blokátor akvaporinů HgCl<sub>2</sub> zpomaluje proces klíčení semen, čímž potvrdil význam akvaporinů při klíčení (Vander Willigen *et al.*, 2006). O vztahu mezi světlem a akvaporiny toho bylo ovšem doposud zjištěno jen velmi málo. Průkopníkem v této oblasti byl Ralf Kaldenhoff, který odhalil, že světlo, potažmo jeho modrá složka, indukuje expresi genu *AthH2*, který kóduje PIP1b u *Arabidopsis* (Kaldenhoff *et al.*, 1996). Nicméně zda světlem řízená exprese akvaporinů hraje nějakou roli během světelně řízených procesů jako je klíčení, je potřeba teprve objasnit.

Podobnou problematikou jako já se ve své bakalářské práci zabýval již Jan Skácel (2016). Skácel studoval vliv modrého světla na klíčení *Arabidopsis*, konkrétně mutantů s defektem ve fototropinech. Ve své bakalářské práci zjistil, že v případě *Arabidopsis* modré světlo snižuje citlivost semen k inhibičnímu účinku HgCl<sub>2</sub>. Výsledky jeho experimentů však vedly k závěru, že fototropiny vliv modrého světla na citlivost semen k HgCl<sub>2</sub> nezprostředkují. Podobné experimenty pak prováděl i se semeny rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L.). Zjistil, že u rajčete modré světlo naopak citlivost semen k inhibitoru akvaporinu HgCl<sub>2</sub> zvyšuje a dále zjistil, že tento efekt modrého světla může být zprostředkován fotoreceptorem CRY1. Skácel navrhl hypotézu, že vliv CRY1 na akvaporiny závisí na jejich lokalizaci v buňce. Ve tmě se totiž CRY1 nachází v jádře, kde by mohly ovlivňovat produkci akvaporinů prostřednictvím interakce s příslušnými transkripčními faktory. Při působení modrého světla dochází k jejich aktivaci a přemístění do cytoplazmy, což může vést k snížení exprese akvaporinů. Tím by se množství akvaporinů v buňce snížilo. V důsledku toho by pak nižší koncentrace HgCl<sub>2</sub> byla nutná k zablokování stávajícího množství akvaporinů. Kromě toho aktivované cytoplasmatické receptory CRY1 by mohly přímo nebo prostřednictvím dalšího proteinu interagovat s PIP akvaporiny a tím zvyšovat jejich citlivost k HgCl<sub>2</sub>.

Má bakalářská práce na jeho zjištění navazuje. Ve své práci jsem testoval citlivost semen fotomorfogenních mutantů *Arabidopsis thaliana* L. (Heynh.) *cry1-1* a *cry2-1* k HgCl<sub>2</sub>. Pro zjištění, zda jsou akvaporiny zapojeny v klíčení semen byl využit

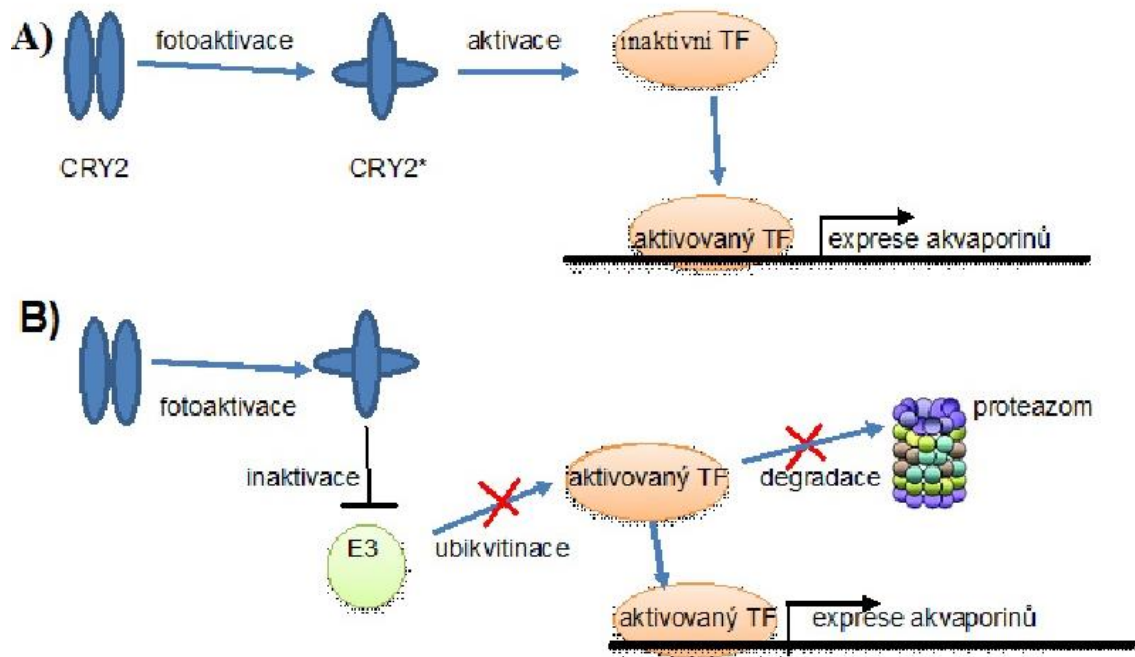


HgCl<sub>2</sub>, který je inhibítoem akvaporinů (Maurel *et al.*, 1997). Výsledky ukázaly, že zvyšující se koncentrace HgCl<sub>2</sub> úměrně zvyšovala inhibici klíčení obou WT, a to za všech světelných podmínek. To potvrzuje, že akvaporiny citlivé k HgCl<sub>2</sub> jsou pozitivně zapojeny v procesu klíčení semen *Arabidopsis*, a to jak ve tmě, tak na světle.

V provedených experimentech byl rovněž testován vliv různých světelných podmínek na citlivost klíčení semen k inhibitoru HgCl<sub>2</sub> u mutantů *cry1-1* a *cry2-1* u *Arabidopsis*. Výsledky ukázaly, že u semen obou WT a mutantu *cry1-1* světlo snižovalo (a to především modré) inhibici klíčení semen vlivem HgCl<sub>2</sub>. Tato tolerance semen k inhibičnímu vlivu HgCl<sub>2</sub> se dá vysvětlit zvýšeným množstvím akvaporinů, jež mohou být prostřednictvím HgCl<sub>2</sub> inhibovány. Na základě výše zmíněného lze tedy vyslovit hypotézu, že modré světlo může např. zvyšovat množství akvaporinů, např. tím, že stimuluje expresi genů, které tyto akvaporiny citlivé k HgCl<sub>2</sub> kódují. Avšak vzhledem k tomu, že reakce semen *Ler* a mutantu *cry1-1* k HgCl<sub>2</sub> byly totožné, je možno usoudit, že fotoreceptor CRY1 nebude fotoreceptorem, který by vliv modrého světla na uvažované zvyšování množství akvaporinů, a tedy snižování citlivosti semen k HgCl<sub>2</sub>, zprostředkoval.

Výsledky experimentů bakalářské práce dále ukázaly, že modré světlo nezvyšovalo toleranci semen vůči inhibičnímu efektu HgCl<sub>2</sub> u mutantu *cry2-1*. Naopak, citlivost semen mutantu *cry2-1* k HgCl<sub>2</sub> na modrém světle byla výrazně vyšší než u kontrolního genotypu Col. To naznačuje, že vliv modrého světla na citlivost klíčení semen k HgCl<sub>2</sub> a potažmo tedy i vliv na expresi akvaporinů je pravděpodobně zprostředkovan fotoreceptorem CRY2.

Na základě získaných výsledků lze navrhnout mechanismus, jak by regulace akvaporinů modrým světlem prostřednictvím fotoreceptoru CRY2 mohla fungovat. Je známo, že fotoreceptory CRY1 a CRY2 jsou ve tmě akumulovány v jádře (Cashmore *et al.*, 1999; Kleiner *et al.*, 1999). Zatímco velká část CRY1 se po aktivaci modrým světlem přesunuje do cytoplazmy, CRY2 zůstává v jádře i po aktivaci modrým světlem (Wu *et Spalding* 2007; Yu *et al.*, 2007). CRY2 na rozdíl od CRY1, může po fotoaktivaci modrým světlem prostřednictvím interakce s transkripčními faktory (TF) aktivovat genovou expresi (Liu *et al.*, 2011). Zdá se tedy, že některé z těchto TF by mohly indukovat právě i expresi akvaporinů citlivých k HgCl<sub>2</sub> (Obr. 11).



**Obr. 11:** Schéma mechanismu regulace akvaporinů prostřednictvím kryptochromu 2.

Podle toho, co o transdukcii signálu modrého světla zprostředkovaného přes CRY2 a TF dnes víme, existují v zásadě dva způsoby, kterak mohou CRY2 ovlivnit TF a posléze i expresi genů. První způsob tkví v přímé aktivaci TF prostřednictvím fotoaktivovaných CRY2. Druhý způsob je založen na inaktivaci ubikvitin E3 ligáz prostřednictvím fotoaktivovaných CRY2. Změna exprese je pak zajištěna zvýšením koncentrace TF, neboť aktivní ubikvitin E3 ligázy jsou zodpovědné za jejich proteolytickou degradaci.

Výsledky mé a Skácelovy práce ukazují, že vztah mezi signálem modrého světla a akvaporiny je zprostředkován kryptochromy. Dále výsledky obou prací naznačují, že patrně neexistuje univerzální mechanismus percepce modrého světla. Zatímco Skácel zjistil, že signál modrého světla působí na stav akvaporinů při klíčení semen *Solanum lycopersicum* L. přes CRY1, výsledky mé práce ukazují, že v případě *Arabidopsis* plní tuto úlohu CRY2. Nabízí se otázka, zda zapojení různých kryptochromů u rajčete a *Arabidopsis* nemůže souviset například s jejich odlišným fotoblastismem. Zatímco u rajčete, modré světlo citlivost semen k HgCl<sub>2</sub> zvyšuje, u *Arabidopsis* ji modré světlo snižuje. Je tedy zřejmé, že pro zobecnění role kryptochromů v regulaci akvaporinu při klíčení by bylo vhodné provést ještě další podobné experimenty s jinými rostlinnými druhy. Dále by mohlo být zajímavé využít metody přímé analýzy exprese genů a zjistit, které konkrétní geny kódující akvaporiny jsou při klíčení *Arabidopsis* přepisovány a jak se jejich exprese mění vlivem modrého světla.

## 6 Závěr

Cílem výše předložené bakalářské práce bylo studium zapojení fotoreceptorů kryptochromů v regulaci akvaporinů při klíčení semen *Arabidopsis thaliana*. Bylo využito genetického přístupu, který spočíval v analýze klíčení mutantů *Arabidopsis thaliana* L. (Heynh.) s defekty ve fotoreceptorech CRY1 a CRY2 ve tmě, na modrém a červeném světle. Výsledky experimentů s HgCl<sub>2</sub>, inhibítoem akvaporinů, vedly k závěru, že HgCl<sub>2</sub>-citlivé akvaporiny jsou zapojeny v procesu klíčení semen *Arabidopsis*, a to za všech světelných podmínek. Dále výsledky ukázaly, že světlo (především modré) snižuje citlivost semen *Arabidopsis* k inhibitoru HgCl<sub>2</sub> a tím udržuje klíčivost semen na vysoké úrovni i přes zvyšující se koncentraci inhibitory HgCl<sub>2</sub>. Výsledky tedy mohou vést k hypotéze, že modré světlo zvyšuje expresi genů kódujících HgCl<sub>2</sub>-citlivé akvaporiny. Na základě výsledků analýzy klíčení semen mutantu *cry2-1* se zdá, že efekt modrého světla na expresi akvaporinů může být zprostředkován fotoreceptorem CRY2.

## 7 Seznam zkratek

ABA kyselina abscisová

CRY1 kryptochrom 1

CRY2 kryptochrom 2

FR *far-red light*, dlouhovlnné červené světlo

GA gibereliny

MES 2-(N-morfolino)-ethansulfonová kyselina

MS médium Murashige a Skoog médium

Phy fytochrom

Pr *red light-absorbing form of phytochrome*

Pfr *far-red light-absorbing form of phytochrome*

RL *red light*, červené světlo

TF transkripční faktory

WT *wild-type*, standardní (kontrolní) genotyp

## 8 Citovaná literatura

- Abascal F., Irisarri I., Zardoya R. (2014) Diversity and evolution of membrane intrinsic proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1840(5): 1468–1481.
- Agrawal P. K., Prakash G. (1978) Control on seed germination in some Indian trees. *Tropical Ecology* 19(2): 174-177.
- Ahmad M., Cashmore A. R. (1993) HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature* 366(6451): 162–166.
- Alleva K., Niemietz C. M., Sutka M., Maurel C., Parisi M., Tyerman S. D., Amodeo G. (2006) Plasma membrane of *Beta vulgaris* storage root shows high water channel activity regulated by cytoplasmic pH and a dual range of calcium concentrations. *Journal of Experimental Botany* 57(3): 609–621.
- Barrero J. M., Downie A. B., Xu Q., Gubler F. (2014) A role for barley CRYPTOCHROME1 in light regulation of grain dormancy and germination. *Plant Cell* 26(3): 1094–1104.
- Bewley J. D. (1997) Seed germination and dormancy. *Plant Cell* 9(7): 1055–1066.
- Brudler R., Hitomi K., Daiyasu H., Toh H., Kucho K., Ishiura M., Kanehisa M., Roberts V. A., Todo T., Tainer J. A., Getzoff E. D. (2003) Identification of a new cryptochrome class. Structure, function, and evolution. *Molecular Cell* 11(1): 59–67.
- Buchanan B. B., Gruissem W., Russell L. J. (2015) Biochemistry & molecular biology of plants, 2nd Edition, Wiley Blackwell.
- Cashmore A. R., Jarillo J. A., Wu Y. J., Liu D. (1999) Cryptochromes: Blue light receptors for plants and animals. *Science* 284(5415): 760–765.
- Cochard H., Venisse J. S., Barigah T. S., Brunel N., Herbette S., Guillot A., Tyree M.T., Sakr S. (2007) Putative role of aquaporins in variable hydraulic conductance of leaves in response to light. *Plant Physiology* 143(1): 122–133.
- Daniels M. J., Chrispeels M. J., Yeager M., (1999) Projection structure of a plant vacuole membrane aquaporin by electron cryo-crystallography. *Journal of Molecular Biology* 294(5): 1337–1349.
- Danielson J. A., Johanson U. (2008) Unexpected complexity of the aquaporin gene family in the moss *Physcomitrella patens*. *BMC Plant Biology* 8(45).
- Deng X. W., Caspar T., Quail P. H., (1991) COP1: a regulatory locus involved in light-controlled development and gene expression in Arabidopsis. *Genes & Development* 5(7): 1172–1182.

- Deng X. W., Matsui M., Wei N., Wagner D., Chu A. M., Feldmann K. A., Quail P. H. (1992) COP1, an Arabidopsis regulatory gene, encodes a protein with both a zinc-binding motif and a Gbeta homologous domain. *Cell* 71(5): 791–801.
- de Wit M., Galvão V. C., Fankhauser Ch. (2016) Light-mediated hormonal regulation of plant growth and development. *Annual Review of Plant Biology* 67: 513-537.
- Duek P. D., Elmer M. V., van Oosten V. R., Fankhauser C. (2004) The degradation of HFR1 a putative bHLH class transcription factor involved in light signaling, is regulated by phosphorylation and requires COP1. *Current Biology* 14(24): 2296–2301.
- Fellner M., Sawhney V. K. (2002) The 7B-1 mutant in tomato shows blue-light-specific resistance to osmotic stress and abscisic acid. *Planta* 214(5): 675-682
- Finch-Savage W. E., Leubner-Metzger G. (2006) Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist* 171(3): 501–523.
- Frey A., Effroy D., Lefebvre V., Seo M., Perreau F., Berger A., Sechet J., To A., North H. M., Marion-Poll A. (2011) Epoxycarotenoid cleavage by NCED5 fine-tunes ABA accumulation and affects seed dormancy and drought tolerance with other NCED family members. *Plant journal* 70(3): 501–512.
- Gabriele S., Rizza A., Martone J., Circelli P., Costantino P., Vittorioso P., (2010) The Dof protein DAG1 mediates PIL5 activity on seed germination by negatively regulating GA biosynthetic gene *AtGA3ox1*. *Plant Journal* 61(2): 312–323.
- Genoud T., Schweizer F., Tscheuschler A., Debrieux D., Casal J. J., *et al.* (2008) FHY1 mediates nuclear import of the light-activated phytochrome A photoreceptor. *PLoS Genetics* 4(8): e1000143.
- Goggin D. E., Steadman K. J. (2012) Blue and green are frequently seen: responses of seeds to short- and mid-wavelength light. *Seed Science Research* 22(1): 27-35.
- Graeber K., Nakabayashi K., Miatton E., Leubner-Metzger G., Soppe W. J. (2012) Molecular mechanisms of seed dormancy. *Plant Cell Environment* 35(10): 1769–1786.
- Gubler F., Hughes T., Waterhouse P., Jacobsen J. (2008) Regulation of dormancy in barley by blue light and after-ripening: effects on abscisic acid and gibberellin metabolism *Plant Physiology* 147(2): 886–896.
- Hennig L., Stoddart W. M., Dieterle M., Whitelam G. C., Schäfer E. (2002) Phytochrome E controls light-induced germination of Arabidopsis. *Plant Physiology* 128(1): 194–200.
- Holdsworth M.J., Bentsink L., Soppe W. J. (2008) Molecular networks regulating *Arabidopsis* seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. *New Phytologist* 179(1): 33–54.

- Chen M., Tao Y., Lim J., Shaw A., Chory J. (2005) Regulation of phytochrome B nuclear localization through light-dependent unmasking of nuclear-localization signals. *Current Biology* 15(7): 637–642.
- Cho J. N., Ryu J. Y., Jeong Y. M., Park J., Song J. J., *et al.* (2012) Control of seed germination by light-induced histone arginine demethylation activity. *Developmental Cell* 22(4): 736–748.
- Christie J. M. (2007) Phototropin blue-light receptors. *Annual Review of Plant Biology* 58: 21–45.
- Christie J. M., Reymond P., Powell G. K., Bernasconi P., Raibekas A. A., Liscum E., Briggs W. R. (1998) *Arabidopsis* NPH1: a flavoprotein with the properties of a photoreceptor for phototropism. *Science* 282(5394): 1698–1701.
- Christie J. M., Salomon M., Nozue K., Wada M., Briggs W. R. (1999) LOV (light, oxygen, or voltage) domains of the blue-light photoreceptor phototropin (*nph1*): binding sites for the chromophore flavin mononucleotide. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96(15): 8779–8783
- Imaizumi T., Kanegae T., Wada M. (2000). Cryptochrome nucleocytoplasmic distribution and gene expression are regulated by light quality in the fern *Adiantum capillus-veneris*. *Plant Cell* 12(1): 81–96.
- Jang I. C., Yang J. Y., Seo H. S., Chua N. H. (2005) HFR1 is targeted by COP1 E3 ligase for post-translational proteolysis during phytochrome A signaling. *Genes & Development* 19(5): 593–602.
- Johanson U., Gustavsson S. (2002) A new subfamily of Major Intrinsic Proteins in plants. *Molecular Biology and Evolution* 19(4): 456–461.
- Johansson I., Karlsson M., Shukla V. K., Chrispeels M. J., Larsson C., Kjellbom P. (1998) Water transport activity of the plasma membrane aquaporin PM28A is regulated by phosphorylation. *Plant Cell* 10(3): 451–459.
- Kaldenhoff R., Kölling A., Richter G. (1996) Regulation of the *Arabidopsis thaliana* aquaporin gene *AthH2* (PIP1b). *Journal of Photochemistry and Photobiology B*. 6(3): 351-354.
- Kim D. H., Yamaguchi S., Lim S., Oh E., Park J., *et al.* (2008) SOMNUS, a CCCH-type zinc finger protein in *Arabidopsis*, negatively regulates light-dependent seed germination downstream of PIL5. *Plant Cell* 20(5): 1260–1277.
- Kim W., Lee Y., Park J., Lee N., Choi G. (2013) HONSU, a protein phosphatase 2C, regulates seed dormancy by inhibiting ABA signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 54(4): 555–572.

- Kim S.-I., Song S. I., Seo H. S. (2014) Cryptochrome 2 negatively regulates ABA-dependent seed germination in *Arabidopsis*. *Life Science Journal* 11(9): 880-884.
- Kircher S., *et al.* (1999) Light Quality-Dependent Nuclear Import of the Plant Photoreceptors Phytochrome A and B. *Plant Cell* 11(8): 1445-1456.
- Kleiner O., Kircher S., Harter K., Batschauer A. (1999) Nuclear localization of the *Arabidopsis* blue light receptor cryptochrome 2. *Plant Journal* 19(3): 289-96.
- Kruse E., Uehlein N., Kaldenhoff R. (2006) The aquaporins. *Genome Biology* 7(2): 206.
- Kukulski W., Schenk A. D., Johanson U., Braun T., de Groot B. L., Fotiadis D., Kjellbom P., Engel A. (2005) The 5A structure of heterologously expressed plant aquaporin SoPIP2;1. *Journal of Molecular Biology* 350(4): 611-616.
- Lee K. P., Piskurewicz U., Tureckova V., Carat S., Chappuis R., Strnad M., Fankhauser C., Lopez-Molina L. (2012) Spatially and genetically distinct control of seed germination by phytochromes A and B. *Genes & Development* 26(17): 1984-1996.
- Lin C., Ahmad M., Chan J., Cashmore A. R. (1996). CRY2, a second member of the *Arabidopsis* cryptochrome gene family. *Plant Physiology* 110: 1047-1048.
- Lin C., Ahmad M., Gordon D., Cashmore A. R. (1995). Expression of an *Arabidopsis* cryptochrome gene in transgenic tobacco results in hypersensitivity to blue, UV-A, and green light. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92(18): 8423-8427.
- Liu H., Liu B., Zhao C., Pepper M., Lin C. (2011) The action mechanisms of plant cryptochromes. *Trends in Plant Science* 16(12): 684-691.
- Liu Y., Shi L., Ye N., Liu R., Jia W., Zhang, J., (2009) Nitric oxide-induced rapid decrease of abscisic acid concentration is required in breaking seed dormancy in *Arabidopsis*. *New Phytologist* 183(4): 1030-1042.
- Luštinec J., Žárský V. (2005) Úvod do fyziologie vyšších rostlin, Karolinum.
- Ma J. F., Tamai K., Yamaji N., Mitani N., Konishi S., Katsuhara M., Ishiguro M., Murata Y., Yano M. (2006) A silicon transporter in rice. *Nature* 440: 688-691.
- Mathews, S., Sharrock R. A. (1997) Phytochrome gene diversity. *Plant Cell and Environment* 20: 666-667.
- Maurel C., Boursiac Y., Luu D. T., Santoni V., Shahzad Z., Verdoucq L. (2015) Aquaporins in Plants. *Physiological Reviews* 4: 1321-1358.
- Maurel C., Kado R. T., Guern J., Chrispeels M. J. (1995) Phosphorylation regulates the water channel activity of the seed-specific aquaporin  $\alpha$ -TIP. *EMBO Journal* 14(13): 3028-3035.



- Maurel C., Reizer J., Schroeder J. I., Chrispeels M. J., Saier M. H. Jr. (1994) Functional characterization of the *Escherichia coli* glycerol facilitator, GlpF, in *Xenopus* oocytes. *Journal of Biological Chemistry* 269(16): 11869–11872.
- Maurel C., Verdoucq L., Luu D. T., Santoni V. (2008) Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annual Review of Plant Biology* 59: 595–624.
- Maurel C., Chrispeels M. J., Lurin C., Tacnet F., Geelen D., Ripoche P., Guern J. (1997) Function and regulation of seed aquaporins. *Journal of Experimental Botany* 48: 421–430.
- Muller K., Tintelnot S., Leubner-Metzger G. (2006) Endosperm-limited Brassicaceae seed germination: abscisic acid inhibits embryo-induced endosperm weakening of *Lepidium sativum* (cress) and endosperm rupture of cress and *Arabidopsis thaliana*. *Plant & Cell Physiology* 47(7): 864–877.
- Murashige T., Skoog F. (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tohaoco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* 15(): 473–497.
- Murata K., Mitsuoka K., Hirai T., Walz T., Agre P., Heymann J.B., Engel A., Fijiyoshi Y. (2000) Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature* 407(6804): 599–605.
- Niemetz C. M., Tyerman S. D. (2000) Cannel-mediated permeation of ammonia gas through the peribacteroid membrane of soybean nodules. *FEBS* 465(2-3): 110–114.
- Nonogaki M., Sall K., Nambara E., Nonogaki H. (2014) Amplification of ABA biosynthesis and signaling through a positive feedback mechanism in seeds. *Plant Journal* 78(3): 527–539.
- Nowak J., Rudnicki R. M., Grzesik M. (1996) Effect of light quality on seed germination, seedling growth and pigment content in *Amaranthus caudatus* and *Celosia cristata nana*. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 4(4): 179-185.
- Oh E., Kang H., Yamaguchi S., Park J., Lee D., Kamiya Y., Choi G. (2009) Genome-wide analysis of genes targeted by PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3-LIKE5 during seed germination in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21(2): 403–419.
- Oh E., Yamaguchi S., Hu J., Yusuke J., Jung B., Paik I., Lee H. S., Sun T. P., Kamiya Y., Choi G. (2007) PIL5, a phytochrome-interacting bHLH protein, regulates gibberellin responsiveness by binding directly to the *GAI* and *RGA* promoters in *Arabidopsis* seeds. *Plant Cell* 19(4): 1192–1208.
- Otto B., Uehlein N., Sdorra S., Fischer M., Ayaz M., Belastegui-Macadam X., Heckwolf M., Lachnit M., Pede N., Priem N., Reinhard A., Siegfart S., Urban M., Kaldenhoff R. (2010) Aquaporin tetramer composition modifies the function of tobacco aquaporins. *Journal of Biological Chemistry* 285(41): 31253–31260.

- Park J., Lee N., Kim W., Lim S., Choi G. (2011) ABI3 and PIL5 collaboratively activate the expression of *SOMNUS* by directly binding to its promoter in imbibed *Arabidopsis* seeds. *Plant Cell* 23(4): 1404–1415.
- Pavlová L., Fischer L. (2011) Růst a vývoj rostlin, Karolinum.
- Piskurewicz U., Jikumaru Y., Kinoshita N., Nambara E., Kamiya Y., Lopez-Molina L. (2008) The gibberellic acid signaling repressor RGL2 inhibits *Arabidopsis* seed germination by stimulating abscisic acid synthesis and ABI5 activity. *Plant Cell* 20(10): 2729–2745.
- Piskurewicz U., Tureckova V., Lacombe E., Lopez-Molina L. (2009) Far-red light inhibits germination through DELLA-dependent stimulation of ABA synthesis and ABI3 activity. *EMBO Journal* 28(15): 2259–2271.
- Piterková J., Luhová L., Hofman J., Turečková V., Novák O., Petřivalský M., Fellner M. (2012) Nitric oxide is involved in light-specific responses of tomato during germination under normal and osmotic stress conditions. *Annals of Botany* 110(4): 767–776.
- Poppe C., Sweere U., Drumm-Herrel H., Schafer E. (1998) The blue light receptor cryptochrome 1 can act independently of phytochrome A and B in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 16(4): 465–471.
- Pokorny R., Klar T., Hennecke U., Carell T., Batschauer A., Essen L. O. (2008) Recognition and repair of UV lesions in loop structures of duplex DNA by DASH-type cryptochrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(1): 21023–21027.
- Prado K., Boursiac Y., Tournaire-Roux C., Monneuse J. M., Postaire O., Da Ines O., Schäffner A. R., Hem S., Santoni V., Maurel C. (2013) Regulation of *Arabidopsis* leaf hydraulics involves light-dependent phosphorylation of aquaporins in veins. *Plant Cell* 25(3): 1029–1039.
- Saijo Y., Sullivan J. A., Wang H., Yang J., Shen Y., Rubio V., Ma L., Hoecker U., Deng X.W., (2003) The COP1-SPA1 interaction defines a critical step in phytochrome A-mediated regulation of HY5 activity. *Genes & Development* 17(1): 2642–2647.
- Sakamoto K., Nagatani A. (1996) Nuclear localization activity of phytochrome B. *Plant Journal* 10(5): 859–868.
- Seo M., Hanada A., Kuwahara A., Endo A., Okamoto M., Yamauchi Y., North H., Marion-Poll A., Sun T.P., Koshiba T., Kamiya Y., Yamaguchi S., Nambara E. (2006) Regulation of hormone metabolism in *Arabidopsis* seeds: phytochrome regulation of abscisic acid metabolism and abscisic acid regulation of gibberellin metabolism. *Plant Journal* 48(3): 354–366

- Seo H. S., Watanabe E., Tokutomi S., Nagatani A., Chua N. H. (2004) Photoreceptor ubiquitination by COP1 E3 ligase desensitizes phytochrome A signaling. *Genes & Development* 188(1): 617–622.
- Seo H. S., Yang J. Y., Ishikawa M., Bolle C., Ballesteros M. L., Chua N. H. (2003) LAF1 ubiquitination by COP1 controls photomorphogenesis and is stimulated by SPA1. *Nature* 423(6943): 995–999.
- Shalitin D., Yang H., Mockler T. C., Maymon M., Guo H., Whitelam G. C., Lin C. (2002) Regulation of Arabidopsis cryptochrome 2 by blue-light-dependent phosphorylation. *Nature* 417(6890): 763–767.
- Shalitin D., Yu X., Maymon M., Mockler T., Lin C. (2003) Blue light-dependent in vivo and in vitro phosphorylation of Arabidopsis cryptochrome 1. *Plant Cell* 15(10): 2421–2429.
- Sharrock R. A., Clack T. (2002). Patterns of expression and normalized levels of the five Arabidopsis phytochromes. *Plant Physiology* 130(1): 442–456.
- Shimazaki K., Iino M., Zeiger E. (1986) Blue light-dependent proton extrusion by guard-cell protoplasts of *Vicia faba*. *Nature* 319: 324–326.
- Shin J., Kim K., Kang H., Zulfugarov I. S., Bae G., Lee C. H., Lee D., Choi G. (2009) Phytochromes promote seedling light responses by inhibiting four negatively-acting phytochrome-interacting factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(18): 7660–7665.
- Shinomura T., Nagatani A., Hanzawa H., Kubota M., Watanabe M., Furuya M. (1996) Action spectra for phytochrome A- and B-specific photoinduction of seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93(15): 8129–8133.
- Shu K., Zhang H., Wang S., Chen M., Wu Y., Tang S., Liu C., Feng Y., Cao X., Xie Q. (2013) ABI4 regulates primary seed dormancy by regulating the biogenesis of abscisic acid and gibberellins in *Arabidopsis*. *PLoS Genetics* 9: e1003577.
- Schleicher E., Kowalczyk R. M., Kay C. W. M., Hegemann P., Bacher A., Fischer M., Bittl R., Richter G., Weber S. (2004) On the reaction mechanism of adduct formation in LOV domains of the plant blue-light Receptor phototropin. *Journal of the American Chemical Society* 126(35): 11067–11076.
- Smith H. (1977) *The Molecular Biology of Plant Cells*, University of California Press.
- Sorieul M., Santoni V., Maurel C., Luu D. T. (2011) Mechanisms and effects of retention of over-expressed aquaporin AtPIP2;1 in the endoplasmic reticulum. *Traffic* 12(4): 473–482.

- Stephenson P. G., Fankhauser C., Terry M. J. (2009) PIF3 is repressor of chloroplast development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(18): 7654–7659.
- Taiz L., Zeiger E. (2010) *Plant Physiology*, 5th Edition, Sinauer Associates, Inc.
- Takano J., Wada M., Ludewig U., Schaaf G., von Wiren N., Fujiwara T. (2006) The *Arabidopsis* major intrinsic protein NIP5;1 is essential for efficient boron uptake and plant development under boron limitation. *Plant Cell* 18(6): 1498–1509.
- Terashima I., Ono K. (2002) Effects of HgCl<sub>2</sub> on CO<sub>2</sub> dependence of leaf photosynthesis: Evidence indicating involvement of aquaporins in CO<sub>2</sub> diffusion across the plasma membrane. *Plant & Cell Physiology* 43(1): 70–78.
- Todo T., Ryo H., Yamamoto K., Toh H., Inui T., Ayaki H., Nomura T., Ikenaga M. (1996) Similarity among the *Drosophila* (6-4) photolyase, a human photolyase homolog, and the DNA photolyase blue-light photoreceptor family. *Science* 272(5258): 109–112.
- Törnroth-Horsefield S., Wang Y., Hedfalk K., Johanson U., Karlsson M., *et al.* (2006) Structural mechanism of plant aquaporin gating. *Nature* 439(7077): 688–694.
- Tournaire-Roux C., Sutka M., Javot H., Gout E., Gerbeau P., Luu D. T., *et al.* (2003) Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins. *Nature* 425(6956): 393–397.
- Vander Willigen C., Postaire O., Tournaire-Roux C., Boursiac Y., Maurel C. (2006) Expression and inhibition of aquaporins in germinating *Arabidopsis* seeds. *Plant & Cell Physiology* 47(9): 1241–1250.
- Welbaum G. E., Bradford K. J., Yim K.-O., Ouloch, M. O. (1998) Biophysical, physiological and biochemical processes regulating seed germination. *Seed Science Research* 8(2): 161–172.
- Wu G., Spalding E. P., (2007) Separate functions for nuclear and cytoplasmic cryptochrome 1 during photomorphogenesis of *Arabidopsis* seedlings. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(47): 18813–18818.
- Yamaguchi R., Nakamura M., Mochizuki N., Kay S. A., Nagatani A. (1999) Light-dependent Translocation of a Phytochrome B-GFP Fusion Protein to the Nucleus in Transgenic *Arabidopsis*. *The Journal of Cell biology* 145(3): 437–445.
- Yamauchi Y., Takeda-Kamiya N., Hanada A., Ogawa M., Kuwahara A., Seo M., Kamiya Y., Yamaguchi S. (2007) Contribution of gibberellin deactivation by AtGA2ox2 to the suppression of germination of dark-imbibed *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant & Cell Physiology* 48(3): 555–561.

Yang H. Q., Tang R. H., Cashmore A. R. (2001) The signaling mechanism of Arabidopsis CRY1 involves direct interaction with COP1. *Plant Cell* 138(1): 2573–2587.

Yang H. Q., Wu Y. J., Tang R. H., Liu D., Liu Y., Cashmore A. R. (2000) The C termini of Arabidopsis cryptochromes mediate a constitutive light response. *Cell* 103(5): 815–827.

Yu X., Klejnot J., Zhao X., Shalitin D., Maymon M., Yang H., Lee J., Liu X., Lopez J., Lin C. (2007) Arabidopsis cryptochrome 2 completes its posttranslational life cycle in the nucleus. *Plant Cell* 198(1): 3146–3156.

Zelazny E., Borst J. W., Muylaert M., Batoko H., Hemminga M. A., Chaumont F. (2007) FRET imaging in living maize cells reveals that plasma membrane aquaporins interact to regulate their subcellular localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(30): 12359–12364.

Zhou S. F., Sun L., Valdes A. E., Engstrom P., Song Z. T., Lu S. J., Liu J. X. (2015) Membrane-associated transcription factor peptidase, site-2 protease, antagonizes ABA signaling in *Arabidopsis*. *New Phytologist* 208(1): 188–197.

Zhu L., Bu Q., Xu X., Paik I., Huang X., Hoecker U., Deng X. W., Huq E. (2015) CUL4 forms an E3 ligase with COP1 and SPA to promote light-induced degradation of PIF1. *Nature Communications* 6: 7245.