

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2015

Miroslava Hrbáčková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Fenotypová charakterizácia transgénnej línie
Arabidopsis s annexínom 1 po abiotickom strese

Bakalárska práca

Miroslava Hrbáčková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2015

Vedoucí práce: Mgr. Olga Šamajová, Dr.

„Prehlasujem, že prácu som vypracovala samostatne s použitím odbornej literatúry a pod dohľadom školiteľky.“

V Olomouci dňa:

.....

Súhrn

Stres je definovaný ako činiteľ životného prostredia, ktorý môže vyvolať potenciálne poškodenie v rastlinách. Rastliny sú sesilné organizmy vystavované biotickým a abiotickým stresom. Nemajú schopnosť fyzicky uniknúť pred nepriaznivými vplyvmi prostredia, a preto si vyvinuli zložité biochemické, molekulárne a genetické mechanizmy, aby zabránili stresu. V reakcii na vonkajšie prostredie sú rastliny schopné spustiť obrannú reakciu. V dnešnej dobe je hlavným problémom sucho a s tým spojené zasolenie pôdy, ale aj osmotický stres, či oxidatívne poškodenie rastlín. Cieľom tejto bakalárskej práce bolo sledovanie zmien pri klíčení a raste koreňov *Arabidopsis thaliana* a porovnanie divokého typu Col-0 s transgénymi líniami pMAT-GFP (cytoplasmatický fúzny proteín s GFP) a Ann1-GFP (annexin 1 značený s GFP pod kontrolou vlastného promótoru) v podmienkach soľného a oxidatívneho stresu. Na soľný stres najcitlivejšie reagovala transgénna línia Ann1-GFP. Naproti tomu na oxidatívny stres bola transgénna línia Ann1-GFP najrezistentnejšia.

Ďalším cieľom bolo štúdium zmien v expresii Ann1-GFP po pôsobení soľného stresu a inhibítorov mikrotubulov s použitím konfokálnej laserovej mikroskopie na *in vivo* lokalizácie. Aplikácia soľného stresu zvyšovala a aplikácia inhibítorov znižovala intenzitu fluorescencie Ann1-GFP. Výsledky z *in vivo* lokalizácie po pôsobení soľného stresu boli potvrdené pomocou biochemickej immunoblotovej analýzy.

Pomocou imunofluorescenčného značenia tubulínu metódou „whole mount“ bola sledovaná organizácia mikrotubulov v koreňoch klíčencov línie Ann1-GFP. V meristematických bunkách bola pozorovaná normálna organizácia mitotických mikrotubulov a bunkových delení.

Summary

Stress is defined as a factor that can cause potential damage to the plants. Plants are sessile organisms exposed to biotic and abiotic stresses. They lack the ability to physically escape these adverse environmental challenges, thus they have developed complex biochemical, molecular and genetic mechanisms to prevent stress. Plants developed defense reaction in response to surrounding environment. Nowadays, the main problem is drought and associated soil salinity, but also osmotic and oxidative stress. The main aim of my bachelor thesis was monitoring changes in germination and root growth of *Arabidopsis thaliana* and comparison of wild type Col-0 with transgenic lines pMAT-GFP (cytoplasmic fusion protein with GFP) and Ann1-GFP (annexin 1 labeled with GFP under the control of its own promoter) under conditions of salt and oxidative stresses. Transgenic line Ann1-GFP responded most sensitively to the salt stress. On the other hand, it was the most resistant to the oxidative stress.

Another goal was to study changes in the expression of Ann1-GFP after application of salt stress and microtubule inhibitors, using confocal laser microscopy for *in vivo* localization. Salt application increased fluorescent intensity while microtubule inhibitors decreased fluorescence intensity of Ann1-GFP. Moreover, overexpression of annexin 1 was detected in the transgenic line using biochemical immunoblot analysis.

Organization of microtubules was studied in roots of Ann1-GFP line employing “whole mount” immunofluorescent labeling of tubulin. Normal organization of mitotic microtubules and cell divisions was observed in meristematic cells.

Pod'akovanie

„Rada by som pod'akovala hlavne svojej školiteľke bakalárskej práce Mgr. Olge Šamajovej, Dr. za odborné vedenie, ochotu, pripomienky a čas, ktorý mi venovala pri spracovaní tejto práce. Ďalej by som rada pod'akovala aj Ing. Tomášovi Takáčovi, Ph.D. za pomoc pri experimentálnej práci. Ďakujem aj celému kolektívu Oddelenia bunkovej biológie za to, že mi poskytli priateľskú atmosféru a boli vždy ochotní pomôcť a poradiť. A na záver aj Prof. RNDr. Jozefovi Šamajovi, DrSc. za poskytnutie priestorov a možnosti pracovať v laboratóriu. Táto práca bola podporená študentským projektom IGA PŕF2015_015.“

Obsah

1. Úvod	10
2. Ciele práce	11
3. Súčasný stav riešenej problematiky	12
3.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> (Arábovka thalova).....	12
3.2. Annexíny.....	12
3.2.1. História annexínov.....	12
3.2.2. Štruktúra annexínov.....	13
3.2.2.1. Charakteristické štrukturálne rysy.....	13
3.2.2.2. Annexíny u <i>Arabidopsis thaliana</i>	15
3.2.2.3. Annexín 1 (AnnAt1).....	17
3.3. Vápniková signalizácia	18
3.3.1. Vápnik-viažuce proteíny.....	18
3.3.1.1. Ca ²⁺ -viažuce proteíny s EF-motívom (Ca ²⁺ senzory)	18
3.3.1.2. Ca ²⁺ -viažuce proteíny bez EF-motívu.....	20
3.3.2. Annexíny: Ca ²⁺ -viažuce proteíny	21
3.3.2.1. Interakcia s kyslými fosfolipidami.....	21
3.4. Cytoskelet rastlín	22
3.4.1. Inhibítory mikrotubulov	23
3.4.1.1. Taxol.....	23
3.4.1.2. Oryzalín.....	24
3.5. Stresové odpovede rastlín	24
3.5.1. Centrálné regulátory v rastlinných odpovediach	25
3.5.1.1. ROS a RNS.....	25
3.5.1.2. Vápnik ako všadeprítomný posol.....	26
3.5.2. Stresové odpovede a funkcia annexínov	26
3.5.2.1. Osmotický stres a annexín 1.....	26
3.5.2.2. Oxidatívny stres a annexín 1	28
4. Experimentálna časť	31
4.1. Materiál.....	31

4.1.1.	Biologický materiál	31
4.1.2.	Chemikálie.....	31
4.1.3.	Roztoky a médiá	32
4.1.4.	Prístroje.....	36
4.1.5.	Programy	37
4.2.	Metodika	37
4.2.1.	Príprava pracovných médií pre kultiváciu rastlín <i>in vitro</i>	37
4.2.2.	Kultivácia a prenos rastlín v stresových podmienkach <i>in vitro</i>	38
4.2.2.1.	Pôsobenie hyperosmotického stresu na rast koreňa Ann1-GFP rastlín.....	38
4.2.2.2.	Pôsobenie hyperosmotického stresu na klíčenie semien Ann1-GFP	38
4.2.2.3.	Pôsobenie hyperosmotického stresu na fenotyp koreňa Ann1-GFP	38
4.2.2.4.	Pôsobenie oxidatívneho stresu	38
4.2.3.	<i>In vivo</i> lokalizácia annexínu 1 v odpovedi na pôsobenie cytoskeletálnych inhibítorov a abiotického stresu.....	39
4.2.4.	SDS-PAGE elektroforéza a Western blott.....	40
4.2.5.	Imunolokalizácia mikrotubulov pomocou metódy „whole mount“	41
5.	Výsledky.....	43
5.2.	Fenotypová charakterizácia transgéennej línie Ann1-GFP	43
5.2.1.	Pôsobenie soľného stresu na rast koreňov	43
5.2.2.	Pôsobenie soľného stresu na klíčivosť rastlín	46
5.2.3.	Pôsobenie soľného stresu na vzdialenosť koreňovej špičky od koreňových vláskov.....	50
5.2.4.	Pôsobenie oxidatívneho stresu na zmeny fenotypu Ann1-GFP rastlín	51
5.3.	<i>In vivo</i> lokalizácia Ann1-GFP po abiotickom strese	54
5.3.1.	Lokalizácia Ann1-GFP v bunkách <i>A. thaliana</i> v kontrolných podmienkach.....	54
5.3.2.	Vplyv mikrotubulárnych inhibítorov: taxol a oryzalín.....	54
5.3.3.	Vplyv soľného stresu	59
5.4.	Biochemická analýza Ann1-GFP po abiotickom strese.....	62
5.5.	Imunocytochemické štúdium cytoskeletu u transgéennej línie Ann1-GFP metódou „whole mount“	64
6.	Diskusia	66
7.	Záver.....	69

8.	Zoznam použitej literatúry.....	70
9.	Zoznam použitých skratiek.....	81

1. Úvod

Rastliny predstavujú sesilnú skupinu organizmov, ktorá sa neustále musí prispôbovať meniacim sa podmienkam životného prostredia. V snahe chrániť sa, si rastliny vyvinuli zložité biochemické, molekulárne a genetické mechanizmy na rýchle zachytávanie a prenos signálov z prostredia, ktoré vedú k odpovediam. Vedomosti získané v priebehu posledných 15 rokov poukazujú na to, že rastlinné annexíny sa môžu podieľať na obranných mechanizmoch pri stresových reakciách. Ide o Ca^{2+} -viažuce proteíny, ktoré sa nachádzajú v živočíšnych, rastlinných bunkách a v hubách. Štrukturálne sú annexíny charakterizované dvoma doménami. Prvá z nich predstavuje vysoko konzervovanú α -helikálnu proteínovú doménu a druhá zahŕňa NH_2 -terminálne jadro, ktoré je špecifické pre každého člena rodiny annexínov. Prvá doména pozostáva zo štyroch opakovaní (I - IV) zložených zo sekvencií asi 70 aminokyselín. Obsahujú unikátne väzbové miesto pre Ca^{2+} v prvom a štvrtom opakovaní (Gerk *et Moss*, 2002; Moss *et Morgan*, 2004; Konopka-Postupolska, 2007; Konopka-Postupolska *et al.*, 2011). Predpokladá sa ich úloha pri regulácii dôležitých procesov, ako sú rast a vývoj rastlín (Clark *et al.*, 2001, 2012). Annexíny sú rôznorodá skupina proteínov, ktoré majú spoločnú funkciu združovania membrán, ale odlišné molekulárne mechanizmy (Konopka-Postupolska *et al.*, 2011). V genóme *A. thaliana* sa nachádza osem členov z rodiny annexínov. Všetkých 8 génov kóduje proteíny a majú molekulovú hmotnosť okolo 36 kDa (Monastyrskaya *et al.*, 2009). Najviac zastúpený annexín z radu tejto multigénnej rodiny je annexín 1 (AnnAt1). Je exprimovaný hlavne v koreni na cytoplazmatickej membráne a v cytoplazme, kde sa zapája do stresových odpovedí (Lee, 2004).

2. Ciele práce

Teoretická časť

1. Spracovanie literárnej rešerše so zameraním na problematiku vápnikový signaling a cytoskelet rastlín a odpovede rastlinných buniek na stres.

Praktická časť

1. Otestovanie a nastavenie optimálnych kultivačných podmienok *in vitro* na pozorovanie vývinu a rastu rastlín (soľný a oxidatívny stres).
2. Charakteristika fenotypových zmien rastlín kultivovaných v stresových podmienkach. Kvalitatívne a kvantitatívne vyhodnotenie rastových parametrov koreňov.
3. Mikroskopická dokumentácia annexínu 1 po pôsobení inhibítorov a soľného stresu.
4. Imunolokalizácia cytoskeletu metódou „whole mount“.

3. Súčasný stav riešenej problematiky

3.1. *Arabidopsis thaliana* (Arábovka thalova)

A. thaliana je malá rastlina z čeľade kapustovitých (Brassicaceae). Stala sa jedným z najdôležitejších výskumných modelov v rastlinnej biológii (Meinke *et al.*, 1998). Pre výskumné účely bola prvýkrát použitá v 40-tych rokoch 20. storočia. Spočiatku sa jednalo o genetické výskumy, pretože táto rastlina ľahko tvorila mutanty. Od 80-tych rokov 20. storočia sa začala využívať ako modelová rastlina v rastlinnej fyziológii a biochémií. Genóm *A. thaliana* (5 chromozómov, 25 500 génov) je celý osekvenovaný (Arabidopsis Genome Initiative, 2000).

Arabidopsis thaliana sa využíva ako modelová rastlina hlavne pre:

1. Krátky životný cyklus.
2. Malú veľkosť rastliny.
3. Veľké množstvo potomstva a relatívne malý genóm.
4. Existencia rozsiahlych genetických máp všetkých piatich chromozómov.
5. Ľahko transformovaná pomocou baktérie *Agrobacterium tumefaciens*, ktorá slúži na vloženie nových génov do rastlinných buniek (Koornneef *et Meinke*, 2010).

3.2. Annexíny

Annexíny sú homologická, štruktúrne príbuzná multigénna rodina proteínov zapojených do membránovej organizácie, vezikulárneho transportu a do bunkových procesov ako sú rast, diferenciácia či opravy (Clark *et Roux*, 1995; Clark *et al.*, 2012). Charakteristickou vlastnosťou týchto proteínov je, že sa môžu reverzibilne viazať na membránové fosfolipidy. Ich génová, proteomická a transkriptomická analýza poskytla údaje o ich rozmanitosti (Clark *et al.*, 2012).

3.2.1. História annexínov

Annexíny boli identifikované u viac než 65 druhov, vrátane prvokov, húb, rastlín a stavovcov. Živočíšne annexíny sú známe už dlhú dobu. Naproti tomu, rastlinné annexíny boli objavené až v roku 1989 u rajčiaka (*Lycopersicon esculentum*). Boli identifikované použitím protilátok voči živočíšnym annexínom (Boustead *et al.*, 1989) a dodnes sú predmetom intenzívneho vedeckého štúdia (Laohavisit *et Davies*, 2011; Zhang *et al.*, 2015). Názov „annexín“ bol navrhnutý ako pomenovanie pre veľkú skupinu príbuzných proteínov v roku 1990 a je odvodený z gréckeho slova „priviesť/ držať pohromade“. Názov bol vybraný, aby popisoval hlavné vlastnosti všetkých alebo aspoň takmer všetkých annexínov. Jednou z ich vlastností je schopnosť viazať sa na niektoré biologické štruktúry, najmä membrány alebo udržiavať ich spolu.

Prvým popísaným annexínom bol izolovaný, purifikovaný proteín, ľudský annexín A₇, neskôr známy ako synexin (Creutz *et al.*, 1978). Annexíny sa riadia určitou nomenklatúrou a sú rozdelené do 4 skupín (rodín, A – E). U stavovcov patria do skupiny A a sú značené A₁ – A₁₃ (alebo ANXA₁ – ANXA₁₃), až na A₁₂, ktorý nepatrí do oficiálneho názvoslovia. Ľudských 12 annexínov má veľkosť od 15 kb do 96 kb a sú rozptýlené v celom genóme na chromozómoch 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10 a 15. U bezstavovcov (prvoústovce aj druhoústovce) sú annexíny zaradené do rodiny B. Genómy členov tejto rodiny prešli mnohými duplikáciami, čo viedlo k rôznym usporiadaniam génov, proteínových štruktúr a chromozomálnych máp. U niektorých jednobunkových organizmov ako sú huby, hlenky a skupina chromalveolata, sú annexíny radené do rodiny C. V prípade rastlín ide o annexínovú rodinu D a rodina E bola popísaná u jednobunkovcov.

Rastlinné annexíny (rodina D) tvoria monofyletické klastrá, ktorých členovia väčšinou postrádajú amino-terminálne domény a funkčné väzbové miesta pre vápnik v druhom a treťom opakovaní. Tie vznikali zhruba pred tisíc miliónmi rokov z jedného z troch základných členov z čeľade machov, papradí a nahosemenných rastlín. Ďalších 17 podčeľadí objavili v kvitnúcich krytosemenných rastlinách v dôsledku génovej duplikácie. Osem annexínových génov u *A. thaliana* a deväť u ryže zahŕňajú len dva hlavné ortology, zvyšok sú špecifické produkty duplikátov v oddelení dvojkľúčolistových a jednokľúčolistových rastlín (Gerke *et Moss*, 2002; Moss *et Morgan*, 2004).

3.2.2. Štruktúra annexínov

Annexíny sú rozpustné hydrofilné proteíny, viažuce sa na negatívne nabité fosfolipidy v závislosti na vápniku. Vyznačujú sa komplexnou sadou funkcií (Gupta, 2012; Jami *et al.*, 2012; Kodavali *et al.*, 2013; Lizarbe *et al.*, 2013). Bolo identifikovaných viac než tisíc proteínov zo skupiny annexínov, a to hlavne u eukaryot, prokaryot, ale aj u kvasiniek či húb. Annexíny interagujú s rôznymi zložkami bunkovej membrány (napríklad kyselina fosfatidová, fosfatidylserín, fosfatidylinozitol), a tak sa podieľajú na štruktúrnej organizácii bunky, na intracelulárnej signalizácii prostredníctvom enzýmov, ale riadia aj rast a taktiež môžu slúžiť ako samotné atypické vápnikové kanály (Gerke *et Moss*, 2002; Moss *et Morgan*, 2004).

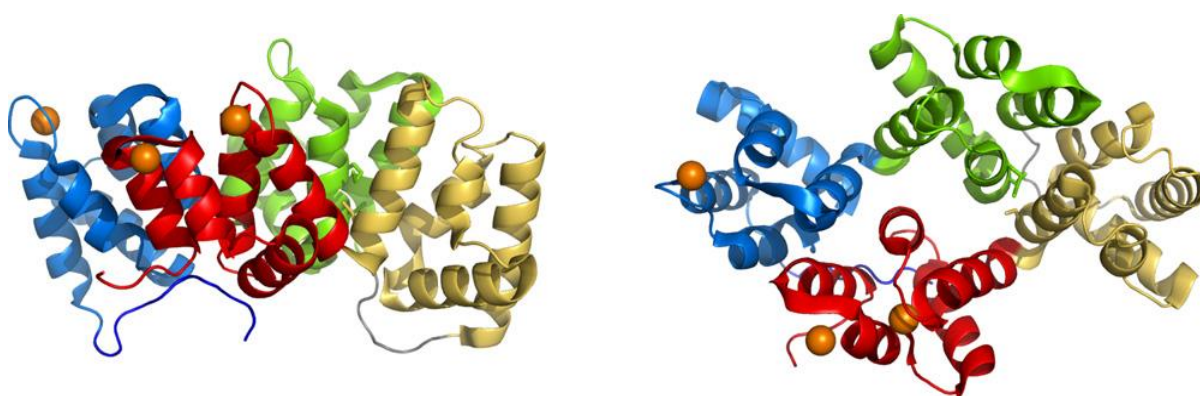
3.2.2.1. Charakteristické štruktúrne rysy

Na úrovni primárnej štruktúry sa živočíšne annexíny vyznačujú tetrádou (I – IV) opakujúcich sa sekvencií 70 aminokyselín, čo však neplatí pre annexín VI, ktorý obsahuje osem domén (Hofmann *et al.*, 1997). Opakujúce sa tetrády tvoria C-koncovú doménu (Hofmann, 2004).

Každé opakovanie tvorí päť charakteristických helix slučiek (A – E) a tieto sekvencie sa zhodujú v 25 – 35% medzi sebou a v 45 – 50% medzi rôznymi annexínmi (Smith *et Moss*, 1994). Na opačnej strane molekuly sa nachádza veľmi variabilná NH₂-terminálna oblasť, ktorá je typická pre rôzne typy annexínov (Gerke *et Moss*, 2002; Moss *et Morgan*, 2004; Konopka-Postupolska, 2007; Konopka-Postupolska *et al*, 2011). Táto oblasť sa líši v dĺžke, v poradí aminokyselín a mnohí predpokladajú, že stanovuje individualitu funkcií daných annexínov (Clark *et Roux*, 1995). Annexínová doména pozostávajúca zo 70 aminokyselín obsahuje konzervovaný endonexínový záhyb (K-G-X-G-T-{38}-D/E), ktorý je schopný viazať Ca²⁺ (Mortimer *et al.*, 2008). Každá doména má tvar zakriveného disku. Konvexná strana obsahuje väzbové miesta pre kationy vápnika - Ca²⁺ (označované ako typ II a typ III) a smeruje k povrchu membrány, kde je annexín asociovaný s lipidmi (Gerke *et Moss*, 2002). Ióny Ca²⁺ tvoria most medzi annexínom a záporne nabitými membránovými fosfolipidmi. Konkávna strana smeruje k cytosolu, kde môže interagovať s ostatnými časťami proteínu alebo s inými cytosolickými molekulami (Lizarbe *et al.*, 2013).

Rastlinné annexíny sa aj napriek spoločnému evolučnému predkovi líšia od živočíšnych annexínov a tvoria oddelenú monofyletickú skupinu, ako to vyplýva zo spoločného fylogenetického stromu živočíšnych a rastlinných annexínov (Mortimer *et al.*, 2008). Annexíny u rastlín majú taktiež evolučne konzervovanú štruktúru, ktorá sa skladá z C-terminálneho jadra, ktoré obsahuje 4 domény (I – IV) (Obr. 1). Každá doména obsahuje štyri helix slučky (A, B, D, E) a piatu skrutkovicu (C), ktorá je takmer kolmá na ostatné slučky (Gerke *et Moss*, 2002; Gerke *et al.*, 2005; Talukdar *et al.*, 2009). Charakteristickú endonexínovú sekvenciu (Kourie *et Wood*, 2000) obsahuje len v prvej a štvrtej doméne. Bola popísaná jej kryštálová štruktúra (Hofmann *et al.*, 2000, 2003). V tretej doméne sa nachádza dvojväzbový zvyšok v 39. polohe a štvrtá doména je bohatá na sekvencie G-T. V druhej doméne nie je zachovaná endonexínová sekvencia a vysoko konzervovaný zvyšok histidínu nahrádza dvojväzbový zvyšok v 39. polohe (Hofmann, 2004). Rastlinné annexíny majú v priemere väčší povrch ako annexíny u cicavcov (Clark *et al.*, 2001). N-terminálna oblasť všetkých rastlinných annexínov je krátka (~ 10 aminokyselín). Každá annexínová doména má tvar mierne zakriveného disku. Konvexná strana záhybu obsahuje 17 aminokyselín s charakteristickým motívom KGhGTDEXXIOPILApR (H = hydrofóbny zvyšok, X = akýkoľvek zvyšok, p = polárny zvyšok) a obsahuje väzbové miesto pre Ca²⁺ typu II, obsahujúce sekvenciu GXGTD (de Carvalho-Niebel *et al.*, 1998; Clark *et al.*, 2001; Mortimer, 2008). Konkávna strana interaguje s NH₂-terminálnou doménou alebo inými cytoplazmatickými molekulami. Annexín môže byť asociovaný s membránou alebo

dokonca vložený do membrány. Pri experimentoch s použitím umelých lipidových dvojvrstiev sa zistilo, že interakcia annexínov s membránou závisí na zložení fosfolipidovej dvojvrstvy, koncentrácii annexínov, koncentrácii Ca^{2+} a na transmembránovom napätí (Gerke *et Moss*, 2002; Mortimer *et al.*, 2008; Laohavisit *et Davies*, 2011). Väčšina annexínových proteínov sa nachádza v cytosole, ale niektoré môžeme nájsť aj na cytoplazmatickej membráne, na endomembránach alebo na jadrovej membráne (de Carvalho-Niebel *et al.*, 2002). U *Medicago trunculata* bol annexín nájdený v koreni (de Carvalho-Niebel *et al.*, 1998). Annexíny môžu byť spojené s membránovými váčkami (vezikuly) alebo v Golgi aparáte, zapojené do vezikulárneho transportu (Carter *et al.*, 2004).



Obr. 1 Štruktúra annexínov, ilustrovaná na základe Ca^{2+} -viažucej štruktúry annexínu Gh1 z bavlny. Farebná schéma zdôrazňuje N-terminálnu doménu (tmavomodrá), doménu I (svetlomodrá), doménu II (zelená), doménu III (žltá), doménu IV (červená) a linker (šedá). Vápnikové ióny viazané na doméne I/IV sú zobrazené ako oranžové gule. Obrázok predstavuje čelnú plochu proteínu (vľavo) a konvexnú stranu proteínu (vpravo) (prevzaté z Konopka-Postupolska *et al.*, 2011).

3.2.2.2. Annexíny u *Arabidopsis thaliana*

Sekvenovanie genómu u *Arabidopsis thaliana* ukázalo, že rastlinné annexíny predstavujú osemčlennú multigénnu rodinu (Clark *et al.*, 2001; Jami *et al.*, 2012). Vysoko konzervatívna štruktúra annexínov predstavuje jedno z kritérií pri vyhodnocovaní údajov. Génové analýzy *Arabidopsis* (Gidrol *et al.*, 1996) a aj iných rastlín (Proust *et al.*, 1999) ukázali, že annexínová génová rodina je relatívne jednoduchá. *A. thaliana* má 8 rôznych annexínových génov, Annexín *Arabidopsis*1-8 (*AnnAt1-AnnAt8*; Clark *et Roux*, 1995; Clark *et al.*, 2001). Všetkých 8 génov kóduje proteíny s molekulovou hmotnosťou v oblastiach 32 až 42 kDa. *AnnAt1* sa nachádza na chromozóme 1, *AnnAt3* a *AnnAt4* sa nachádzajú na chromozóme 2, *AnnAt6* a *AnnAt7* na chromozóme 5 v tandemovom usporiadaní. *AnnAt3* a *AnnAt4* zdieľajú 5' oblasť promótoru, čo má za následok ich dvojitú reguláciu transkripcie. Zaujímavým postrehom je aj fakt, že *AnnAt3*,

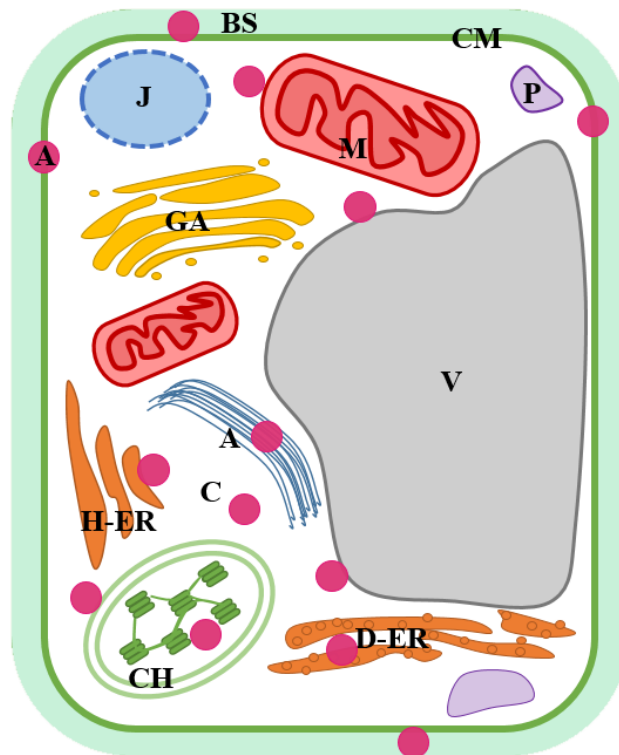
AnnAt4, *AnnAt5* a *AnnAt8* majú zhodnú génovú štruktúru, ktorá obsahuje 6 exónov. Naproti tomu, analýza zvyšných štyroch annexínov (*AnnAt1*, *AnnAt2*, *AnnAt6* a *AnnAt7*) ukázala, že sa zhodujú v strate intrónov. *AnnAt1* stratil posledné tri intróny, *AnnAt2* postráda posledný intrón a annexíny *AnnAt6*, *AnnAt7* prišli o posledné dva intróny (Cantero *et al.*, 2006). Všeobecne platí, že rastlinné annexíny majú primárnu sekvenciu od seba odlišnú. *AnnAt2*, *AnnAt6* a *AnnAt7* sú navzájom najviac podobné, bola zistená 80 – 86% identita na úrovni nukleotidov a 76 – 83% zhoda na úrovni aminokyselín. *AnnAt3* a *AnnAt4* sa zdajú byť na úrovni aminokyselín odlišné. Keď sú porovnávané všetky opakujúce sa domény 8 annexínov u *Arabidopsis* s inými rastlinnými annexínmi (Barton *et al.*, 1991), je zrejme, že tieto štruktúrne opakovania pomáhajú definovať annexíny u *A. thaliana*. Celkovo je známe, že prvá a štvrtá doména vykazujú najvyššiu úroveň konzervatívnosti, zatiaľ čo druhá a tretia doména sú najviac odlišné (Cantero *et al.*, 2006).

Hlavným znakom všetkých annexínov je schopnosť viazať sa na negatívne nabité fosfolipidy v závislosti od iónov vápnika (Ca^{2+}). Väzbové miesto pre Ca^{2+} , označované ako typ II, pozostáva zo sekvencie GXGTD, ktorá sa nachádza v endonexínovom záhybe a je nasledovaná 42 aminokyselinami, kedy prvou aminokyselinou je glycín a zvyšok kyseliny glutámovej (Gly, E) alebo kyseliny asparagovej (Asp, D). Nachádza sa tu aj tryptofánový zvyšok (Trp, W) umiestnený v prvej doméne u väčšiny rastlinných annexínov, ktoré môžu byť dôležité pri fosfolipidovej väzbe. Pri štúdiu výskytu väzbových miest pre Ca^{2+} typu II sa zistilo, že *AnnAt1*, *AnnAt2*, *AnnAt6* a *AnnAt7* majú konzervované väzbové miesto pre ión vápnika (substitúcia jednej aminokyseliny) v prvej a štvrtej doméne. *AnnAt3* má konzervované väzbové miesto tiež v prvej aj štvrtej doméne, zatiaľ čo *AnnAt5* má väzbové miesto konzervované len vo štvrtej doméne. *AnnAt4* má iba jednu potenciálne viažucu slučku, ktorá sa nachádza v prvej doméne (Clark *et al.*, 2001).

Okrem väzbových miest pre Ca^{2+} , existujú aj iné sekvencie, ktoré boli navrhnuté ako dôležité pre funkciu annexínov. Jednou z nich je napríklad sekvencia 30 aminokyselín viažucich hem-sekvenciu, ktorá sa nachádza v rastlinných peroxidázach. Ďalšou potenciálne dôležitou sekvenciou je aj motív viažuci GTP (označený CXXXXGKT a DXXG) alebo motív viažuci F-aktín (označený IRI) (Clark *et al.*, 2001).

3.2.2.3. Annexín 1 (AnnAt1)

Annexín 1 je prvý z 8 annexínových proteínov nachádzajúcich sa u *A. thaliana*. AnnAt1 má molekulovú hmotnosť 36 kDa a patrí do rodiny membránových proteínov viažucich Ca^{2+} . Expresia týchto 8 génov je diferenciálne regulovaná rôznymi abiotickými stresmi (Cantero *et al.*, 2006; Laohavisit *et al.*, 2008; Monastyrskaya *et al.*, 2009). Na základe analýz proteómu, imunolokalizácie, rádioaktívneho značenia a GFP štúdií, sa ukázalo, že AnnAt1 sa nachádza na plazmatickej membráne (ako integrálny proteín), na endoplazmatickom retikule, na tonoplaste vakuoly, na vonkajšej membráne mitochondrií a chloroplastov a v bunkovej stene (Obr. 2) (Guelette *et al.*, 2012; Laohavisit *et al.*, 2011; Obata *et al.*, 2011). Proteín sa nachádza vo forme monomeru alebo homodimeru. AnnAt1 je exprimovaný hlavne v koreni, zriedka v kvetnom pletive (Lee *et al.*, 2004).



Obr. 2 Subcelulárna lokalizácia annexínu 1 (ružové kruhy, A) v idealizovanej rastlinnej bunke (upravené podľa Mortimer *et al.*, 2008). Lokalizácia závisí na mnohých faktoroch, vrátane rastlinného druhu, typu tkaniva a prítomnosti cytosolického Ca^{2+} . Lokalizácia annexínu 1 (A) v cytoplazme (C), bunkovej stene (BS), na cytoplazmatickej membráne (CM), na membráne vakuoly (V), chloroplastu (CH), mitochondrie (M), v asociácii s hladkým ER (H-ER), drsným ER (D-ER), s aktínom (A). Jadro (J), Golgi aparát (GA), peroxizómy (P).

3.3. Vápniková signalizácia

Vápenaté ióny (Ca^{2+}) sú univerzálnym nosným signálom v živých organizmoch, vrátane rastlín. Intracelulárna vápniková signalizácia patrí medzi kľúčové problémy, ktoré študuje bunková biológia. Voľný cytosolický vápnik ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$) je väčšinou výsledkom dvoch protichodných reakcií. Importu Ca^{2+} cez kanály alebo exportu Ca^{2+} cez pumpy. Odstraňovanie zvýšeného Ca^{2+} z cytosolu do apoplastu alebo do intracelulárnych organel vyžaduje aktívny transport. Kľúčovými antiportami sú Ca^{2+} -ATPáza a $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ antiportér.

V rastlinách má Ca^{2+} veľa základných funkcií. Napríklad, je esenciálnym prvkom dôležitým pre rast a vývoj rastlín, hlavne ich koreňa. Ca^{2+} pomáha pri tvorbe mikrotubulov, ktoré sú zásadné počas bunkového delenia. Zohráva stavebnú úlohu v bunkovej stene a membráne, kde existuje vo forme vápnikového pektátu, hromadí sa a viaže bunky dohromady (Mahajan *et Tuteja*, 2005). Ca^{2+} je nutný pre rast peľového vrecúška (Sanders *et al.*, 2002). Ďalej je potrebný na výmenu anorganických katiónov vo vakuole a funguje ako intracelulárny posol v cytoplazme (Mahajan *et Tuteja*, 2005). Niektoré gény sú závislé na Ca^{2+} . Analýzou transkriptomu niektorých rastlín sa zistilo, že 230 génov je regulovaných Ca^{2+} , z ktorých 162 malo zvýšenú a 68 zníženú aktivitu (Kaplan *et al.*, 2006). Signálne dráhy Ca^{2+} môžu upravovať K^+ kanál u Arabidopsis. Vápnik je dôležitou zložkou v signálnej dráhe sacharózy, ktorá vedie k indukcii syntézy fruktánu (Martinez-Noel *et al.*, 2006). Ca^{2+} sa taktiež podieľa na regulácii priebehu bunkového cyklu v odpovediach rastlinných buniek na abiotický stres (Martinez-Noel *et al.*, 2006).

3.3.1. Vápnik-viažuce proteíny

Zvýšenú hladinu Ca^{2+} rozpoznávajú niektoré proteíny svojimi senzormi a menia konformáciu na Ca^{2+} -závislým spôsobom. V signalizačných dráhach je veľká rozmanitosť v Ca^{2+} senzoch, ktoré môžu detekovať voľný cytosolický vápnik. Najčastejším motívom, ktorý viaže vápnik je EF-motív (Tuteja, 2009).

3.3.1.1. Ca^{2+} -viažuce proteíny s EF-motívom (Ca^{2+} senzory)

Väčšina z Ca^{2+} sensorov viaže vápnik pomocou motívu helix-slučka-helix, podľa ktorého je aj názov „EF“ (Tuteja *et Mahajan*, 2007). Ca^{2+} senzory využívajú atómy kyslíka na postrannom reťazci EF-motívu. EF-motívy sa najčastejšie nachádzajú chrbtom v antiparalelných pároch s β -listom. Je to vysoko konzervovaný motív 29 aminokyselín, skladajúci sa zo závitnice E, zo slučky, ktorá viaže Ca^{2+} a druhej závitnice F. V jednom organizme sa môže vyskytovať

niekoľko izoforiem EF-motívu. Afinita EF-motívu k Ca^{2+} sa líši v závislosti na aminokyselinovej sekvencii proteínu.

Existuje mnoho rodín Ca^{2+} senzorov. Medzi tie hlavné patrí:

1. Kalmodulin (CaM) – typický Ca^{2+} senzorový proteín, ktorý riadi veľa dôležitých biologických funkcií. Je to vysoko konzervovaný kyslý proteín, ktorý obsahuje dve globulárne domény, z ktorých každá obsahuje dva EF-motívy (Luan *et al.*, 2002). Nachádza sa v apoplaste, v cytosole, v endoplazmatickom retikule a v jadre. Fosfatáza PP7–serín/treonín fosfatáza, bola prvým nájdeným proteínom, ktorý spolupracuje s CaM u *Arabidopsis* (Liu *et al.*, 2007).
2. CaM-podobné proteíny – proteíny, ktoré sa líšia od typických CaM, pretože obsahujú viac než 148 aminokyselinových zvyškov. V *Arabidopsis* sú to CaBP-22, TCH2, TCH3, AtCP1, NADPH oxidázy a Ca^{2+} -viažuce fosfatázy, ABI 1 a ABI 2. Tieto proteíny sú zapojené do bunkových odpovedí na rôzne environmentálne podnety, vývojové či patologické zmeny.
3. na Ca^{2+} -závislé proteín kinázy (calcium dependent protein kinases, CDPK) – v rastlinách existuje 5 rôznych druhov CDPK. (a) CDPK nezávislé od CaM – existuje najmenej 34 génov kódujúcich CDPK v genóme *Arabidopsis* (Cheng *et al.*, 2002). Sú prítomné všade a majú štyri EF-motívy na C-konci. Podieľajú sa na vývoji peľu, na regulácii bunkového cyklu, signalizácii fytohormónov, na tolerancii sucha, salinity a uplatňujú sa pri reakciách na patogény (Xiong *et al.*, 2002). (b) CDPK-príbuzné proteín kinázy (CaM-like region kinases, CRKs) – sú podobné CDPK, ale majú skrátený EF-motív, ktorý nemusí byť schopný viazať Ca^{2+} . V genóme *Arabidopsis* existuje aspoň sedem CRKs, avšak ich regulácia a funkcia nie je známa (Harmon *et al.*, 2001). (c) na CaM-závislé proteín kinázy (calmodulin kinases, CaMKs) – niekoľko CaMKs bolo klonovaných z *Arabidopsis* a iných rastlín. Sú vysoko exprimované v rýchlo rastúcich bunkách a pletivách (Zhang *et al.*, 2003). (d) Ca^{2+} /CaM-závislé proteín kinázy (Ca^{2+} /calmodulin kinases, CCaMK) – sekvenčná analýza ukázala prítomnosť N-terminálnej katalytickej domény. Centrálna časť obsahuje CaM-väzbovú doménu a C-terminálny koniec obsahuje tri EF-motívy. Jeong *et al.* (2007) navrhli, že CCaMK môžu byť zapojené do signalizácie sprostredkovanej kalmodulinom. (e) serín/treonín proteín kinázy (serine/threonine protein kinases, SIPKs/CIPKs) – v genóme *Arabidopsis* sa nachádza 25 CIPK génov (Kolukisaoglu *et al.*, 2004). Na rozdiel od CBL, ktoré sa nachádzajú hlavne na chromozóme 4 a 5, CIPK gény sú rozptýlené medzi všetkými piatimi chromozómami *Arabidopsis*. Lokalizácia CIPKs môže byť výlučne závislá na ich interakcii s partnerom, ktorý by tak mohol mať dvojakú

úlohu, úlohu vápenatého senzora a ako kotviaci proteín, ktorý upravuje lokalizáciu a činnosť CIPKs na rôznych miestach v bunke.

4. Kalcineurin B-podobné proteíny (calcineurin B-like proteins, CBL) – v genóme *Arabidopsis* sa nachádza desať génov CBL (Mahajan *et al.*, 2006, 2008), avšak ich zložitosť a charakterizácia účinku je stále do značnej miery neznáma.

3.3.1.2. Ca²⁺-viažuce proteíny bez EF-motívu

Existuje niekoľko proteínov, ktoré viažu Ca²⁺, ale neobsahujú EF-motívy. Patria medzi ne:

1. Fosfolipáza D (PLD) – PLD katalyzuje hydrolýzu štruktúrnych fosfoproteínov za vzniku kyseliny fosfatidovej, ktorá zohráva dôležitú úlohu v mnohých fyziologických procesoch, zahŕňujúc vezikulárny transport, endocytózu receptorov, exocytózu, reorganizáciu cytoskeletu, signaling kyseliny abscisovej (ABA), zatváranie prieduchov, programovanú bunkovú smrť, polarizovaný bunkový rast, rast koreňov, starnutie listov a pozitívne reguluje toleranciu na abiotické stresy (Wang, 2001, 2005).
2. Ca²⁺-viažuce proteíny exprimované v piestiku (pistil-expressed Ca²⁺-binding proteins, PCP) – majú molekulovú hmotnosť 19 kDa (Furuyama *et al.*, 1999). Sú zapojené do interakcií peľu a piestika a do vývoja peľu.
3. Kalretikulín (CRT) – zohráva významnú úlohu pri skladovaní a uvoľňovaní Ca²⁺, pri syntéze bielkovín. Vyskytuje sa hlavne v endoplazmatickom retikule (Opas *et al.*, 1996), v jadrovom obale (Napier *et al.*, 1995), v deliacom vretienku (Denecke *et al.*, 1995), v plazmodezmách (Baluška *et al.*, 1999) a na povrchu bunky (Gardai *et al.*, 2007).
4. Kalnexin (CNX) – je jedným z najdôležitejších Ca²⁺-viažucich proteínov a po prvýkrát bol identifikovaný ako ER typ I integrálneho membránového proteínu (Sarwat *et al.*, 2007). Chová sa ako chaperón a plní rad funkcií, vrátane viazania Ca²⁺, viazania lektínu a zisťovania nesprávne zložených proteínov. Kyslá doména CNX na N-konci v lumene ER môže byť zapojená do Ca²⁺ väzby. *A. thaliana* C-konce kyslých domén postráda (Ehtesham *et al.*, 1999).
5. Forizómy – sú obrie kontraktilné motorové bielkoviny (Knoblauch *et al.*, 2001). Reagujú na zmenu koncentrácie iónov (Ca²⁺, H⁺) a menia svoj tvar. Dokážu meniť chemickú energiu na mechanickú. Unikátnym génom s touto funkciou je gén *for1* u Fabaceae. V iných rastlinách tieto gény neboli nájdené (Noll *et al.*, 2007).

3.3.2. Annexíny: Ca²⁺-viažuce proteíny

Annexíny patria do skupiny proteínov, ktoré viažu Ca²⁺ bez EF-motívu (Tuteja, 2009). Tieto proteíny sa podieľajú na organizácii a funkcii biologických membrán. Górecka *et al.* (2005) navrhli, že rastlinné annexíny môžu hrať úlohu v stresových odpovediach. Bolo zistené, že *AnnAt1* hrá dôležitú úlohu pri pH-sprostredkovanej bunkovej odpovedi na environmentálne podnety a mohol by zohrávať dôležitú úlohu pri intracelulárnej iónovej homeostáze. Príliv vápnika do cytosolu je dôvodom zvýšenia koncentrácie voľného cytosolického Ca²⁺ ([Ca²⁺]_{cyt}), ktorý slúži ako sekundárny prenášač vo vývojovej, stresovej a imunitnej signalizácii (Swarbreck *et al.*, 2013). Annexíny sú lokalizované hlavne v cytoplazme a boli navrhnuté ako regulátory dynamických zmien v membráne. Majú významnú funkciu v sekretorickej dráhe (Clark *et Roux*, 1995; Konopka-Postupolska, 2007). Keď sa zvýši hladina cytosolického vápnika, annexíny sa pohybujú smerom k povrchu cytoplazmatickej membrány k určitým membránovým štruktúram. Všeobecne je známe, že annexíny sa podieľajú na procesoch spojených s organizáciou membrán, interagujú s cytoskeletom a môžu sa podieľať na stresovej odpovedi (Konopka-Postupolska, 2007).

3.3.2.1. Interakcia s kyslými fosfolipidami

Annexíny sa prednostne viažu prvou a štvrtou doménou na membrány, ktoré obsahujú negatívne nabitú kyslé fosfolipidy (napríklad kyselina fosfatidová, fosfatidylserín, fosfatidylinozitol) (Gerke *et Moss*, 2002). Táto periférna väzba na membránu je závislá na Ca²⁺ a je často sprevádzaná agregáciou membránových plôch (tvorba fosfolipidových vezikúl). Koncentrácia Ca²⁺ potrebná na väzbu annexínov sa pohybuje v rozmedzí od 10⁻⁷ až 10⁻⁴ mol.ml⁻¹ (Clark *et Roux*, 1995). Hoci sa annexíny viažu na membránové fosfolipidy len v prítomnosti Ca²⁺, pri pH 7,0 až 7,4 môže dôjsť k tejto väzbe aj v neprítomnosti vápníkových kationov (Dabitz *et al.*, 2005).

Väčšina annexínov má tendenciu nachádzať sa v cytoplazme (Thonat *et al.*, 1997). Môžu sa nachádzať aj na tonoplaste (Seals *et Randall*, 1997) alebo Golgi aparáte či vezikulách. Rastlinné annexíny môžu tiež spôsobovať agregáciu lipozómov a sekrečných vezikúl (Battey *et Blackbourn*, 1993). Annexín 1 z *Medicago trunculata* (*Anx1Mt1*; de Carvalho-Niebel *et al.*, 1998) sa nachádza na jadrovej membráne. Nukleárna lokalizácia bola taktiež pozorovaná u annexínu hrachu (Clark *et al.*, 1998). Annexín v špenáte bol lokalizovaný na membráne chloroplastov (Seigneurin-Berny *et al.*, 2000). Proteomická analýza ukázala, že *AnnAt1* z *A. thaliana* bol prítomný vo frakcii proteínov bunkovej steny – integrálne membránové proteíny (Santoni *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2004) alebo aj v centrálnej vakuole (Carter *et al.*, 2004).

3.4. Cytoskelet rastlín

Rastlinný cytoskelet je dynamická a všestranná vnútrobunková štruktúra zložená z mikrotubulov a aktínových mikrofilamentov. Tieto komponenty hrajú dôležitú úlohu v mnohých aspektoch bunkového vývoja a rastu, vrátane takých základných procesov ako sú delenie buniek, expanzia buniek či intracelulárna organizácia a pohyblivosť (Kost *et al.*, 1999; Staiger, 2000; Wasteneys *et Galway*, 2003; Takemoto *et Hardham*, 2004). Počas morfogénézy je orientácia bunkového delenia a smer expanzie buniek prísne kontrolovaný, pretože na rozdiel od živočíšnych buniek, rastlinné bunky majú pevné bunkové steny a nie sú schopné rýchlo meniť tvar alebo migrovať.

Monomérom aktínových filamentov je globulárny G-aktín, ktorý polymerizuje. Filamentózny F-aktín koordinuje expresiu bunkovej polarity, prispieva k udržaniu vnútornej architektúry bunky, riadi rovinu bunkového delenia, určuje pohyb a polohu organel, zabezpečuje dynamické dráhy v rámci cytoplazmy, zohráva centrálnu úlohu v endocytóze, koordinuje pohyb sekrečných vezikúl obsahujúcich polysacharidy a proteíny k plazmatickej membráne a je taktiež dôležitý v odpovediach rastlín na biotický a abiotický stimul (Henty-Ridilla *et al.*, 2013). Väzba na aktín je dobre preskúmaná u živočíšnych annexínov (Hayes *et al.*, 2004), jedná sa najmä o annexíny stavovcov (A1, A2, A5 a A6). Bolo preukázané, že A5 sa viaže na filamente aktínu v *in vitro* aj *in vivo* podmienkach v závislosti na Ca^{2+} (Tzima *et al.*, 2000). Väzba na aktín bola študovaná aj u rastlinných annexínov (Konopka-Postupolska, 2007; Konopka-Postupolska *et al.*, 2011). Konzervovaný motív, označovaný ako IRI, bol dôvodom vzniku hypotézy o väzbe annexínov s F-aktínom (Hu *et al.*, 2000, 2014; Clark *et al.*, 2000). Avšak napriek skutočnosti, že tento motív obsahujú takmer všetky rastlinné annexíny, nie všetky annexíny sú schopné viazať F-aktín. U annexínov rajčiaka, cukety, hrachu a *Mimosa* bolo preukázané, že viažu F-aktín v *in vitro* podmienkach (Hoshino *et al.*, 2004). U annexínov cukety bola prvýkrát dokázaná väzba na F-aktín a táto väzba bola ovplyvnená podmienkami solného stresu (Hu *et al.*, 2000). Tieto annexíny sú spojené s cytoplazmatickou membránou, čo naznačuje, že sa môžu zúčastňovať vzniku komplexov, poprípade raftov (Hoshino *et al.*, 2004). Hladina expresie annexínu 6 z *Gossypium barbadense* (AnxGb6), ktorý reguluje ACTIN1, sa zvýšila počas predlžovania vlákien (Huang *et al.*, 2013).

Mikrotubuly sú dynamické heterodiméry zložené z α - a β -tubulínu (Goddard *et al.*, 1994; Cyr *et Palevitz*, 1995). Obidve tubulínové jednotky sú globulárne bielkoviny zložené zo 450 aminokyselín (Downing *et Nogales*, 1998). Mikrotubuly sú dlhé duté vlákna s kladným a záporným koncom. Medzi aminokyselinami jednotlivých tubulínov je asi 40% identita (Little

et Seehaus, 1988). N-terminálna doména je zložená z niekoľkých α -helikálnych a β -listových jednotiek, ktoré viažu GTP. C-terminálna doména je veľmi rozmanitá a má dôležitú úlohu v interakciách tubulínu s inými proteínmi (*Downing et Nogales, 1998; Amos, 2011; Lefèvre et al., 2011*). Mikrotubuly rastlín sa podieľajú na vzniku bunkovej polarity, bunkovom delení, morfogéneze, regulácii vezikulárneho transportu, endocytóze, exocytóze, sprostredkujú vnútrobunkový pohyb endomembrán a organel (*Šamaj et al., 2006; Wasteneys et Ambrose, 2009; Brandizzi et Wasteneys, 2013; Komis et al., 2015*). Počas bunkového delenia sa v bunke nachádza päť typov mikrotubulov: kortikálne mikrotubuly, radiálne cytoplazmatické mikrotubuly, preprofázny zväzok (PPB – Pre-Prophase Band) (*Pickett-Heaps et al., 1999; de Keijzer et al., 2014*), mitotické vretienko a fragmoplast (*Lambert, 1993*). Mikrotubuly a aktínové mikrofilamenty sa zapájajú do karyokinézy a cytokinézy (*Staehein et Hepler, 1996*). U rastlín sa vyvinul jedinečný spôsob cytokinézy, ktorý vedie k oddeleniu dvoch dcérskych buniek po dokončení jadrového delenia. V počiatočnom štádiu delenia sa kortikálne mikrotubuly reorganizujú do kruhu paralelných zväzkov a tvoria tak preprofázny zväzok, čím určia rovinu delenia bunky. Mikrotubuly mitotického vretienka sa uchytia na chromozómoch a akonáhle sa chromozómy rozdelia na opačné póly bunky, tak sa počas anafázy vytvorí mikrotubulárny fragmoplast v rovine, kde sa predtým nachádzal preprofázny zväzok (*Samuels et al., 1995*).

3.4.1. Inhibítory mikrotubulov

Inhibítory mikrotubulov (MT) (tiež známe ako mitotické jedy) predstavujú skupinu zlúčenín zameranú na mikrotubulárny cytoskelet zložený z α - a β -tubulínu. Inhibítory mikrotubulov sú chemicky rôznorodá skupina látok, medzi ktoré patria napríklad taxol, kolchicín, kolcemid, nokadazol, vinblastín, vinkristin alebo oryzalín. Inhibítory majú možnosť zmeniť vlastnosti mikrotubulov. Na bunky pôsobia tak, že zvyšujú alebo znižujú hmotnosť polymerizovaného tubulínu (*Dumontet et Jordan, 2010*). Kolchicín, kolcemid a nokadazol inhibujú polymerizáciu mikrotubulov tým, že sa viažu na dimery tubulínu a zabraňujú tak polymerizácii na plus konci MT. Vinblastín a vinkristin agregujú tubulín, čo vedie k depolymerizácii MT. Taxol stabilizuje MT väzbou na polymer a oryzalín spôsobuje depolymerizáciu. Všetky inhibítory sú účinné už pri nízkych koncentráciách (*Jordan et al., 1992*).

3.4.1.1. Taxol

Taxol patrí do skupiny taxánov. Líši sa od iných inhibítorov, pretože je rovnako účinný v živočíšnych aj v rastlinných bunkách (*Dostál et Libusová, 2014*). Je syntetizovaný hubou zo skupiny *Taxomyces*, kolonizujúcej na kôre tisu pacifického, *Taxus brevifolia* (*Stierle et al.,*

1993; Żwawiak *et Zaprutko*, 2014). Taxol sa viaže na β -podjednotky tubulínu a stimuluje polymerizáciu mikrotubulov (Stanton *et al.*, 2011; Dostál *et Libusová*, 2014) znížením kritickej koncentrácie tubulínu nevyhnutného na polymerizáciu (Stanton *et al.*, 2011). Táto väzba nevyžaduje obvyklú GTP hydrolyzu. MT sú stabilizované buď prostredníctvom zníženej rýchlosti disociácie alebo znížením rýchlosti tubulínového toku (Dostál *et Libusová*, 2014). Každý koniec MT je voči taxolu inak citlivý a bolo zistené, že rýchlosť polymerizácie pozitívneho konca je zvýšená po vystavení buniek taxolu (Derry *et al.*, 1998; Nogales, 2000). Dochádza k narušeniu gradientu vápenatých iónov (Bibikova *et al.*, 1999; Dostál *et Libusová*, 2014) a to môže spôsobiť poruchu alebo preorientovanie aktínového cytoskeletu.

3.4.1.2. Oryzalín

Oryzalín bol nazývaný „kolchicín z riše rastlín“ (Bajer *et Molé-Bajer*, 1986), pretože jeho účinky sú podobné. Viaže sa na α -podjednotku tubulínového dimeru za tvorby komplexu, čím znemožňuje polymerizáciu tubulínu a spôsobuje znižovanie hmotnosti polymerizovaných MT (Anthony *et al.*, 1999). Jedným z efektov oryzalínu sú zmeny tvaru a zloženia bunkovej steny, ktoré boli pozorované napríklad u jednobunkových zelených rias *Penium margaritaceum* (Domozych *et al.*, 2014) a u tabaku (Cai *et al.*, 2011). Oryzalín bráni bunkovému deleniu, čo vedie k tvorbe atypických koreňov u *Arabidopsis* a potláča ukladanie celulózy (Baskin *et al.*, 2004). Zaujímavé je, že bunky nevstupujú do apoptózy, ale môžu zväčšiť svoj objem (Corson *et al.*, 2009). Langhans *et al.* (2009) uvádza, že oryzalín ovplyvňuje svojou väzbou nielen MT, ale taktiež sa viaže aj na membrány. Dochádza k morfológickým zmenám endoplazmatického retikula a Golgiho aparátu v koreňových bunkách *Arabidopsis*. Tieto účinky nastávajú už pri koncentrácii $2 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a sú reverzibilné po vymytí oryzalínu.

3.5. Stresové odpovede rastlín

Rastliny sú neustále vystavované zmenám svojho prostredia. Podľa charakteru pôsobiaceho stresora môže ísť o stres biotický (pri napadnutí patogénom, herbivorom, pri vzájomnom ovplyvňovaní rastlín) a stres abiotický. Abiotický stres je definovaný ako podmienka prostredia, ktorá znižuje rast a výnos pod optimálnu úroveň. Býva spôsobený prírodnými stresormi, kedy sú rastliny vystavené osmotickému stresu a s ním spojenému oxidatívne stresu ako dôsledok zníženého množstva vody (sucho), príliš veľkého množstva soli (zasolenie) alebo extrémnych teplôt (Farooq *et al.*, 2009). Rastliny sú sesilné organizmy, ktoré nie sú schopné fyzicky uniknúť pred pôsobením stresorov. Na zmenené podmienky prostredia odpovedajú rastliny zmenami v metabolizme, aby zachovali rovnováhu medzi výdajom a spotrebou energie. Odpovede rastlín na tieto zmeny môžu byť zložité a rovnováha je do určitej

miery závislá na signalizačnej sieti (Takahashi *et al.*, 2004), ktorá koordinuje tri z najdôležitejších procesov v rastlinách: fotosyntézu, Calvinov cyklus a fotorespiráciu – procesy spojené s prenosom elektrónov, substrátov a energie (Noctor *et al.*, 2007; Foyer *et Noctor*, 2009; Foyer *et al.*, 2009; Pfannschmidt *et al.*, 2009). Reakcie rastlín na abiotický stres sú dynamické a komplexné (Cramer, 2010; Skirycz *et Inze*, 2010), sú pletivo a orgánovo špecifické. Sila odpovede na stres je ešte ovplyvnená napätím daného stresu (Dinneny *et al.*, 2008) a dĺžkou jeho trvania (zaťaženia), ktoré môže mať významný vplyv na zložitosť odozvy (Tattersall *et al.*, 2007; Pinheiro *et Chaves*, 2011).

Pre svoj rast potrebujú rastliny energiu (svetlo), vodu, uhlík a minerálne živiny. Reakcia rastlín na stresové podmienky je často charakterizovaná rýchlou a akútnou inhibíciou („akútna/rýchla odpoveď“), nasledovaná prispôbením sa novému stavu („odpoveď adaptácie“). Rastliny si zachovávajú pozitívny turgor a väčšie zmeny vo vodných potenciáloch spôsobujú osmotický stres, ktorý narušuje normálne bunkové aktivity, ba dokonca môže spôsobovať smrť. V prirodzených podmienkach môže osmotický stres navodiť sucho alebo zasolenie. Rastliny vykazujú celý rad odpovedí na molekulárnej a bunkovej úrovni (Hasegawa *et al.*, 2000; Slama *et al.*, 2015). Osmotický stres v podobe salinity môže ovplyvniť morfológiu a vývoj rastlín, inhibovať rast výhonkov, spôsobovať fyziologické sucho a iónovú toxicitu (Ulm *et al.*, 2002). Katióny sodíka a anióny chlóru sa hromadia v lipidovej dvojvrstve a menia tak proteínové zloženie plazmatických membrán, ako aj ich funkciu a reguláciu (Horie *et Schroeder*, 2004; Ward *et al.*, 2009). Deficit vody (sucho) vedie taktiež k veľkým morfológickým alebo fyziologickým zmenám (Chaves *et al.*, 2002). Napríklad u dvojkličnolistových rastlín, ako je *A. thaliana*, môže osmotický stres v podobe sucha spôsobiť zmenšenie listovej plochy tým, že zníži počet a veľkosť buniek (De Bodt *et al.*, 2010). Je narušená transpirácia a fotosyntéza. Osmotický stres má priamy vplyv na fotosyntetický aparát a všetky jeho hlavné zložky, vrátane tylakoidného elektrónového transportu, cyklu zníženia CO₂ a kontroly príjmu CO₂ (Allen *et Ort*, 2001). Mnohé štúdie ukázali zníženie fotosyntetickej aktivity v dôsledku sucha, kedy sa prieduchy zatvárajú a listy tak znižujú asimiláciu uhlíka v prospech fotorespirácie (Del Blanco *et al.*, 2000; Anjum *et al.*, 2011). Vplyvom sucha môže byť narušený rast koreňov (Bengough *et al.*, 2011).

3.5.1. Centrálné regulátory v rastlinných odpovediach

3.5.1.1. ROS a RNS

Rastlinné odpovede na abiotický stres zahŕňajú interakcie mnohých molekulárnych dráh. Medzi najskoršie signály v abiotických stresoch patria reaktívne formy kyslíka (ROS) a reaktívne

formy dusíka (RNS), ktoré menia enzýmovú aktivitu a génovú reguláciu (Wilkinson *et al.*, 2009; Molassiotis *et al.*, 2011; Mittler *et al.*, 2011). ROS a RNS tvoria koordinovanú sieť, ktorá reguluje mnoho odpovedí na zmeny životného prostredia. Existuje mnoho štúdií, ktoré popisujú odpovede ROS na abiotický stres, ale len veľmi málo štúdií, ktoré sa zaoberajú RNS (Molassiotis *et al.*, 2011).

3.5.1.2. Vápnik ako všadeprítomný posol

V rastlinných bunkách slúži vápnik (Ca^{2+}) ako posol v signalizácii abiotického stresu (Sanders *et al.*, 1999; Knight, 2000). Predstavuje hlavný bod v signalizačných dráhach, pretože môže byť vyvolaný mnohými abiotickými, vývojovými, hormonálnymi a biotickými podnetmi. Vápnik zohráva úlohu napríklad pri regulácii zatvárania prieduchov, kedy oscilácia cytosolického vápnika vedie k uzavretiu prieduchov. Hladina vápnika sa mení v závislosti na konkrétnom strese (Kiegle *et al.*, 2000), na rýchlosti vývoja stresu (Plieth *et al.*, 1999) a na type pletiva (Kiegle *et al.*, 2000). Niektoré štúdie poukázali na to, že vápnikové kanály sa podieľajú na zmenách cytosolického Ca^{2+} . Napríklad cADPR-vápnikový kanál je zapojený do ABA-indukovanej expresie génov regulujúcich odpoveď na chlad v rajčiaku (Wu *et al.*, 1997). Genetická analýza lokusu *FRY1* u *Arabidopsis* poukázala na zapojenie inozitol-1,4,5-trisfosfátu (IP3 – očakáva sa, že generuje cytosolický Ca^{2+}) v signalizácii ABA, soli alebo chladu. *FRY1* kóduje inozitol polyfosfát-1-fosfatázu, ktorá katabolizuje IP3. ABA-indukovaný IP3 *fry1* mutantu sa trvalo akumuluje a rastliny sa tak stávajú veľmi citlivými na ABA, chlad a soľ (Xiong *et al.*, 2001).

3.5.2. Stresové odpovede a funkcia annexínov

3.5.2.1. Osmotický stres a annexín 1

Štúdium soľného stresu je dôležitým prostriedkom k pochopeniu iónovej a osmoregulačnej homeostázy v rastlinách. Rastliny potrebujú základné minerálne živiny k rastu a vývoju. Avšak nadmerná koncentrácia solí v prostredí je škodlivá pre väčšinu rastlín. Štúdium osmotického stresu všeobecne spadá do 4 kategórií: 1) fyziológia toxicity a tolerance na soľ, čo zahŕňa bunkovú a metabolickú odpoveď na soľ (Bohnert *et al.*, 1998; Hasagawa *et al.*, 2000); 2) mechanizmy transportu solí cez bunkové membrány a na dlhé vzdialenosti v rastlinách (Blumwald *et al.*, 2000); 3) prehľad génov, ktorých expresia je regulovaná soľou (Ingram *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 1997; Xiong *et al.*, 2001) a 4) mutačná analýza soľnej tolerance determinantov a signalizácia soľného stresu (Zhu, 2000, 2001; Xiong *et al.*, 2001, 2002).

Soľný stres ovplyvňuje všetky hlavné procesy v rastlinách, ako sú rast, fotosyntéza, syntéza bielkovín, energetický metabolizmus a metabolizmus lipidov (Parida *et al.*, 2004). Okamžitá

odpoveď na soľný stres vedie k zníženiu expanzie povrchu listov a so zvyšujúcou sa koncentráciou zastaví túto expanziu úplne (Wang *et al.*, 2000). Taktiež má podiel na poklese čerstvej alebo suchej hmotnosti listov, stonky a koreňa (Ali-Dinar *et al.*, 1999; Chartzoulakis *et al.*, 2000). Vodný potenciál a osmotický potenciál rastlín sa so zvyšujúcou slanosťou stáva negatívnejším (Hernandez *et al.*, 1999; Khan, 1999; Meloni *et al.*, 2001; Romero-Aranda *et al.*, 2001). Chlorofyl a celkový obsah karotenoidov vo všeobecnosti klesá. U najstarších listov sa objavuje chloróza (Hernandez *et al.*, 1999; Agastian *et al.*, 2000).

Soľný stres (navodený s NaCl) zapríčiňuje zhoršenie rastu rastlín (Munns *et al.*, 2008). Keď je rastlina vystavovaná soľnému stresu, v cytosole je vysoký obsah K^+ a nízky obsah Na^+ . Absorpcia katiónov sodíka ovplyvňuje bunkový pomer Na^+/K^+ a môže viesť k bunkovej smrti. Vysoký obsah NaCl v koreňoch spôsobuje príliv Ca^{2+} a zvyšuje sa cytosolický vápnik (Kiegle *et al.*, 2000; Shi *et al.*, 2000; Tracy *et al.*, 2008). Zvýšená prítomnosť solí aktivuje SOS dráhu (Salt Overly Sensitive), ktorá kontroluje odpovede na iónové stresy (Wu *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 1997). Molekulárna analýza SOS mutantov u *Arabidopsis* viedla k identifikácii komponentov tejto dráhy – SOS1, SOS2 a SOS3, ktoré prenášajú vápnikové katióny uvoľňované vplyvom soľného stresu a obnovujú iónovú homeostázu (Zhu, 2001). SOS3 kóduje Ca^{2+} -viažuci väzbový proteín. Mutácia v tomto géne znižuje viazanosť Ca^{2+} a mutanty (*sos3-1*) sú citlivé na soľ (Kim *et al.*, 2000). Identifikácie SOS2 lokusu ukázala, že mutant *sos2* je taktiež citlivý na soľný (NaCl) stres. SOS2 kóduje serín/treonín proteínkinázy s N-terminálnou kinázovou katalytickou doménou. SOS3 v prítomnosti Ca^{2+} aktivuje SOS2 kinázu (Kim *et al.*, 2000). Pomocou dráhy SOS3-SOS2 bol identifikovaný *sos1* mutant. Tak ako *sos2* a *sos3*, aj *sos1* je hypersenzitívny voči NaCl. Zhu *et al.* (2000) potvrdili spoločnú funkciu SOS3, SOS2 a SOS1 v soľnom strese. SOS1 kóduje Na^+/H^+ antiport na plazmatickej membráne a vyrovnáva hladinu iónov vplyvom efluxu Na^+ z cytosolu do apoplastu (Shi *et al.*, 2000; Chung *et al.*, 2008). Zmena K^+ a Ca^{2+} spôsobuje hyperpolarizáciu alebo depolarizáciu aktivovaných vápnikových membránových kanálov, ktoré sú zapojené do zvyšovania cytosolického vápnika ($[Ca^{2+}]_{cyt}$) (Tracy *et al.*, 2008). U *Arabidopsis* sú známe dve rodiny kanálov, ktoré môžu prispievať k indukovanej signalizácii NaCl: CNGC (Cyclic Nucleotide-Gated Channels) kanály a Glu receptory (Dodd *et al.*, 2008).

Rastliny nie sú schopné tolerovať veľké množstvo soli v cytoplazme, preto za takýchto podmienok ukladajú prebytočné soli do vakuoly, ktorá ich uskladní alebo podľa potreby presunie do iných organel a pletív (Iyengar *et al.*, 1996; Zhu, 2003). U *A. thaliana* gén *AtNHX1* kóduje vakuolárny Na^+/H^+ antiport, ktorý zohráva dôležitú úlohu pri soľnom strese.

Experimentálne dôkazy ukázali, že expresia génu *AtNHX1* bola zvýšená po pôsobení NaCl, KCl alebo ABA (Shi *et al.*, 2002).

Rastlinné annexíny tvoria vápnikové kanály v lipidových dvojvrstvách (Laohavisit *et al.*, 2009, 2010, 2012). Annexíny u *Arabidopsis* sú ovplyvňované rôznymi abiotickými stresmi a hrajú dôležitú úlohu v odpovediach na tieto stresy (Cantero *et al.*, 2006; Mortimer *et al.*, 2008; Konopka-Postupolska *et al.*, 2009). Najpočetnejší annexín v *Arabidopsis* je annexín 1 (AnnAt1), ktorý môže existovať ako plazmatický proteín (Lee *et al.*, 2004; Richards *et al.*, 2014). Antioxidačný účinok AnnAt1 bol navrhnutý dôsledkom vnútornej neutralizačnej aktivity ROS, medzi ktoré patrí napríklad peroxid vodíka (H_2O_2), hydroxylové radikály (OH^\cdot) a superoxidový anión ($O_2^{\cdot-}$) (Rhee *et al.*, 2000). V koreňových bunkách je AnnAt1 zodpovedný za priepustnosť Ca^{2+} a K^+ , ktoré sú aktivované extracelulárnymi hydroxylovými radikálmi (OH^\cdot), najreaktívnejšími ROS, a preto sa očakáva, že AnnAt1 znižuje aktivitu NADPH oxidázy, ktorá môže v konečnom dôsledku slúžiť ako zdroj extracelulárnych OH^\cdot (Foreman *et al.*, 2003; Renew *et al.*, 2005). Konkrétne sa predpokladá, že AnnAt1 spolupracuje s NADPH oxidázou, ktorá je kódovaná *AtRBOHC* (respiratory burst oxidase homologue C), ktorý je zapojený do rastu koreňov a signalizácie pri soľnom strese (Foreman *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004).

3.5.2.2. Oxidatívny stres a annexín 1

Dôsledkom oxidatívneho stresu nastáva nerovnováha v generovaní a odstraňovaní ROS (Finkel *et al.*, 2000). ROS vznikajú ako vedľajší produkt normálneho aeróbného metabolizmu, kedy vznikajú $O_2^{\cdot-}$, OH^\cdot a H_2O_2 . ROS sú zapojené do peroxidácie lipidov, bielkovín, do denaturácie proteínov a poškodenia DNA, ktoré vedú k rôznym mutáciám. Rastliny sú schopné vyrovnáť sa s čiastočne redukovanými ROS počas oxidatívneho stresu tým, že aktivujú rad ochranných mechanizmov, vrátane regulácie antioxidačných enzýmov, ako kataláza, superoxid dismutáza, glutation transferáza a peroxidáza (Nakamura, 2005). Hlavným zdrojom ROS za svetla sú zelené pletivá rastlín (Asada, 1999) a peroxizómy, ktoré vyrábajú ROS prostredníctvom fotorespirácie (Luis *et al.*, 2006). V tme sú hlavným zdrojom ROS mitochondrie a nezelené časti rastlín. Hlavnými zdrojmi apoplastických ROS sú zas peroxidázy, amino oxidázy a NADPH oxidázový komplex, ktorý zohráva hlavnú úlohu v oxidatívnej signalizácii (Sagi *et al.*, 2006).

Okrem toho, že ROS majú toxické účinky, majú aj funkciu signálnych molekúl, ktoré sa zúčastňujú mnohých procesov ako bunkový cyklus, senescencia, rast a vývoj buniek, hormonálna signalizácia alebo symbiotická interakcia s mikroorganizmami (Mittler *et al.*,

2004; Rodriguez *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2012). Táto dvojaká úloha ROS závisí na pomere a subcelulárnom mieste svojho vzniku. Funkcia ROS ako signálnych molekúl je vnútorne spojená s neenzymatickými antioxidantami (askorbát, glutation) (Foyer *et Noctor*, 2005). H₂O₂ funguje ako signálna molekula v rastlinách. Vyvoláva expresiu génov zodpovedných za obranné mechanizmy. Príkladom je kódujúca glutation S-tranferáza (GST) a Phe amoniak-lyáza (PAL) (Levine *et al.*, 1994; Grant *et al.*, 2000). H₂O₂ tiež aktivuje mitogén aktivované proteínové kinázy (MAPK), konzervované signalizačné kinázy, ktoré modulujú expresiu génov a bunkové odpovede na extracelulárne podnety (Desikan *et al.*, 1996; Grant *et al.*, 2000; Kovtun *et al.*, 2000; Samuel *et al.*, 2000; Šamajová *et al.*, 2013). Z niektorých štúdií vyplýva, že H₂O₂ je kľúčovým faktorom v programovanej bunkovej smrti ako odozva voči patogénom, elicitorom a hormónom (Tenhaken *et al.*, 1995; Levine *et al.*, 1996; Mittler *et al.*, 1999; Bethke *et Jones*, 2001).

U rastlín sa vyvinul komplexný systém zložený z enzymatických a neenzymatických zložiek, aby zabránili škodlivým účinkom ROS. Medzi neenzymatické zložky patria askorbát, glutation, flavonoidy, alkaloidy, karotenoidy, prolín a amíny (Apel *et Hirt*, 2004; Sharma *et Dietz*, 2006). Medzi enzymatické zložky patria napríklad peroxiredoxíny, glutation peroxidázy alebo peroxidázy neobsahujúce hem, ktorých aktivita závisí od zvyškov cysteínu (Bryk *et al.*, 2000; König *et al.*, 2003).

K štúdiu oxidatívneho stresu sa často používa neselektívny herbicíd paraquat (1,1-dimetyl-4,4-bipyridium dichlorid) (Lascano *et al.*, 2003). Tvoria ho dva pyridínové kruhy, z ktorých každý obsahuje kvartérny amín a kladný náboj ²⁺. Do buniek sa dostáva pomocou ABC transportérov v membráne, cez veľké membránové proteíny, ktoré používajú ATP pre aktívny transport (Morimyo *et al.*, 1992; Yerushalmi *et al.*, 1995). Pri osvietení, paraquat (PQ²⁺) prijme elektrón z redukčného činidla a vytvorí sa radikálový kation (PQ⁺), ktorý reaguje s kyslíkom a tvoria sa ROS. Paraquat (PQ) je teda silný oxidatívny induktor stresu, ktorý zvyšuje hladinu ROS a inhibuje regeneráciu redukčných ekvivalentov a zlúčenín nevyhnutných pre aktivitu antioxidantného systému.

Je známe, že AnnAt1 v heterogénnych systémoch môže chrániť bunky pred oxidatívnym stresom (Jänicke *et al.*, 1998; Kush a Sabapathy, 2001). Górecka *et al.* (2005) vo svojej práci uviedli, že rekombinantný AnnAt1 má peroxidázovú aktivitu. Pomocou H₂O₂-luminálneho systému, využívaného na chemiluminiscenčné detekcie protilátok, preukázali, že AnnAt1 exprimovaný v *Nicotiana bethamiana* je schopný katalyzovať peroxidázovú reakciu. Tak isto

aj heterológny *AnnAt1* v *Escherichia coli* výrazne chráni proti oxidatívne mu stresu (Gidrol *et al.*, 1996; Kush *et Sabapathy*, 2001). Peroxidázová aktivita *AnnAt1* bola navrhnutá na základe zachovaného zvyšku His40 na N-terminálnom konci, ktorý je podobný 30 aminokyselinám vo väzbovej doméne hemu v peroxidáze (Gidrol *et al.*, 1996; Hu *et al.*, 2008). Plazmatická membrána koreňových buniek a buniek koreňových vláskov *A. thaliana* obsahuje hyperpolarizáciou aktivovaný vápnikový kanál, ktorý je aktivovaný extracelulárnymi hydroxylovými radikálmi (OH[•]) a je zapojený do rastu (Demidchik *et al.*, 2003; Foreman *et al.*, 2003; Richards *et al.*, 2014). Analýzou knockout mutanta *AnnAt1* bolo zistené, že vápnikový kanál u tohto mutanta chýba. Korene mutanta boli výrazne menšie, čo potvrdilo priamu spätosť natívneho *AnnAt1* s touto dráhou (Laohavisit *et al.*, 2012).

4. Experimentálna časť

4.1. Materiál

4.1.1. Biologický materiál

V pokusoch boli použité semená *Arabidopsis thaliana*, ekotyp Columbia (Col-0, divoký typ) a transgénná línia exprimujúca s GFP značený annexín 1 pod kontrolou vlastného promotóra (*promAnn1::Ann1:GFP*), v texte označovaný ako Ann1-GFP. Ako kontrola boli použité semená *Arabidopsis thaliana* stabilne exprimujúce chimérický gén pre cytoplasmatický fúzny proteín s GFP – v texte označovaný ako línia pMAT-GFP (Mano et al., 1999). Všetky semená boli povrchovo vysterilizované pomocou etanolu (EtOH). Sterilizácia prebiehala v 3 krokoch:

- 1) premývanie semien 5 min v 70% EtOH,
- 2) premývanie semien 2 – 3 min v 96% EtOH,
- 3) 3 x 5 min premytie v destilovanej vode. Medzi každým krokom bol roztok odpipetovaný a napipetovaný nový. Vysterilizované semená boli nanosené na sterilný filtračný papier.

4.1.2. Chemikálie

BioRad: Akrylamid, ClarityECL substrát

Desert Biological: Meicelaza

Duchefa Biochemie: Murashige & Skoog medium (MO221.0050)

Invitrogen: Alexa Fluor 488 konjugovaná sekundárna protilátka (goat anti-rat), Alexa Fluor 546 sekundárna protilátka (goat anti-rabbit), primárna polyklonálna protilátka anti-GFP (Rabbit IgG Fraction)

Santa Cruz: Sekundárna protilátka anti-mouse IgG-HRP

Sigma Aldrich: 2-merkaptóetanol, 4',6-diamin-2-phenylindole (DAPI), paraquat, bromfenolová modrá, dihydrát hydrogenfosforečnan sodný ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4), dimethylsulfoxid (DMSO), dithiothreitol (DTT), ethylenglykol-*bis*-(2-aminoethylether) tetraoctová kyselina (EGTA), glutaraldehyd, glycerol, heptahydrát síranu horečnatého ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), hovädzí sérový albumín (BSA), hydroxid draselný (KOH), chlorid sodný (NaCl), methanol, Nonidet P-40, oryzalín, paraphenylendiamin, paraformaldehyd, phytigel, piperazin-

N,N'-bis(2-ethansulfonová kyselina) (PIPES), Ponceau S, primárna monoklonálna protilátka anti-aktín (mouse IgG2b izotyp), sacharóza, taxol, tetraboritan sodný (NaBH₄), tetramethylethylendiamin (TEMED), triaminomethan hydrochlorid (Tris-HCl), Triton X-100, Tween-20

Serva: Celulasa, Coomassie Brilliant Blue G250, macerozym

Serotec: Monoklonálna protilátka anti- α -tubulín YOL1/34

Ostatné: Imerzný olej 518F (Zeiss), nízkotučné sušené mlieko (Laktino)

4.1.3. Roztoky a médiá

$\frac{1}{2}$ MS médium

2,2 g.l⁻¹ Murashige and Skoog médium (M0221)
10 g.l⁻¹ sacharóza
6 g.l⁻¹ phytigel
dH₂O
pH 5,8; sterilizované autoklávaním

Tekuté kultivačné $\frac{1}{2}$ MS médium

2,2 g.l⁻¹ Murashige and Skoog médium (M0221)
10 g. l⁻¹ sacharóza
dH₂O
pH 5,8; sterilizované autoklávaním

Pevné kultivačné $\frac{1}{2}$ MS médium s obsahom 75 mmol.l⁻¹ NaCl

2,2 g.l⁻¹ Murashige and Skoog médium (M0221)
10 g.l⁻¹ sacharóza
6 g.l⁻¹ phytigel
2,192 g. l⁻¹ NaCl
dH₂O; pH 5,8; sterilizované autoklávaním

Pevné kultivačné $\frac{1}{2}$ MS médium s obsahom 100 mmol.l⁻¹ NaCl

2,2 g.l⁻¹ Murashige and Skoog médium (M0221)
10 g.l⁻¹ sacharóza

6 g.l⁻¹ phytigel
2,922 g. l⁻¹ NaCl
dH₂O; pH 5,8; sterilizované autoklávovaním

Pevné kultivačné ½ MS médium s obsahom 150 mmol.l⁻¹ NaCl

2,2 g.l⁻¹ Murashige and Skoog médium (M0221)
10 g.l⁻¹ sacharóza
6 g.l⁻¹ phytigel
4,383 g. l⁻¹ NaCl
dH₂O; pH 5,8; sterilizované autoklávovaním

Pevné kultivačné ½ MS médium s obsahom 200 mmol.l⁻¹ NaCl

2,2 g.l⁻¹ Murashige and Skoog médium (M0221)
10 g.l⁻¹ sacharóza
6 g.l⁻¹ phytigel
5,844 g. l⁻¹ NaCl
dH₂O; pH 5,8; sterilizované autoklávovaním

Pevné kultivačné ½ MS médium s obsahom 0,1 µmol.l⁻¹ PQ

2,2 g.l⁻¹ Murashige and Skoog médium (M0221)
10 g.l⁻¹ sacharóza
6 g.l⁻¹ phytigel
dH₂O; pH 5,8; sterilizované autoklávovaním
100 µl PQ, sterilizovaný a pridaný do sterilného média

Pevné kultivačné ½ MS médium s obsahom 0,5 µmol.l⁻¹ PQ

2,2 g.l⁻¹ Murashige and Skoog médium (M0221)
10 g.l⁻¹ sacharóza
6 g.l⁻¹ phytigel
dH₂O; pH 5,8; sterilizované autoklávovaním
500 µl PQ, sterilizovaný filtrovaním a pridaný do sterilného média

EGTA (0,5mol.l⁻¹ zásobný roztok)

3,8 g EGTA
10 ml dH₂O

pevný KOH

pH 8

PBS

0,14 mol.l⁻¹

NaCl

2,7 mmol.l⁻¹

KCl

6,5 mmol.l⁻¹

Na₂HPO₄ . 2H₂O

1,5 mmol.l⁻¹

KH₂PO₄

dH₂O; pH 7,3

MTSB

50mmol.l⁻¹

PIPES

5mmol.l⁻¹

MgSO₄ . 7H₂O

5mmol.l⁻¹

EGTA

pevný KOH

dH₂O; pH 6,9

Fixačný roztok

500 µl

MTSB

188 µl

paraformaldehyd (8%)

20 µl

glutaraldehyd (25%)

292 µl

dH₂O

Redukčný roztok

50 mg

NaBH₄

50 ml

PBS

Permeabilizačný roztok

88 ml

PBS

10 ml	DMSO (10%)
2 ml	Nonidet P-40 (2%)

Zalievacie médium

100 mg	paraphenyldiamin
100 µl	DMSO
30 ml	PBS, pH 8,3
	glycerol (100%)

Zloženie 12% deliaceho gélu

4,35 ml	dH ₂ O
2,5 ml	1,5mol.l ⁻¹ Tris-HCl, pH 8,8
3 ml	40% acrylamide
0,1 ml	10% SDS
0,05 ml	10% APS
0,005 ml	TEMED

Zloženie 4% zaostrovacieho gélu

3,18 ml	dH ₂ O
1,26 ml	0,5mol.l ⁻¹ Tris-HCl, pH 6,8
0,5 ml	40% acrylamid
0,05 ml	10% SDS
0,025 ml	10% APS
0,005 ml	TEMED

Elektródový pufor na elektroforézu

80 ml	Running buffer
720 ml	dH ₂ O

Trasferový pufor na Western blot

110 ml Transfer buffer

110 ml methanol

820 ml dH₂O

TBST pufor

99 ml TBS (10x)

900 ml dH₂O

1 ml Tween-20

Blokovací roztok

1,2 g BSA (4%)

1,2 g nízkoťučné sušené mlieko (4%)

30 ml TBST

4.1.4. Prístroje

Analytické váhy XA110/2X, Radwag (Poľsko); binokulárna lupa Leica M165FC (Nemecko) s CCD kamerou, Leica Microsystem (Nemecko) s programom LAS software; centrifúga, Scan Speed 1730 MR, Scala Scientific (Holandsko); elektromagnetická miešačka MSH-420, Boeco (Nemecko); fotoaparát Nikon (Japonsko); fytotronová komora, Weiss Gallenkamp (Nemecko); Chemidoc MP dokumentačný systém, BioRad (USA); Image Scanner III Epson (Japonsko); konfokálny laserový skenovací mikroskop LSM 710, Zeiss (Nemecko) s analytickým programom Zeiss Zen 2012 Black software; kotviaca čipová platnička MALDI, Bruker (Nemecko); laboratórne predvážky S1502, BEL (Taliansko); pH meter Cyberscan 310, Eurotech Instruments (Singapur); polyvinyliden difluoridová membrána, GE Healthcare (UK); spektrofotometer, Beckman Coulter (USA), GelPicker, Staffmark (USA); sterilný laminárny box Faster (Taliansko); trepačka s nastaviteľnou teplotou inkubácie ES-20, Biosan (Lotyšsko); vortex, Labnet (USA); výkyvná trepačka MR-12, Biosan (Lotyšsko).

4.1.5. Programy

EPSON Scan, ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>), LAS software, Microsoft Excel, Power Point, Zeiss Zen 2012 Black software.

4.2. Metodika

4.2.1. Príprava pracovných médií pre kultiváciu rastlín *in vitro*

- Pri všetkých experimentoch bolo použité pevné ½ MS médium (Murashige *et* Skoog, 1962). Médium bolo pripravené nasledujúcim postupom: v 1 l destilovanej vody bolo za stáleho miešania rozpustených 10 g sacharózy a 2,15 g MS salts (Micro and Macro elements bez vitamínov). Do 4 termofliaš s objemom 1l sa pridalo po 2 g Phytagelu a zalialo po 250 ml média s pH 5,8 (upravené pomocou roztoku KOH). V týchto fľašiach bolo médium sterilizované v autokláve.
- Vplyv abiotických stresových faktorov na rastliny bol testovaný kultiváciou rastlín na pevných médiách s obsahom určitej koncentrácie stres navodzujúcej chemickej látky. Hyperosmotický stres bol indukovaný prídavkom NaCl a oxidatívny stres prídavkom PQ do kultivačného média. NaCl bol pridaný do média pred autoklávovaním, PQ bol pridaný až po autoklávovaní. Detaily prípravy sú uvedené v Tab. 1.

Tab. 1 Koncentrácia, hmotnosť a objem jednotlivých použitých látok pri abiotickom strese v *in vitro* podmienkach.

Typ stresu	Koncentrácia použitej látky
hyperosmotický	75 mmol.l ⁻¹ NaCl
	100 mmol.l ⁻¹ NaCl
	150 mmol.l ⁻¹ NaCl
	200 mmol.l ⁻¹ NaCl
oxidatívny	0,1 μmol.l ⁻¹ PQ
	0,5 μmol.l ⁻¹ PQ

4.2.2. Kultivácia a prenos rastlín v stresových podmienkach *in vitro*

4.2.2.1. Pôsobenie hyperosmotického stresu na rast koreňa Ann1-GFP rastlín

- Semená *A. thaliana* (divoký typ Col-0, pMAT-GFP a Ann1-GFP) boli vysadené na ½ MS médium v Petriho miskách, uložené na 48 hod pri 4 °C a potom kultivované vo vertikálnej polohe v kultivačnej miestnosti (21 °C, vlhkosť 71%, denný režim 16/8 hod). Sadenie a prenášanie rastlín prebiehalo v sterilnom boxe.
- Po 4 dňoch kultivácie boli klíčence opatrne, tak aby nedošlo k ich poškodeniu prenesené na štvorcové Petriho misky, ktoré obsahovali ½ MS médium bez vitamínov s pridaním 100, 150 alebo 200mmol.l⁻¹ NaCl a naďalej boli kultivované po dobu 13 dní vo vertikálnej polohe v kultivačnej miestnosti (21 °C, vlhkosť 71%, denný režim 16/8 hod). Pre vyhodnocovanie rastu koreňa boli rastliny na Petriho miskách skenované v priebehu 13 dní použitím skenera a programu EPSON Scan a rast koreňa bol vyhodnotený pomocou programu ImageJ a Excel.

4.2.2.2. Pôsobenie hyperosmotického stresu na klíčenie semien Ann1-GFP

- Semená *A. thaliana* (Col-0, pMAT-GFP a Ann1-GFP) boli nasadené na štvorcové Petriho misky, ktoré obsahovali ½ MS médium bez vitamínov s pridaním 100, 150 alebo 200 mmol.l⁻¹ NaCl, uložené na 48 hod pri 4 °C a potom kultivované v kultivačnej miestnosti (21 °C, vlhkosť 71%, denný režim 16/8 hod). Petriho misky boli skenované použitím skenera a programu EPSON Scan po 24, 48 a 72 hod. Následne sa vyhodnocovalo klíčenie semien.

4.2.2.3. Pôsobenie hyperosmotického stresu na fenotyp koreňa Ann1-GFP

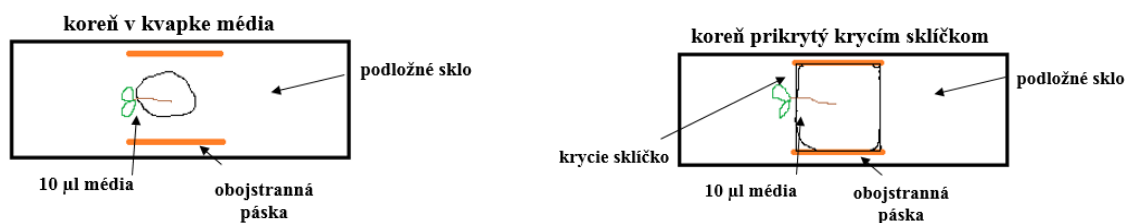
- Štvordňové klíčence *A. thaliana* (divoký typ Col-0, pMAT-GFP a Ann1-GFP) kultivované na ½ MS médiu bez vitamínov. Prenesené na Petriho misky, ktoré obsahovali ½ MS médium bez vitamínov s pridaním 75 alebo 100mmol.l⁻¹ NaCl. Korene rastlín boli po 7 dňoch kultivácie vyfotené pomocou binokulárnej lupy a v ImageJ sa merala vzdialenosť od koreňovej špičky po prvé koreňové vlásky.

4.2.2.4. Pôsobenie oxidatívneho stresu

- Štvordňové klíčence *A. thaliana* (divoký typ Col-0, pMAT-GFP a Ann1-GFP) boli prenesené na okrúhle Petriho misky, ktoré obsahovali ½ MS médium s pridaním 0,1 alebo 0,5μmol.l⁻¹ PQ. Misky boli naďalej kultivované v horizontálnej polohe v kultivačnej miestnosti (21 °C, vlhkosť 71%, denný režim 16/8 hod) po dobu 3 týždňov. Na 7., 14. a 21. deň kultivácie boli misky vyfotené pomocou fotoaparátu v sterilnom boxe a fotografie boli spracované v programe PowerPoint.

4.2.3. *In vivo* lokalizácia annexínu 1 v odpovedi na pôsobenie cytoskeletálnych inhibítorov a abiotického stresu

- Semená transgéennej línie Ann1-GFP boli vysadené na Petriho misky, ktoré obsahovali ½ MS médium bez vitamínov, uložené na 48 hod pri 4 °C a potom kultivované v kultivačnej miestnosti (21 °C, vlhkosť 71%, denný režim 16/8 hod). Na lokalizáciu sa použili klíčence 3 – 4 dni staré.
- Klíčence transgéennej línie Ann1-GFP boli umiestnené v mikrokomôrke, ktorá pozostávala z podložného a krycieho skla. Na podložné sklo, na ktorom bola po stranách umiestnená obojstranná lepiaca páska, sa do kvapky tekutého ½ MS média položil klíčenec a krycím sklíčkom sa prikryl asi pod uhlom 45 ° v oblasti hypokotylu (Obr. 3). Takto pripravený mikroskopický preparát sa vložil na 30 min do vlhkej komôrky na adaptáciu a následne bol pozorovaný pomocou konfokálneho mikroskopu Zeiss LSM710 (laser: 488 nm; filter pre GFP: 496 – 526 nm; priemerovanie skenovania: 4).



Obr. 3 Návod na prípravu mikroskopického preparátu na pozorovanie v konfokálnom mikroskope.

- Na sledovanie zmien annexínu 1 boli použité inhibítory mikrotubulov – taxol a oryzalín. V mikroskope boli najskôr nájdené a zdokumentované koreňové bunky Ann1-GFP a perfúziou sa pridal taxol ($1 \mu\text{mol.l}^{-1}$) alebo oryzalín ($2 \mu\text{mol.l}^{-1}$) v tekutom ½ MS médiu. Roztok inhibítora bol pridávaný mikropipetou v objeme asi 150 µl k hypokotylu a filtračným papierom odsávaný na druhej strane krycieho sklíčka. Následne sa bunky fotili každých 10 minút po dobu 60 resp. 70 min. Pri oboch inhibítoroch ako kontrola bolo použité DMSO, pridané v patričnom objeme do tekutého ½ MS média.
- Pri *in vivo* lokalizácii annexínu 1 v odpovedi na soľný stres bolo použité tekuté ½ MS médium s pridaním 250mmol.l^{-1} NaCl a postupovalo sa rovnako ako pri použití inhibítorov mikrotubulov.

4.2.4. SDS-PAGE elektroforéza a Western blott

Semená transgénnej línie Ann1-GFP boli vysadené na ½ MS médium bez vitamínov, uložené na 48 hod pri 4 °C a potom kultivované vo vertikálnej polohe v kultivačnej miestnosti (21 °C, vlhkosť 71%, denný režim 16/8 hod). Štrnásťdňové rastliny boli inkubované v roztoku 250 μmol.l⁻¹ NaCl po dobu 1 hodiny. Následne boli korene a ružice zamrazené v tekutom dusíku. Biologický materiál bol rozotretý vo vychladenej trecej miske pomocou tĺčika a homogenát bol prenesený do 1,5ml plastovej mikroskúmavky (korene a listové ružice zvlášť). K homogenátu sa pridalo asi 100 – 200 μl finálneho extrakčného roztoku (40 μl complete, 10 μl DTT zriedeného v extrakčnom médiu a doplnené na 2 ml extrakčným médiom). Vzorky boli centrifugované 15 minút pri 4 °C a 13000 g. Supernatant bol prenesený do čistej plastovej mikroskúmavky a následne sa stanovoval obsah proteínov vo vzorkách pomocou metódy podľa Bradfordovej. Do mikrotitračnej doštičky sa podľa počtu vzoriek (v troch replikách) napipetovalo 89 μl dH₂O, 10 μl Coomassie blue a 1 μl vzorky z koreňov alebo ružíc. Podľa stanovenej koncentrácie proteínov sa vzorky upravili na finálnu koncentráciu 60 μl.ml⁻¹ (pridalo sa 15 μl Laemmli buffer 4x, 3 μl merkaptoetanolu a doplnil sa objem na 45 μl finálnym extrakčným roztokom). Takto pripravené vzorky sa premiešali na vortexe, povarili sa 5 min pri 95 °C a nechali sa centrifugovať 10 min pri izbovej teplote a 13000 g. Supernatant sa opäť odobral do čistej mikroskúmavky a vzorky boli pripravené na nanášanie na gél. Proteíny boli separované na 12% deliacom géle a 4% zaostrovacom géle (180 V, 400 mA, 50 min). Po skončení SDS-PAGE elektroforézy sa gély, polyvinyliden difluoridové (PVDF) membrány, filtračné papiere a huby nechali inkubovať v transferovom pufri určenému k Western blotu po dobu asi 10 min. Membrány na Western blot sa pred inkubáciou v pufri namočili na 10 sekúnd do metanolu, aby sa aktivovali. Z gélu boli proteíny prenesené na PVDF membránu v mokrej nádrži pri 100 V, 400 mA po dobu 1,5 hod. Membrány boli následne ofarbené pomocou Ponceau S (0,1% (w/v) Ponceau S, 5% (w/v) octová kyselina) pre overenie odpovedajúceho dávkovania proteínov a následne boli premyté dH₂O. Po dobu jednej hodiny boli membrány inkubované v blokovacom TBST médiu, ktorý obsahoval 4% (w/v) hovädzi sérový albumín (BSA) a 4% (w/v) mlieko, aby došlo k zablokovaniu nešpecifických miest na povrchu membrány. Pre imunoblotovanie boli použité primárne protilátky riedené v roztoku s 1% (w/v) BSA v TBST: anti-GFP riedená 1:2000 alebo anti-aktín riedená 1:5000 pri 4 °C po celú noc. Membrány sa premyli 3 x 10 min v TBST a naniesla sa sekundárna protilátka anti-mouse IgG-HRP v roztoku s 1% (w/v) BSA v TBST, riedená 1:5000. Inkubovali sa pri izbovej teplote po dobu 1,5 hodiny. Potom boli membrány trikrát premyté v TBST. Chemiluminiscenčný signál bol vyvíjaný pomocou ClarityECL substrátu na Chemidoc MP dokumentačnom systéme

(BioRad). Kvantifikácia pásov odpovedajúcich proteínov bola vyhodnotená pomocou ImageJ softwaru.

4.2.5. Imunolokalizácia mikrotubulov pomocou metódy „whole mount“

Semená *A. thaliana* (divoký typ Col-0, pMAT-GFP, Ann1-GFP) boli vysadené na ½ MS médium bez vitamínov, uložené na 48 hod pri 4 °C a potom kultivované vo vertikálnej polohe v kultivačnej miestnosti (21 °C, vlhkosť 71%, denný režim 16/8 hod). Po 4 dňoch kultivácie boli v klíčencoch imunolokalizované MT pomocou metódy „whole mount“ (Šamajová *et al.*, 2014). Štvordňové klíčence boli opatrne prenesené do fixačného média na 1 hod za použitia vákua. Fixované rastliny boli trikrát premyté po 8 min v ½ MTSB a dvakrát po 10 min v PBS. Aldehydové skupiny boli zredukované redukčným roztokom (trikrát po 10 min). Fixácia, premývanie a redukcia bola prevedená v digestore. Bunkové steny boli natrávané enzýmovou zmesou počas 30 min inkubácie pri teplote 37 °C. Semenáčky boli potom štyrikrát premyté po 10 min v PBS a následne inkubované po dobu 1 hodiny v permeabilizačnom roztoku pri izbovej teplote. Po následnom premytí (štyrikrát po 10 min v PBS) boli vzorky blokovanie roztokom 3% (w/v) BSA v PBS po dobu 1 hodiny pri izbovej teplote. Následne sa semenáčky inkubovali s primárnou potkaňou monoklonálnou protilátkou anti- α -tubulín (YOL1/34), ktorá bola riedená v PBS s 2% (w/v) BSA v pomere 1:300 alebo s myšou anti-aktín (10-B3), ktorá bola riedená v pomere 1:100. Inkubácia prebiehala pri teplote 4 °C počas celej noci. Vzorky boli potom premyté šesťkrát po 10 min v PBS. Následne sa pridala sekundárne značená protilátka (Alexa Fluor 546 kozia anti-potkania IgG alebo Alexa Fluor 546 kozia anti-myšia IgG) rozriedená v PBS s 2% BSA v pomere 1:500. Inkubácia prebiehala po dobu 3 hodín (1,5 hod pri 37 °C a 1,5 hod pri izbovej teplote). Semenáčky boli štyrikrát premyté po 10 min v PBS. Na časť semenáčikov bola aplikovaná ešte primárna zajačia anti-GFP protilátka, riedená v PBS s 2% (w/v) BSA v pomere 1:300. Inkubácia prebiehala pod vákuom, 1 hod a pri 37 °C. Tieto semenáčky boli štyrikrát premyté po 10 min v PBS a pridala sa sekundárna protilátka (Alexa Fluor 488 kozia anti-zajačia IgG), riedená v pomere 1:500. Inkubácia prebiehala 2 hod pri izbovej teplote. Semenáčky boli štyrikrát premyté po 10 min v PBS. Nasledovalo farbenie všetkých semenáčikov pomocou DAPI (10 min) pri izbovej teplote. Zásobný roztok DAPI (10 mmol.l⁻¹ v DMSO) bol riedený s PBS v pomere 1:1000. Po farbení sa semenáčky trikrát premyli po 10 min v PBS a boli prenesené na podložné sklá do zalievacieho média a prikryté kryciami sklíčkami. Preparáty sa uzavreli lakom na nechty. K vyhodnoteniu sa použil laserový konfokálny mikroskop Zeiss LSM 710. Na snímanie preparátov sa vybrali vhodné prednastavené parametre (laser pre DAPI: 405 nm, GFP: 488 nm, Alexa Fluor 546: 561 nm;

filter pre DAPI: 400 – 487 nm; GFP: 494 – 533 nm; Alexa Fluor 546: 566 – 620 nm;
priemerovanie: 4).

5. Výsledky

Výsledky dosiahnuté počas bakalárskej práce sú prezentované v nasledujúcej kapitole a sú rozdelené na štyri samostatné časti. Prvá časť obsahuje fenotypovú charakterizáciu transgéennej línie Ann1-GFP (konštrukt *promAnn1::Ann1:GFP*) v kontrolných podmienkach, pri soľnom a oxidatívnom strese. Vyhodnocované sú dĺžky primárnych koreňov, vzdialenosti od koreňovej špičky po prvé koreňové vlásky a sledoval sa aj vplyv stresových podmienok na klíčenie semien a fenotyp nadzemnej časti rastlín. Druhá časť je zameraná na sledovanie citlivosti transgéennej línie Ann1-GFP na pôsobenie inhibítorov pri *in vivo* pozorovaní v konfokálnom mikroskope. Tretia časť obsahuje imunoblotovú analýzu hladiny proteínu Ann1-GFP po soľnom strese. Posledná časť sa zaoberá imunolokalizáciou mikrotubulov v koreňových epidermálnych bunkách klíčencov transgéennej línie Ann1-GFP metódou „whole mount“.

5.2. Fenotypová charakterizácia transgéennej línie Ann1-GFP

Na charakterizáciu fenotypov boli použité rastliny transgéennej línie Ann1-GFP, Col-0 a pMAT-GFP. Semená použitých línií boli vysadené na ½ MS médium bez vitamínov a spevnené phytagelom alebo priamo vysadené na média s obsahom soli. Následne boli rastliny po niekoľkých dňoch prenesené na média s obsahom soli alebo oxidatívneho induktora. Z dôvodu vylúčenia mechanického stresu počas prenášania vyklíčených rastlín na stresové média sa prenášali aj ich kontroly.

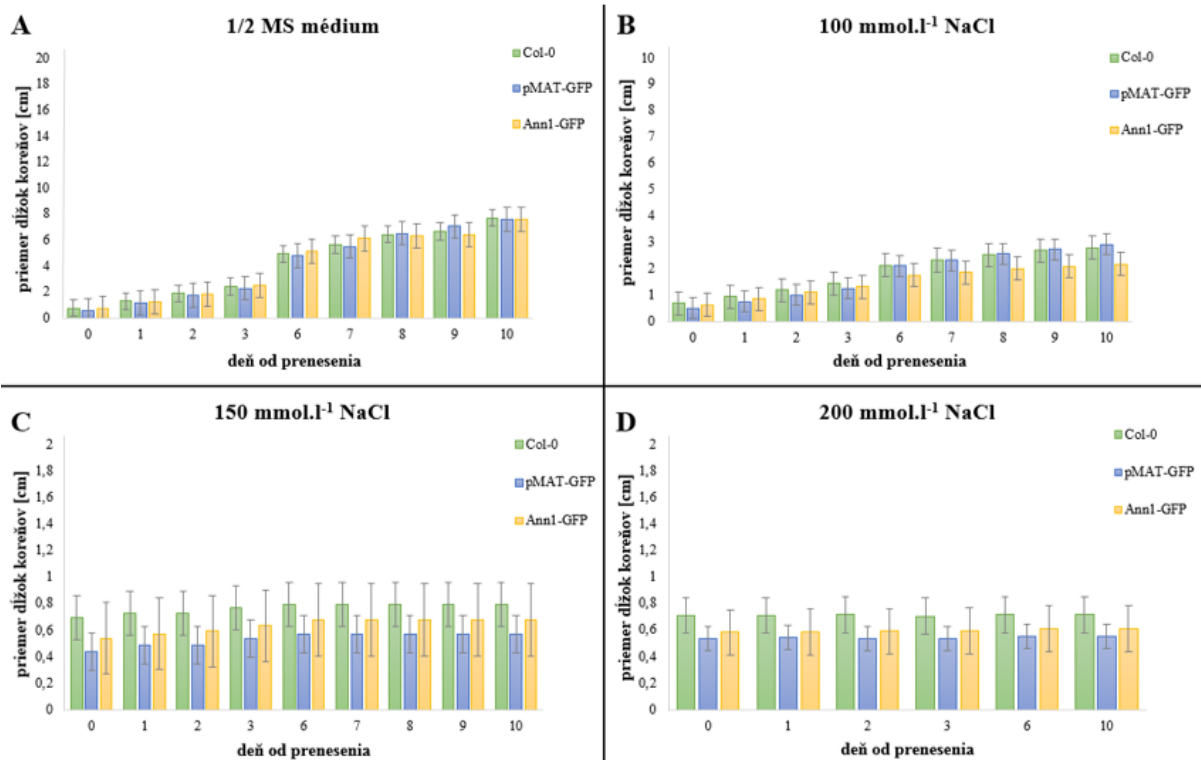
Porovnávaním koreňových fenotypov sa zistilo, že soľný a oxidatívny stres spôsobujú inhibíciu rastu primárnych koreňov a klíčenia (Obr. 4 a 6). Pôsobenie soľného a oxidatívneho stresu vyúsťuje do špecifických vplyvov na koreňový fenotyp študovaných línií *A. thaliana* – Col-0, pMAT-GFP a Ann1-GFP (Obr. 5, 7, 9, 11, 12 a 13).

5.2.1. Pôsobenie soľného stresu na rast koreňov

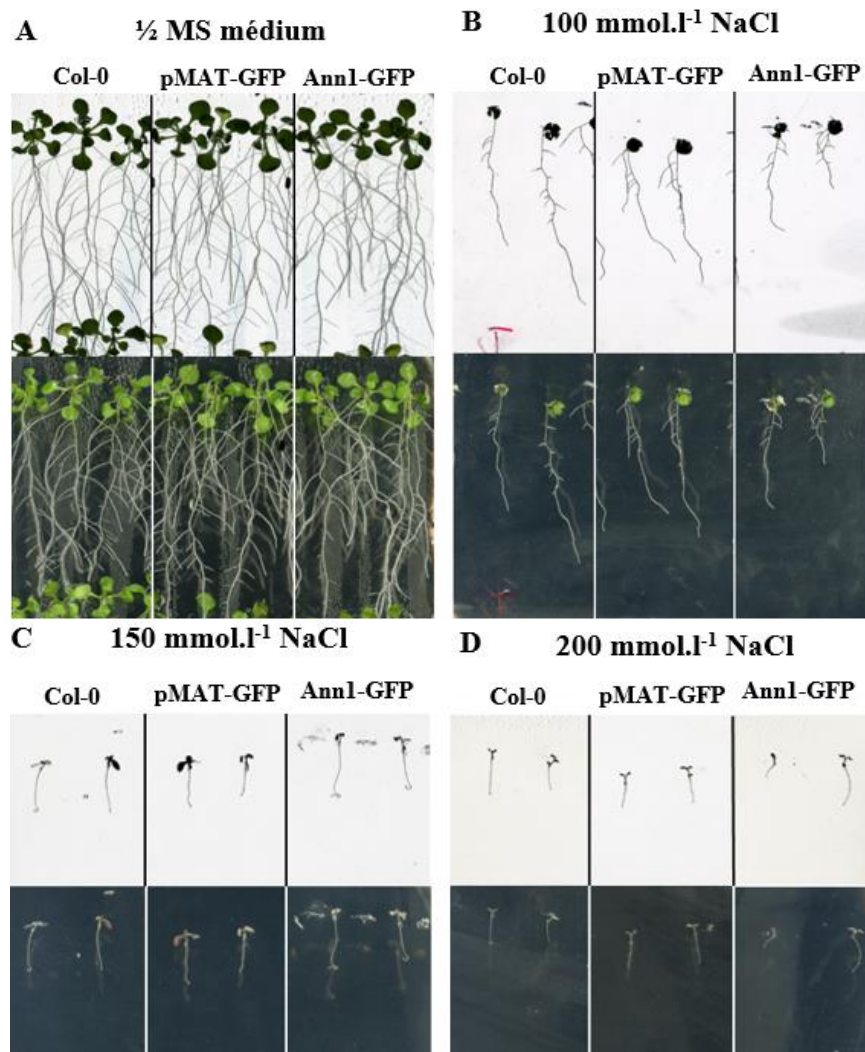
Vplyv soľného stresu na predlžovací rast primárnych koreňov bol prevedený v štyroch biologických replikách a spočíval vo vysadení semien na ½ MS médium bez vitamínov a následnom prenesení 4-dňových klíčencov *Arabidopsis* na média s obsahom 100, 150 a 200mmol.l⁻¹ NaCl. Prenesené klíčence boli kultivované na médiách navodzujúcich soľný stres 10 dní. Každý deň boli Petriho misky skenované a následne bola vyhodnotená dĺžka primárnych koreňov.

V kontrolných podmienkach bol rast primárnych koreňov u všetkých rastlín na 10. deň od prenosu skoro rovnaký. Po 10. dni od prenesenia dosahovali rastliny divokého typu Col-0 a transgéennej línie Ann1-GFP priemernú dĺžku koreňa 7,7 cm (Obr. 4A). Priemerná dĺžka

primárneho koreňa u kontrolných rastlín línie pMAT-GFP bola 7,6 cm (Obr. 4A). Rastliny mali normálne vyvinuté listové ružice, koreňové vlásky a bočné korene (Obr. 5A). Soľný stres inhiboval predlžovací rast primárnych koreňov. Pri porovnaní médií s obsahom rôznych koncentrácií NaCl bolo vidieť, že čím vyššia koncentrácia NaCl sa použila, tým viac bol rast primárnych koreňov spomalený. Na soľných médiách sa ukázali aj rozdiely v predlžovacom raste koreňov medzi jednotlivými študovanými líniami. Na médiu s obsahom 100mmol.l^{-1} NaCl preukazovali všetky línie inhibíciu predlžovacieho rastu primárneho koreňa (Obr. 4B). Najväčšia inhibícia bola pozorovaná u transgéennej línie Ann1-GFP. Rastliny Col-0 a pMAT-GFP dosahovali na 10. deň kultivácie priemernú dĺžku koreňa 2,9 cm, rastliny Ann1-GFP línie len 2,1 cm. Listové ružice boli menšie a rastliny nemali skoro žiadne bočné korene, či koreňové vlásky (Obr. 5B). Na médiách s obsahom 150mmol.l^{-1} NaCl (Obr. 4C) rastliny rástli prvých 6 dní po prenesení. Po 6. dni sa rast zastavil a korene Col-0 dosahovali 0,8 cm, rastliny pMAT-GFP dosahovali dĺžku 0,57 cm a rastliny s Ann1-GFP merali 0,68 cm. Rastliny nevytvárali žiadne bočné korene, ani koreňové vlásky (Obr. 5C). Na médiu s obsahom 200mmol.l^{-1} NaCl (Obr. 4D) mali rastliny úplne inhibovaný rast koreňov. Korene Col-0 merali v priemere 0,71 cm, pMAT-GFP 0,55 cm a Ann1-GFP 0,6 cm. Rastliny nemali koreňové vlásky a bočné korene (Obr. 5D).



Obr. 4 Porovnanie dĺžok koreňov línií Col-0, pMAT-GFP a Ann1-GFP v podmienkach soľného stresu. Dĺžka koreňov bola meraná v priebehu 10 dní po presení 4-dňových rastlín na kontrolné médium (A), na médium s obsahom 100 (B), 150 (C) a 200mmol.l⁻¹ NaCl (D).



Obr. 5 Dĺžka koreňov Col-0, pMAT-GFP a Ann1-GFP na 10. deň kultivácie v podmienkach soľného stresu. Korene rastúce na kontrolnom médiu (A), na médiu s obsahom 100 (B), 150 (C) a $200 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ NaCl}$ (D). Mierka 1 cm.

5.2.2. Pôsobenie soľného stresu na klíčivosť rastlín

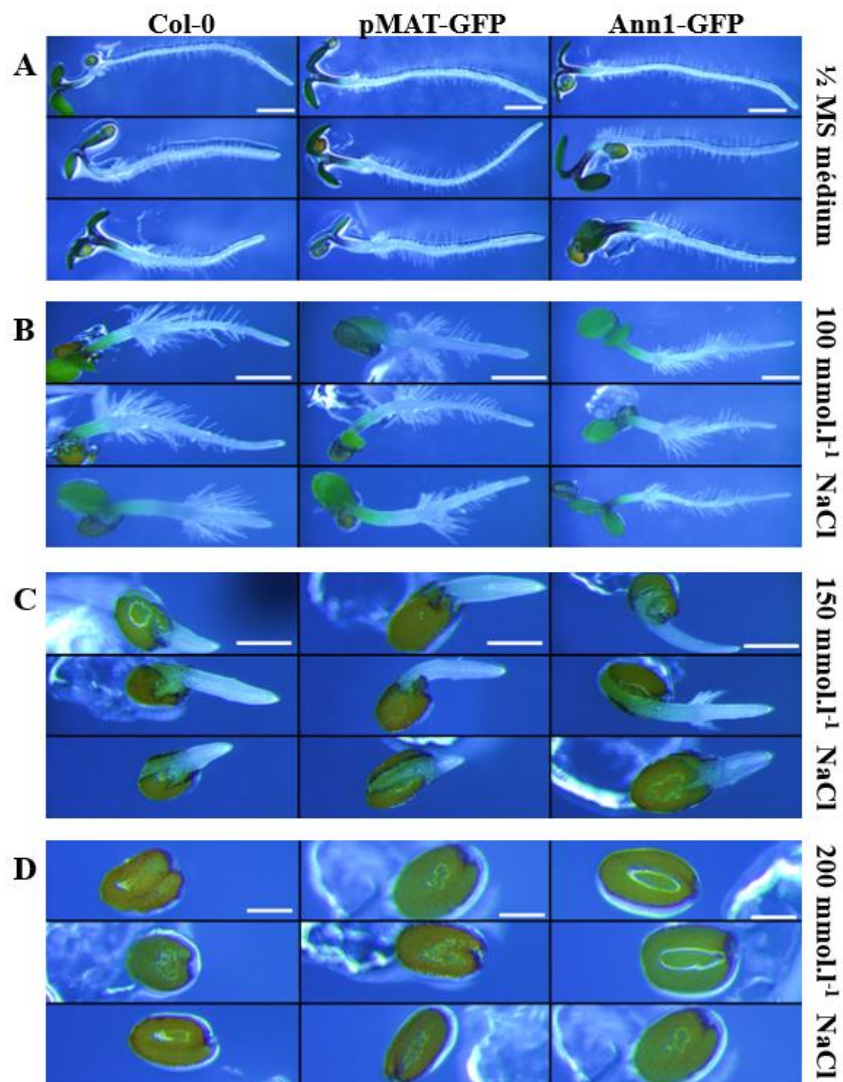
Test klíčivosti bol vykonaný v dvoch biologických replikách a spočíval vo vysadení semien línii Col-0, pMAT-GFP a Ann1-GFP priamo na média s NaCl. Efektivita klíčenia bola zaznamenávaná každých 24 hod po dobu troch dní. Stanovila sa klíčivosť semien v % na kontrolnom $\frac{1}{2}$ MS médiu, na médiu s obsahom 100, 150 a $200 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ NaCl}$.

Po 72 h boli rastliny vyfotené v binokulárnej lupe (Obr. 6) a klíčivosť bola vyhodnotená (Obr. 7 a 8). Pri tomto experimente sa ukázalo, že soľný stres má vplyv aj na klíčenie. So zvyšujúcou koncentráciou NaCl sa znižovala klíčivosť rastlín (Tab. 2). Na kontrolnom $\frac{1}{2}$ MS médiu bola klíčivosť po troch dňoch u všetkých vybraných línii najvyššia (Obr. 7A) a klíčence sa normálne vyvíjali a rástli (Obr. 6A). Na médiu s obsahom $100 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ NaCl}$ bola klíčivosť oproti

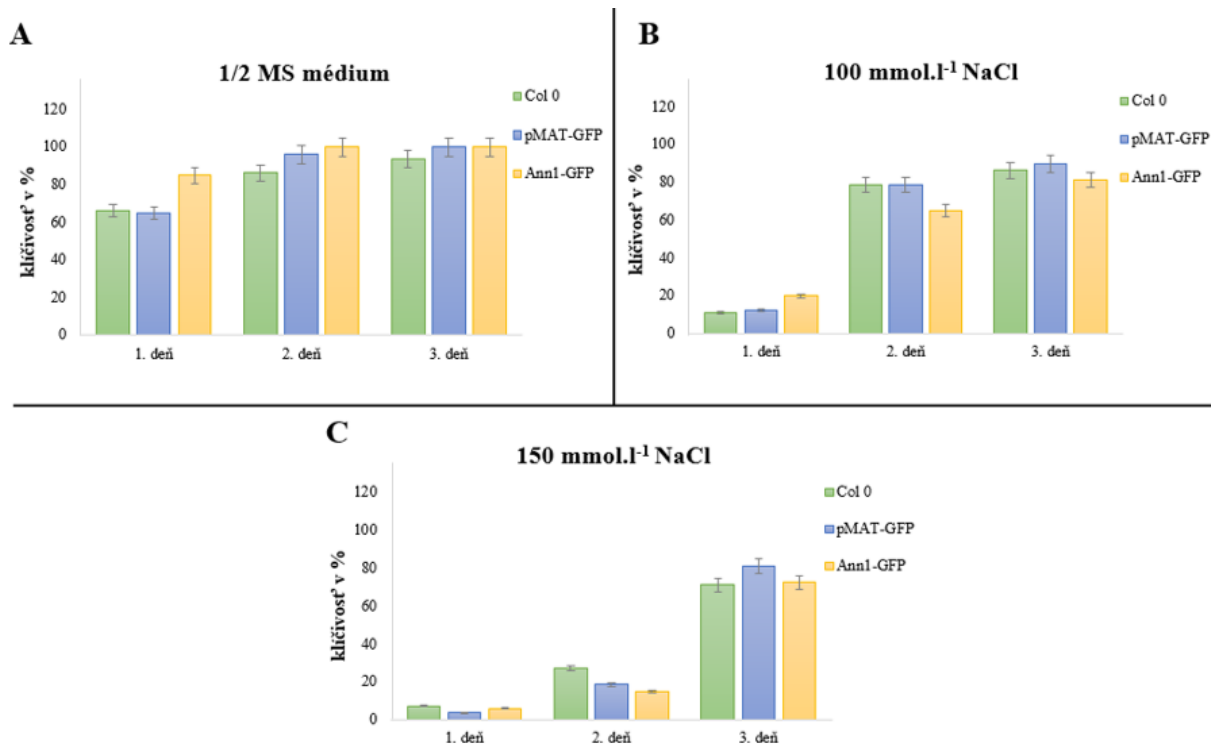
kontrolným podmienkam stále vysoká (Obr. 7B), zatiaľ čo rast primárnych koreňov bol čiastočne inhibovaný a korene mali dlhé koreňové vlásky (Obr. 6B). Koncentrácia 150mmol.l^{-1} NaCl výrazne inhibovala vývin klíčencov a predĺžovací rast koreňov (Obr. 6C). Na väčšine koreňov neboli ešte pozorovateľné koreňové vlásky. Semená na médiu s koncentráciou 200mmol.l^{-1} NaCl nevyklíčili ani po 72 hod (Obr. 6D).

Tab. 2 Klíčivosť semien Arabidopsis Col-0, pMAT-GFP a Ann1-GFP po treťom dni, udaná v %.

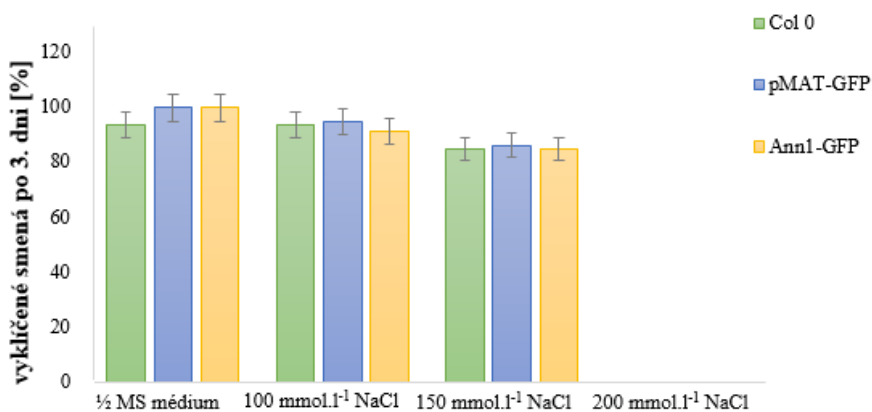
Typ média	Klíčivosť v %		
	Col-0	pMAT-GFP	Ann1-GFP
$\frac{1}{2}$ MS médium	93,75	100	100
100 mmol.l^{-1} NaCl	93,75	95	91,25
150 mmol.l^{-1} NaCl	85	86,25	85
200 mmol.l^{-1} NaCl	0	0	0



Obr. 6 Detaily klíčiacych rastlín Col-0, pMAT-GFP a Ann1-GFP na kontrolnom médiu (A), na médiu s obsahom 100 (B), 150 (C) a 200mmol.l⁻¹ NaCl (D). Semená boli dokumentované po 72 h od začiatku kultivácie. Mierka predstavuje 1 mm (A), 500 μ m u Col-0 a pMAT-GFP (B) 1 mm v prípade Ann1-GFP (B), 500 μ m (C) a 200 μ m (D).



Obr. 7 Porovnanie klíčivosti semien Arabidopsis Col-0, pMAT-GFP a Ann1-GFP vystavených soľnému stresu. Klíčivosť bola sledovaná každých 24 h od začiatku kultivácie po dobu 3 dní na kontrolnom médiu (A), na médiu s obsahom 100 (B) a 150mmol.l⁻¹ NaCl (C).

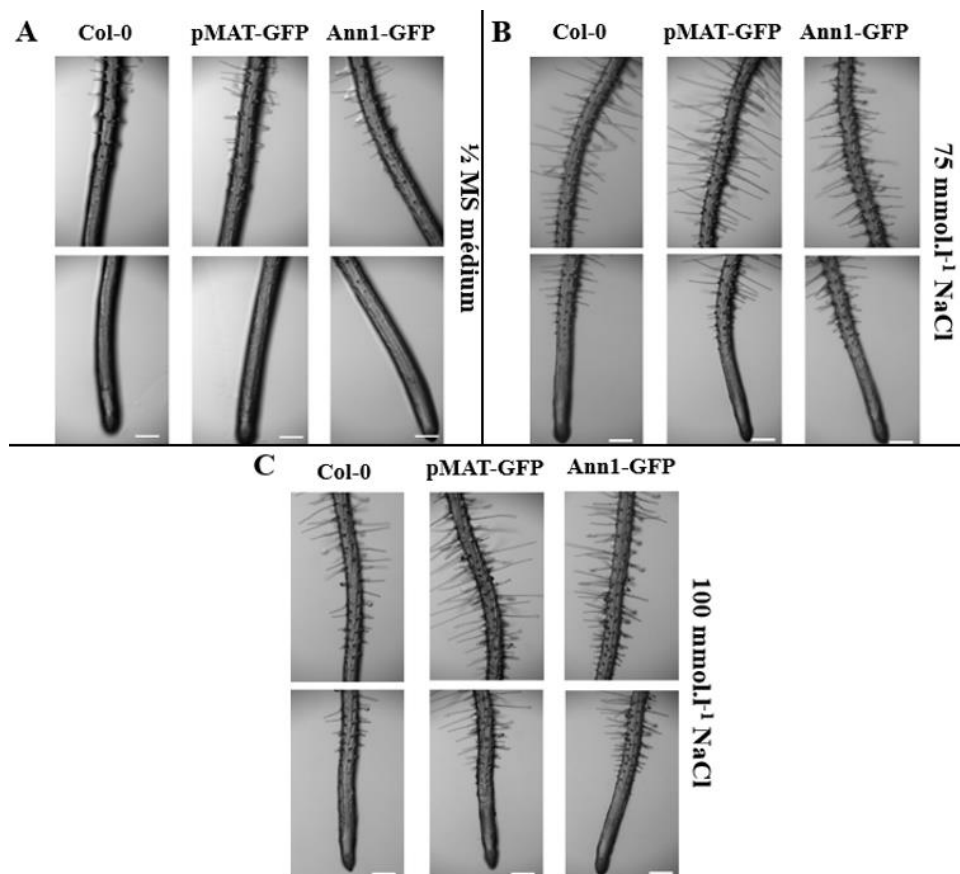


Obr. 8 Súhrnný graf klíčivosti semien *A. thaliana* vybratých línii po tretom dni experimentu.

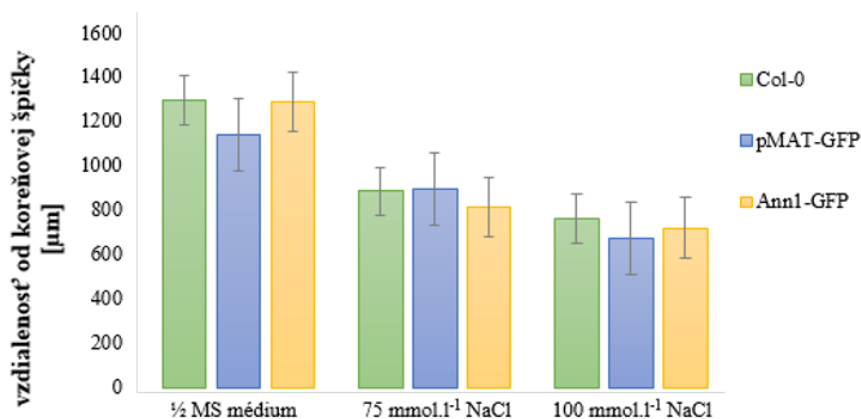
5.2.3. Pôsobenie sol'ného stresu na vzdialenosť koreňovej špičky od koreňových vláskov

Semená línií Col-0, pMAT-GFP a Ann1-GFP boli vysadené na kontrolné $\frac{1}{2}$ MS médium bez vitamínov. Po štyroch dňoch boli klíčence prenesené na $\frac{1}{2}$ médiá bez vitamínov s obsahom 75 a 100mmol.l⁻¹ NaCl. Po štyroch dňoch kultivácie boli korene zdokumentované pomocou binokulárnej lupy (Obr. 9) a následne zmerané vzdialenosti koreňovej špičky od prvých viditeľných koreňových vláskov (Obr. 10).

V kontrolných podmienkach bola vzdialenosť v prípade Col-0 a Ann1-GFP skoro rovnaká, čo sa opakovalo aj v podmienkach sol'ného stresu. V prípade pMAT-GFP bola táto vzdialenosť o niečo menšia. Na médiu s obsahom 75mmol.l⁻¹ NaCl naopak rastliny línie pMAT-GFP dosahovali najväčšiu vzdialenosť a na médiu s obsahom 100mmol.l⁻¹ NaCl sa vzdialenosť opäť zmenšila (Obr. 10).



Obr. 9 Koreňové fenotypy vybraných línií Col-0, pMAT-GFP a Ann1-GFP v kontrolných podmienkach (A), na médiu s pridaním 75 (B) a 100mmol.l⁻¹ NaCl (C). Dokumentované na 4. deň kultivácie na médiách navodzujúcich sol'ný stres. Mierka 200 μ m.

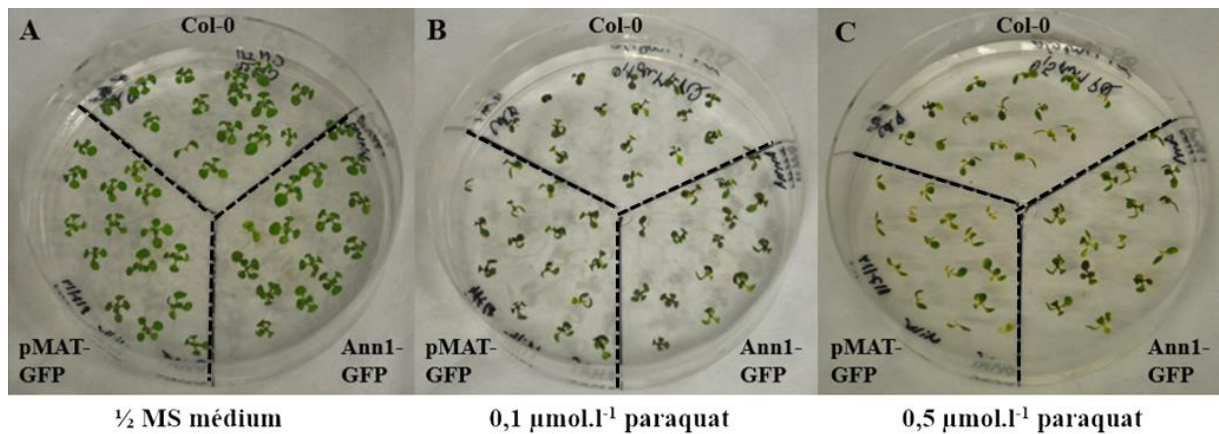


Obr. 10 Súhrmný graf priemernej vzdialenosti od koreňovej špičky po prvé koreňové vlásky na 1/2 MS médiu, na médiu s obsahom 75 a 100mmol.l⁻¹ NaCl, merané na 4. deň kultivácie na médiách navodzujúcich stres.

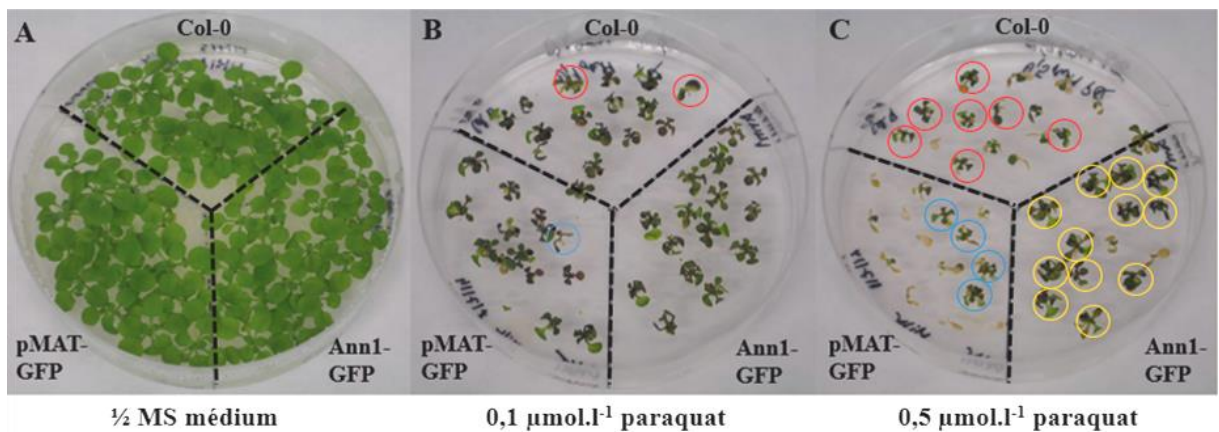
5.2.4. Pôsobenie oxidatívneho stresu na zmeny fenotypu Ann1-GFP rastlín

Štvordňové klíčence Col-0, pMAT-GFP a Ann1-GFP boli opatrne prenesené na okrúhle Petriho misky s obsahom 0,1 a 0,5µmol.l⁻¹ PQ, ktorý vyvoláva oxidatívny stres. Petriho misky boli fotografované každých 7 dní po dobu 3 týždňov.

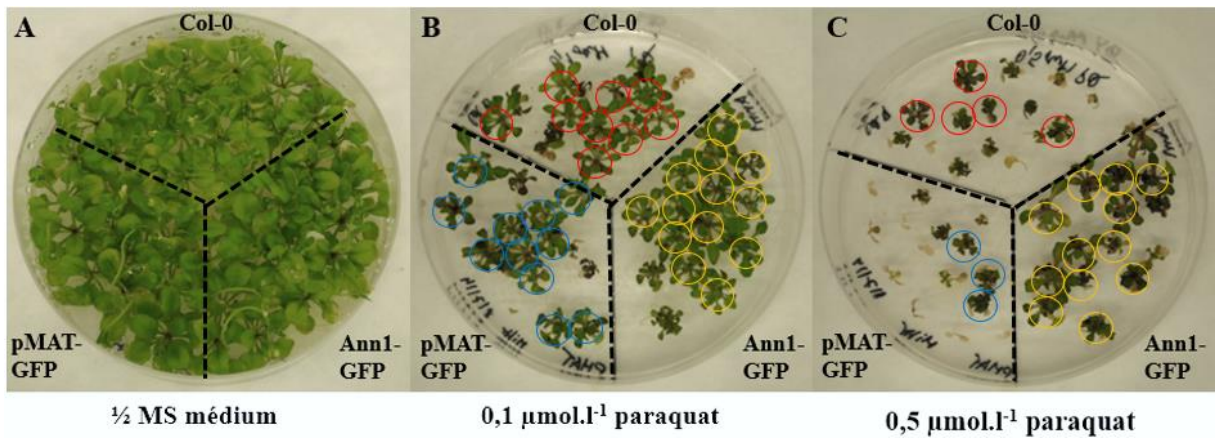
Už po 7 dňoch boli viditeľné rozdiely vo fenotype medzi dvoma koncentraciami PQ a kontrolným médiom (Obr. 11). Rastliny na kontrolnom 1/2 MS médiu mali väčšie listové ružice a bohatší koreňový systém (Obr. 11A). Po 14 dňoch nastali viditeľnejšie zmeny, kedy 0,5µmol.l⁻¹ PQ redukoval vývoj nadzemnej časti a koreňového systému u 53,3 % rastlín Col-0, u 73,3 % pMAT-GFP a len u 20 % rastlín Ann1-GFP (Obr. 12C). Ostatné rastliny prežili a rástli ďalej (Obr. 12C – modré, červené a žlté kruhy). Naproti tomu, na médiu s obsahom 0,1µmol.l⁻¹ PQ sa všetkým rastlinám transgénnej línie Ann1-GFP vyvíjala ružica listov, ktoré mali tmavozelenú farbu. V prípade pMAT-GFP to bolo 93,3 % a u Col-0 86,7 %. Ostatné rastliny mali žltozelené listové ružice (Obr. 12B – modré a červené kruhy). Po 21 dňoch nastali zmeny na médiu s 0,1µmol.l⁻¹ PQ, kedy 86,7 % rastlín transgénnej línie Ann1-GFP malo tmavozelenú zväčšenú listovú ružicu. V prípade pMAT-GFP to bolo len 73,3 % a u Col-0 60%. Všetky tieto rastliny kvitli (Obr. 13B – modré, červené a žlté kruhy). Naproti tomu, väčší rozdiel nastal na médiu s obsahom 0,5µmol.l⁻¹ PQ, kedy až 80 % rastlín Ann1-GFP malo tmavozelenú listovú ružicu. V prípade pMAT-GFP to bolo len 20 % a u Col-0 33,3 %. Všetky tieto rastliny kvitli (Obr. 13C – modré, červené a žlté kruhy).



Obr. 11 Vplyv oxidatívneho stresu na vybrané línie *A. thaliana* – Col-0, pMAT-GFP a Ann1-GFP po 7 dňoch kultivácie na kontrolnom médiu (A), na médiu s obsahom 0,1 (B) a 0,5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ PQ (C).



Obr. 12 Vplyv oxidatívneho stresu na vybrané línie *A. thaliana* – Col-0, pMAT-GFP a Ann1-GFP po 14 dňoch kultivácie na kontrolnom médiu (A), na médiu s obsahom 0,1 (B) a 0,5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ PQ (C). Modrý a červený kruh znázorňuje žltozelenú ružicu u pMAT-GFP a Col-0 (B). Modré kruhy znázorňujú prežívajúce rastliny u pMAT-GFP, žlté u Ann1-GFP a červené u Col-0 (C).

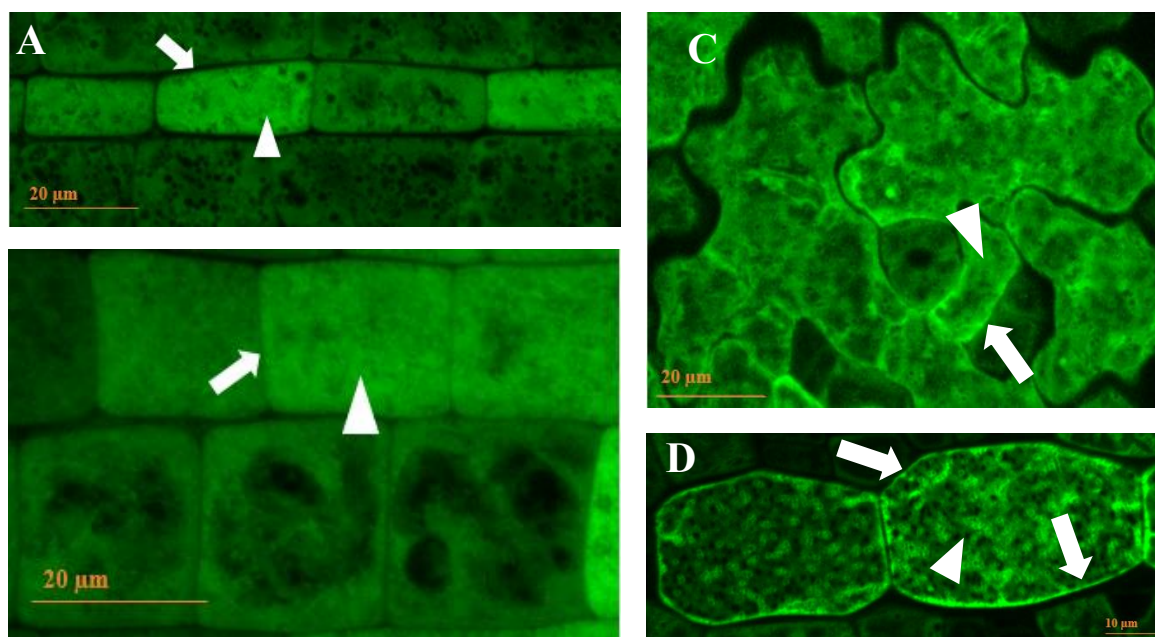


Obr. 13 Vplyv oxidatívneho stresu na vybrané línie *A. thaliana* – Col-0, pMAT-GFP a Ann1-GFP po 21 dňoch kultivácie na kontrolnom médiu (A), na médiu s obsahom 0,1 (B) a 0,5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ PQ (C). Modré kruhy znázorňujú prežívajúce rastliny u pMAT-GFP, žlté u Ann1-GFP a červené u Col-0 (B, C).

5.3. *In vivo* lokalizácia Ann1-GFP po abiotickom strese

5.3.1. Lokalizácia Ann1-GFP v bunkách *A. thaliana* v kontrolných podmienkach

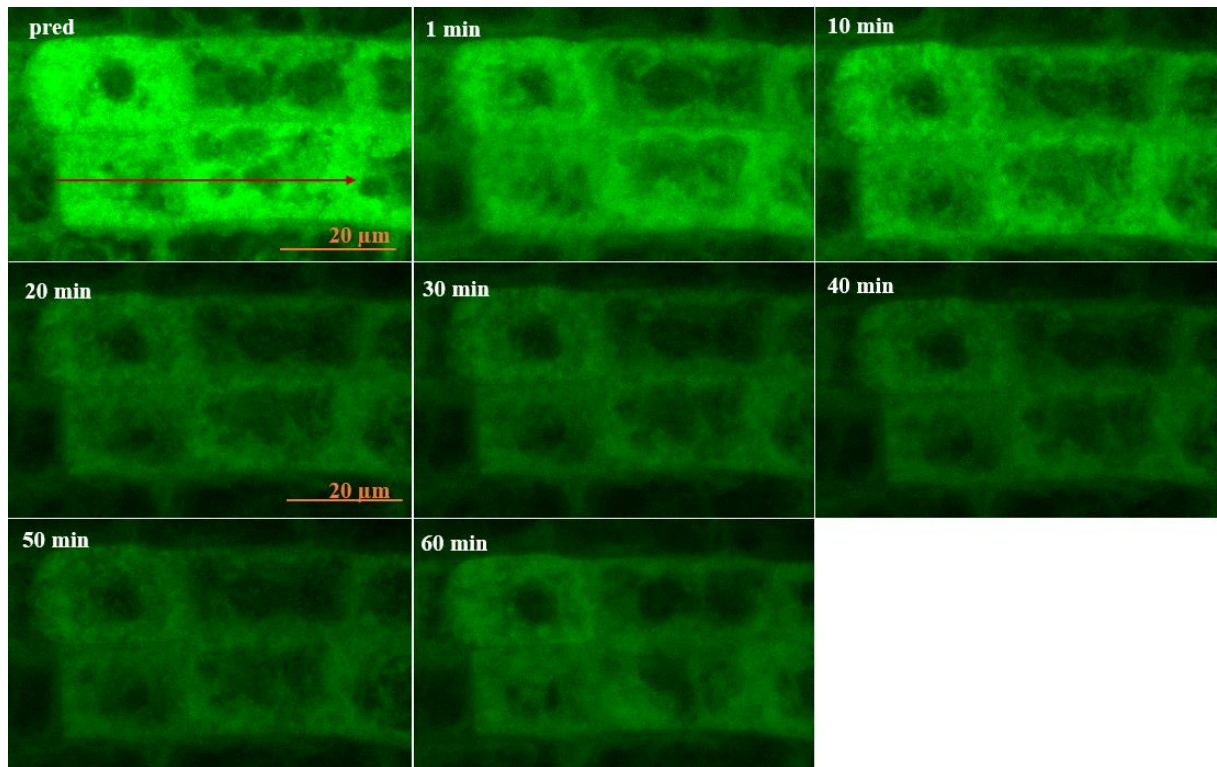
Annexín 1 fúzaný s GFP (Ann1-GFP) bol pri mikroskopovaní živých buniek klíčencov lokalizovaný na plazmatickej membráne a rozptýlený v cytoplazme (Obr. 14A, B, C a D).



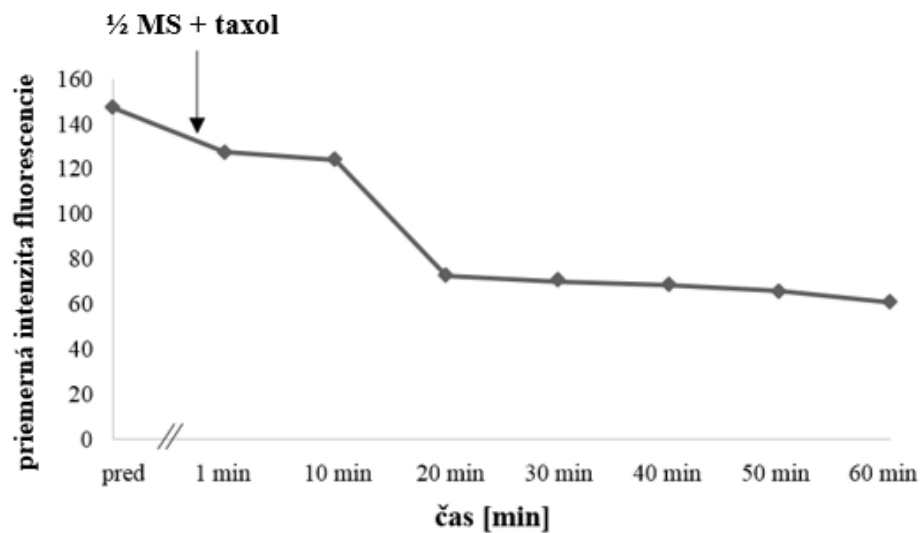
Obr. 14 *In vivo* lokalizácia Ann1-GFP v koreňových bunkách *Arabidopsis thaliana* (A a B), v bunkách klíčnych listov (C) a hypokotyly (D) v laserovom konfokálnom mikroskope Zeiss LSM 710 pri zväčšení 400x. Šípky ukazujú na lokalizáciu annexínu 1 v cytoplazmatickej membráne a trojuholníky v cytoplazme. Mierka 20 µm (A, B a C), 10 µm (D).

5.3.2. Vplyv mikrotubulárnych inhibítorov: taxol a oryzalín

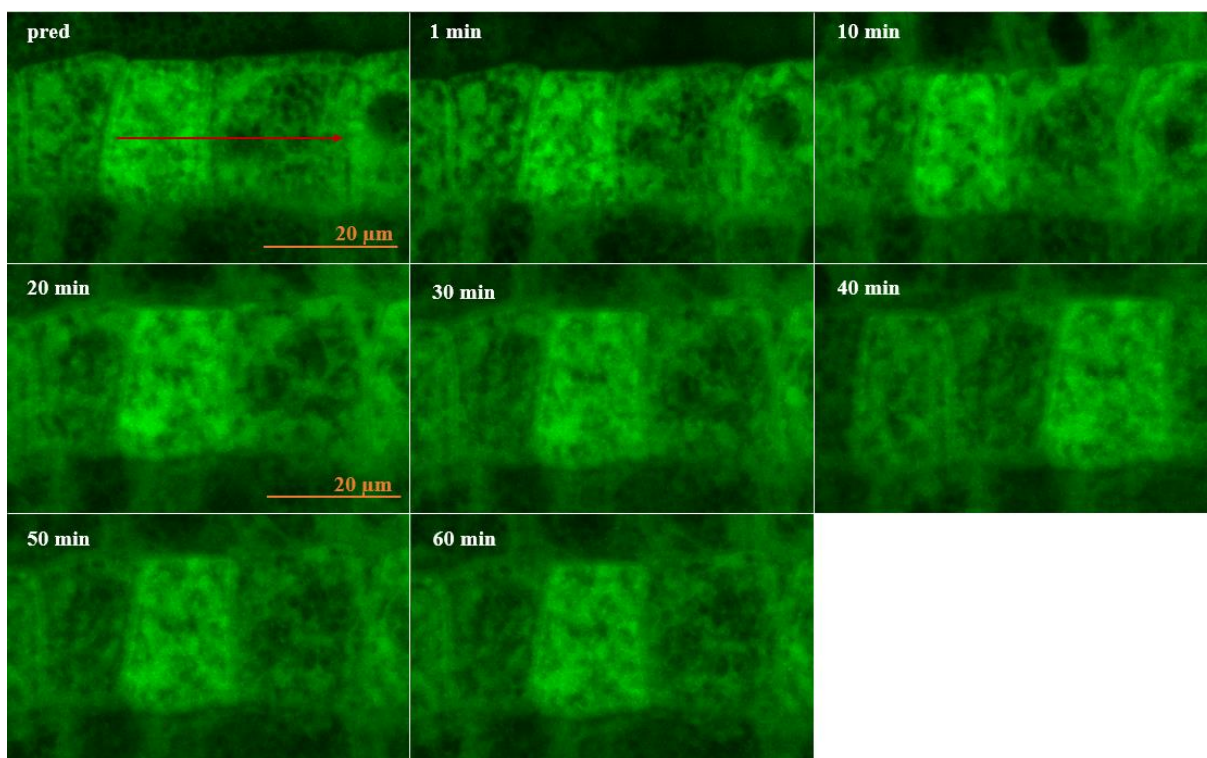
Na štúdium mikrotubulárneho cytoskeletu a možných interakcií s annexínom 1 bol použitý inhibítor taxol v koncentrácii $1 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ako mikrotubulárny stabilizátor a $2 \mu\text{mol.l}^{-1}$ oryzalín, ktorý spôsobuje depolymerizáciu mikrotubulov. Troj-, štvordňové semenáčky transgénej línie Ann1-GFP boli ošetrené s inhibítormi. Počas celého experimentu boli snímané rovnaké bunky pred a po aplikácii taxolu (Obr. 15) či oryzalínu (Obr. 19). Bunky boli snímané každých 10 minút počas 60, resp. 70 min. Ako kontrola bolo použité pri oboch inhibítormi tekuté $\frac{1}{2}$ MS médium s DMSO (Obr. 17 a 21). Boli sledované zmeny v intenzite fluorescencie Ann1-GFP. Obe inhibítory spôsobili pokles intenzity fluorescencie (Obr. 15, 16, 19 a 20). V prípade kontroly (DMSO) intenzita fluorescencie poklesla nepatrne v oboch prípadoch počas 60 min (Obr. 17, 18, 21 a 22).



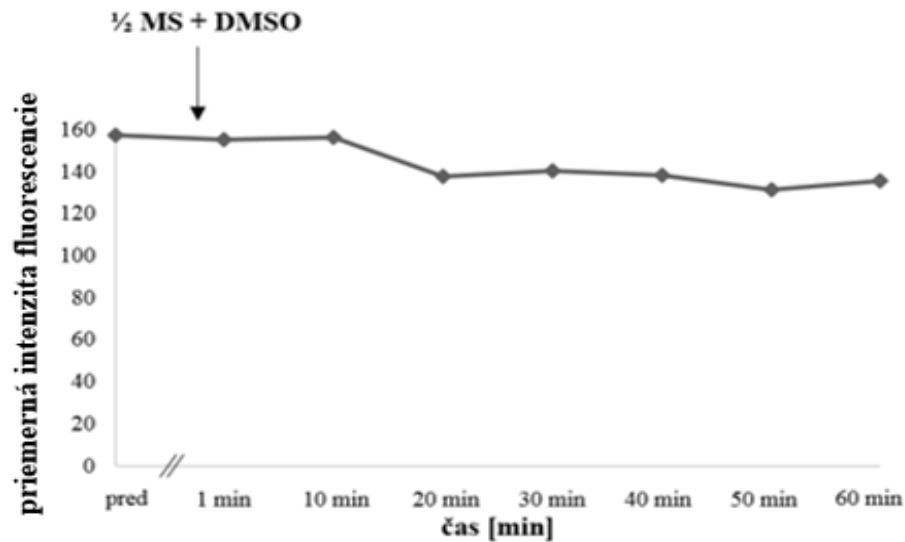
Obr. 15 Vplyv taxolu ($1 \mu\text{mol.l}^{-1}$) na zmenu intenzity fluorescencie v koreňových bunkách Ann1-GFP. Rovnaká skupina buniek bola snímaná pred a po aplikácii taxolu. Červená šípka naznačuje profil, v ktorom bola meraná intenzita fluorescencie počas 60 min inkubácie s taxolom. Mierka $20 \mu\text{m}$.



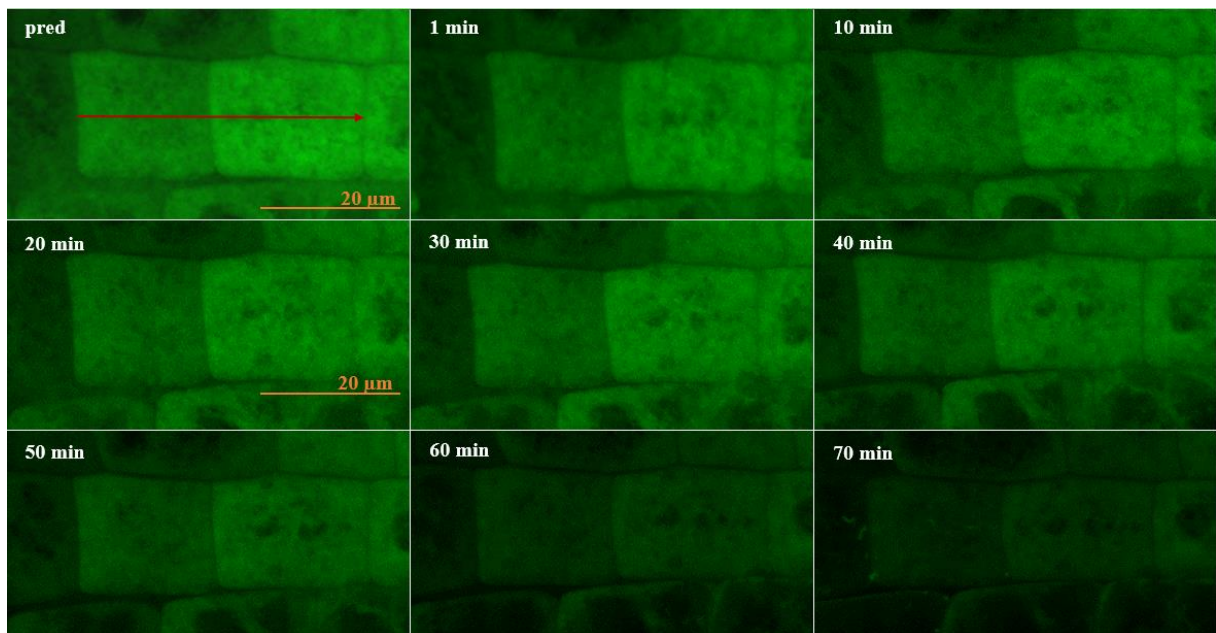
Obr. 16 Priemerná intenzita fluorescencie v koreňových bunkách Ann1-GFP transgénnej línie pred a po aplikácii taxolu. Intenzita fluorescencie Ann1-GFP nameraná v programe Zeiss Zen 2012 Black software a spracovaná v Exceli.



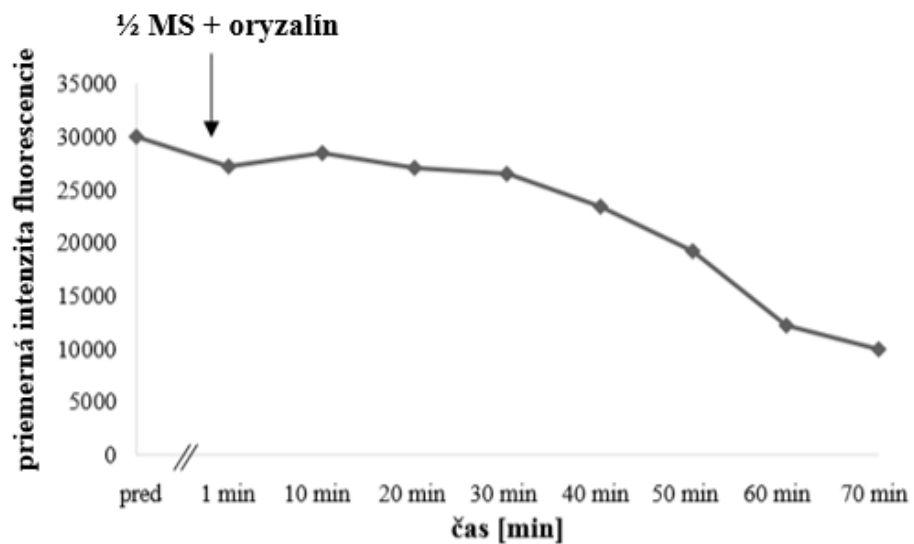
Obr. 17 Vplyv DMSO na zmenu intenzity fluorescencie v koreňových bunkách Ann1-GFP. Rovnaká skupina buniek bola snímaná pred a po aplikácii kontrolného média. Červená šípka naznačuje profil, v ktorom bola meraná intenzita fluorescencie počas 1 hodiny. Mierka 20 µm.



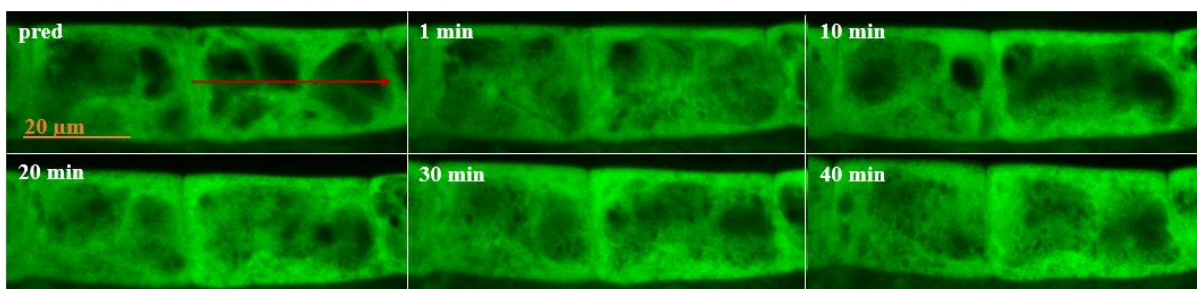
Obr. 18 Priemerná intenzita fluorescence v koreňových bunkách Ann1-GFP transgéennej línie pred a po aplikácii DMSO. Intenzita fluorescence Ann1-GFP nameraná v programe Zeiss Zen 2012 Black software a spracovaná v Exceli.



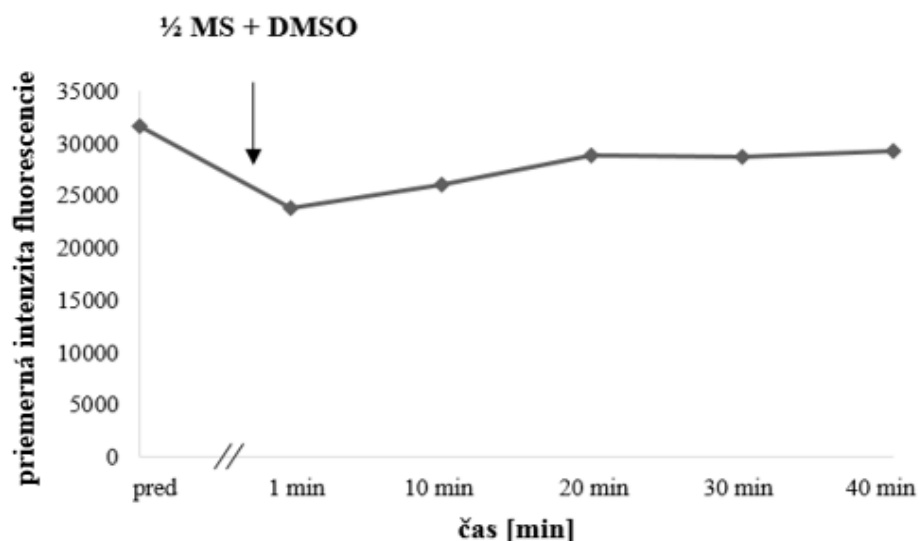
Obr. 19 Vplyv oryzalínu ($2 \mu\text{mol.l}^{-1}$) na zmenu intenzity fluorescence v koreňových bunkách Ann1-GFP. Rovnaká skupina buniek bola snímaná pred a po aplikácii oryzalínu. Červená šípka naznačuje profil, v ktorom bola meraná intenzita fluorescence počas 70 min inkubácie s oryzalínom. Mierka $20 \mu\text{m}$.



Obr. 20 Priemerná intenzita fluorescence v koreňových bunkách Ann1-GFP transgéennej línie pred a po aplikácii oryzalínu. Intenzita fluorescence Ann1-GFP nameraná v programe Zeiss Zen 2012 Black software a spracovaná v Exceli.



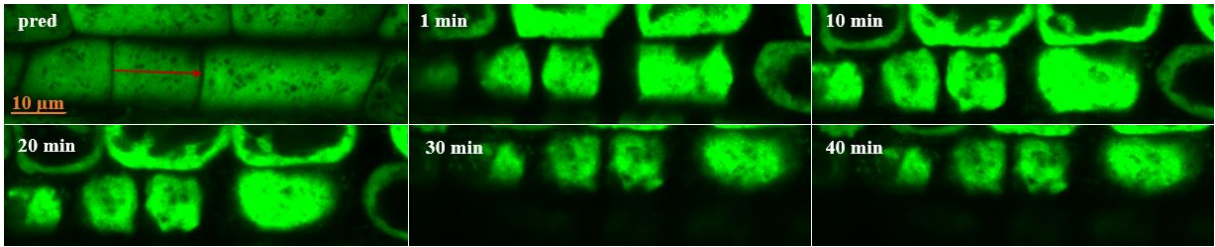
Obr. 21 Vplyv DMSO na zmenu intenzity fluorescence v koreňových bunkách Ann1-GFP. Rovnaká skupina buniek bola snímaná pred a po aplikácii kontrolného média. Červená šípka naznačuje profil, v ktorom bola meraná intenzita fluorescence počas 40 min. Mierka 20 μm.



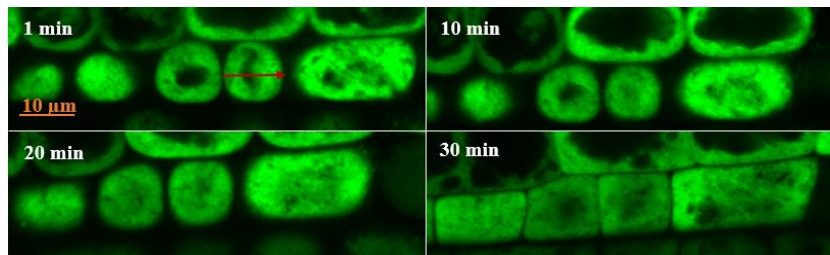
Obr. 22 Priemerná intenzita fluorescencie v koreňových bunkách Ann1-GFP transgénnej línie pred a po aplikácii DMSO. Intenzita fluorescencie Ann1-GFP nameraná v programe Zeiss Zen 2012 Black software a spracovaná v Exceli.

5.3.3. Vplyv soľného stresu

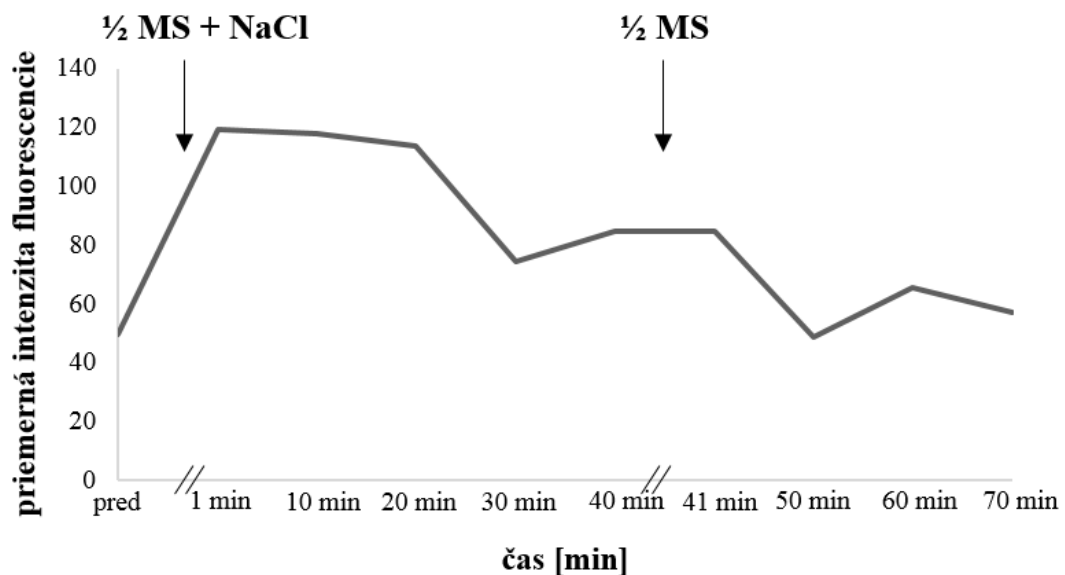
Pri *in vivo* štúdiu Ann1-GFP po abiotickom strese bolo použité 250mmol.l^{-1} NaCl. Počas celého experimentu boli snímané rovnaké bunky pred a po aplikácii 250mmol.l^{-1} NaCl (Obr. 23). Bunky boli snímané každých 10 minút počas 40 minút a následne sa roztok NaCl opatrne vymyl tekutým ½ MS médiom na overenie navrátenia buniek do pôvodného stavu (Obr. 24). Ako kontrola bolo použité tekuté ½ MS médium (Obr. 25, 27). Boli sledované zmeny v intenzite fluorescencie annexinom 1 fúzovaného s GFP. Soľný stres spôsobil plazmolýzu (zmrštenie protoplastu) v hyperosmotickom prostredí a zvýšila sa fluorescencia Ann1-GFP, ktorá ostala zvýšená aj po vymytí roztoku NaCl z preparátu tekutým ½ médiom (Obr. 26). Na overenie zvýšenej fluorescencie bola následne vykonaná aj biochemická analýza.



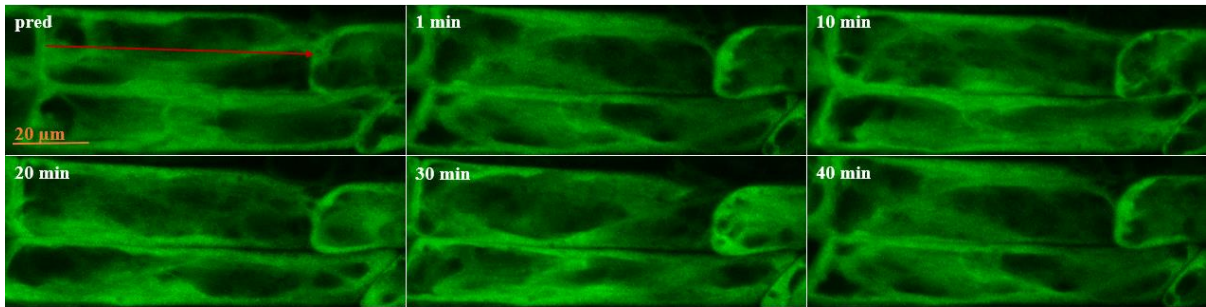
Obr. 23 Vplyv NaCl na zmenu intenzity fluorescence v koreňových bunkách Ann1-GFP. Rovnaká skupina buniek bola snímaná pred a po aplikácii NaCl. Červená šípka naznačuje profil, v ktorom bola meraná intenzita fluorescence počas 40 min. Mierka 10 μm .



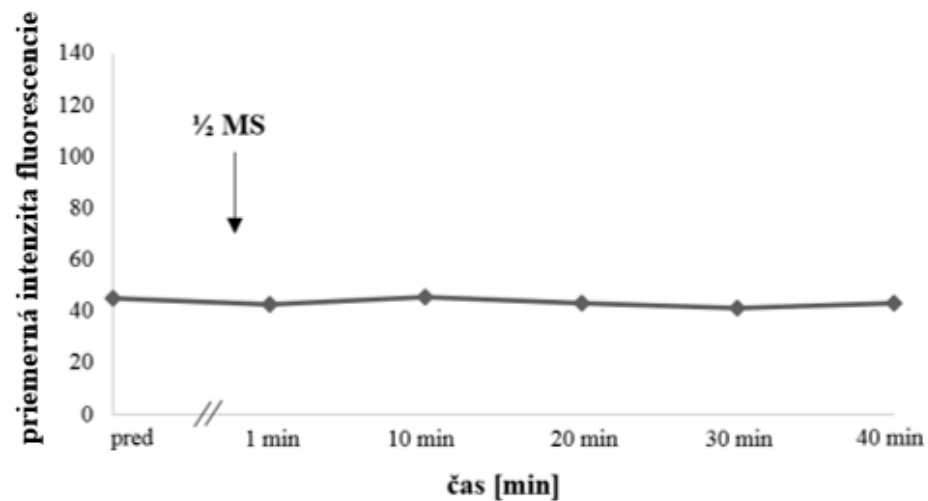
Obr. 24 Navrátenie koreňových buniek Ann1-GFP do pôvodného stavu (deplazmolýza) vymytím roztoku 250mmol.l^{-1} NaCl tekutým $\frac{1}{2}$ MS. Červená šípka naznačuje oblasť, v ktorej bola meraná intenzita fluorescence počas 30 min. Mierka 10 μm .



Obr. 25 Priemerná intenzita fluorescence v koreňových bunkách Ann1-GFP transgénej línie pred, po aplikácii a následnom vymytí roztoku 250mmol.l^{-1} NaCl tekutým $\frac{1}{2}$ MS. Intenzita fluorescence v koreňových bunkách Ann1-GFP nameraná v programe ImageJ a spracovaná v Exceli.



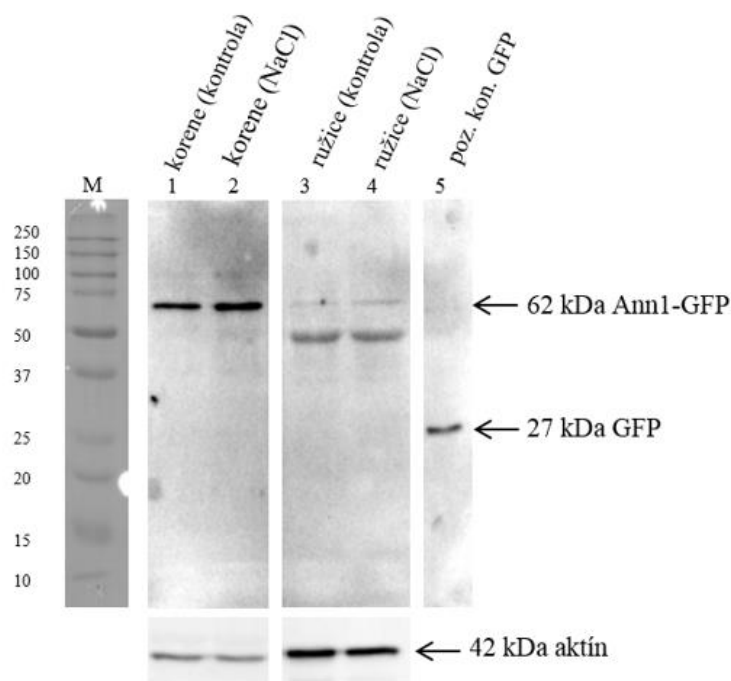
Obr. 26 Vplyv tekutého $\frac{1}{2}$ MS média na zmenu intenzity fluorescence v koreňových bunkách Ann1-GFP. Rovnaká skupina buniek bola snímaná pred a po aplikácii tekutého $\frac{1}{2}$ MS média. Červená šípka naznačuje profil, v ktorom bola meraná intenzita fluorescence počas 40 min. Mierka 20 μm .



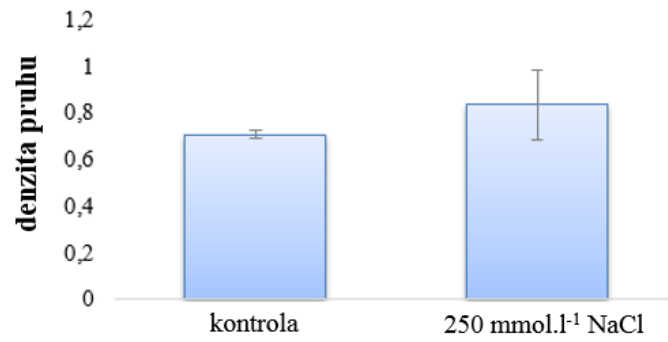
Obr. 27 Priemerná intenzita fluorescence v koreňových bunkách Ann1-GFP transgéennej línie pred a po aplikácii $\frac{1}{2}$ tekutého MS média. Intenzita fluorescence Ann1-GFP nameraná v programe ImageJ a spracovaná v Exceli.

5.4. Biochemická analýza Ann1-GFP po abiotickom strese

Imunoblotová analýza hladiny proteínu Ann1-GFP bola potrebná na overenie zvýšenej intenzity fluorescencie v koreňových bunkách transgéennej línie Ann1-GFP vystavených soľnému stresu (Obr. 23). Na PVDF membráne bol detekovaný proteínový pruh s molekulovou hmotnosťou zodpovedajúcou molekulovej hmotnosti fúzneho proteínu Ann1-GFP (62 kDa, Obr. 28). Proteínový pruh z koreňov rastlín, ktoré boli ovplyvnené NaCl, mal silnejšiu intenzitu ako pruh z koreňov kontrolných rastlín (Obr. 29). V listoch je Ann1-GFP zastúpený v menšej miere (Obr. 28). Ako kontrola zhodného obsahu proteínov vo vzorkách bol použitý aktín. Na overenie GFP bola použitá pozitívna kontrola GFP z rastlín línie pMAT-GFP.



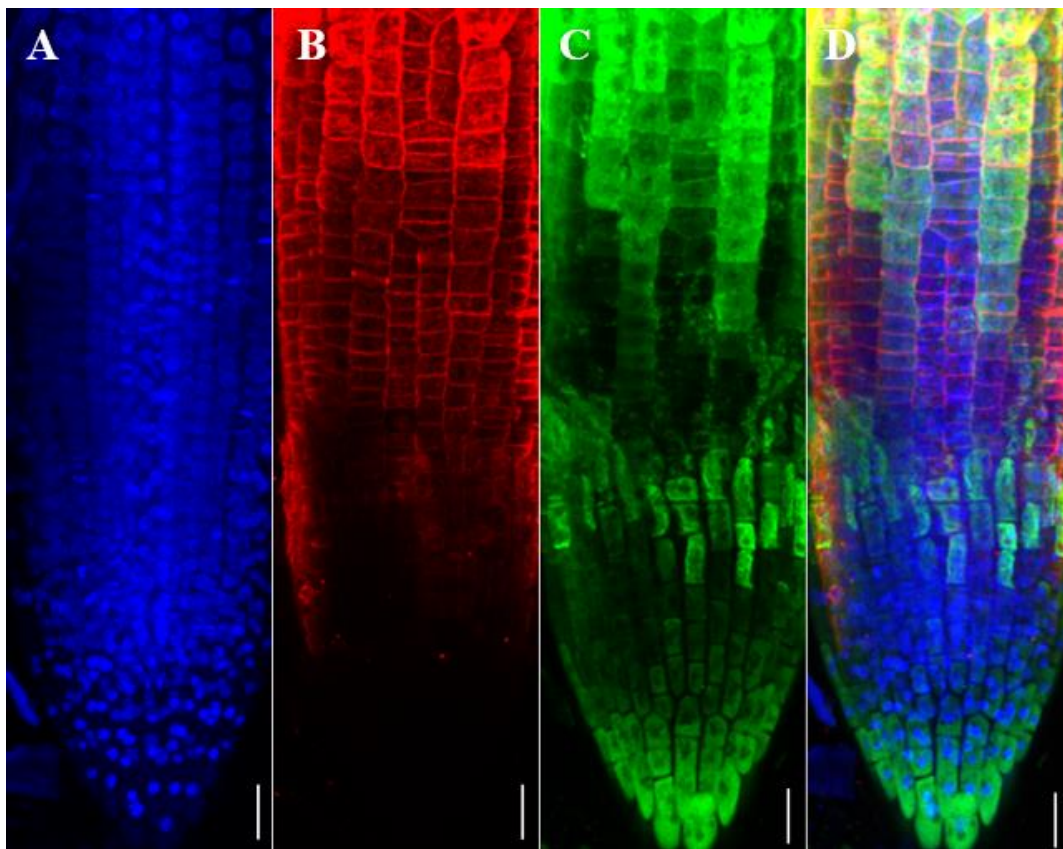
Obr. 28 Reprezentatívny Western blot z koreňov a listových ružíc rastlín transgéennej línie Ann1-GFP ovplyvnenej soľným stresom. Vzorky boli značené s primárnou protilátkou proti GFP. M – marker molekulovej hmotnosti, 1 – korene v kontrolných podmienkach ($\frac{1}{2}$ MS médium), 2 – korene ošetrené s 250mmol.l^{-1} NaCl, 3 – listové ružice v kontrolných podmienkach ($\frac{1}{2}$ MS médium), 4 – listové ružice ošetrené s 250mmol.l^{-1} NaCl, 5 – pozitívna kontrola GFP (rastliny línie pMAT-GFP), 1 – 4 – aktín.



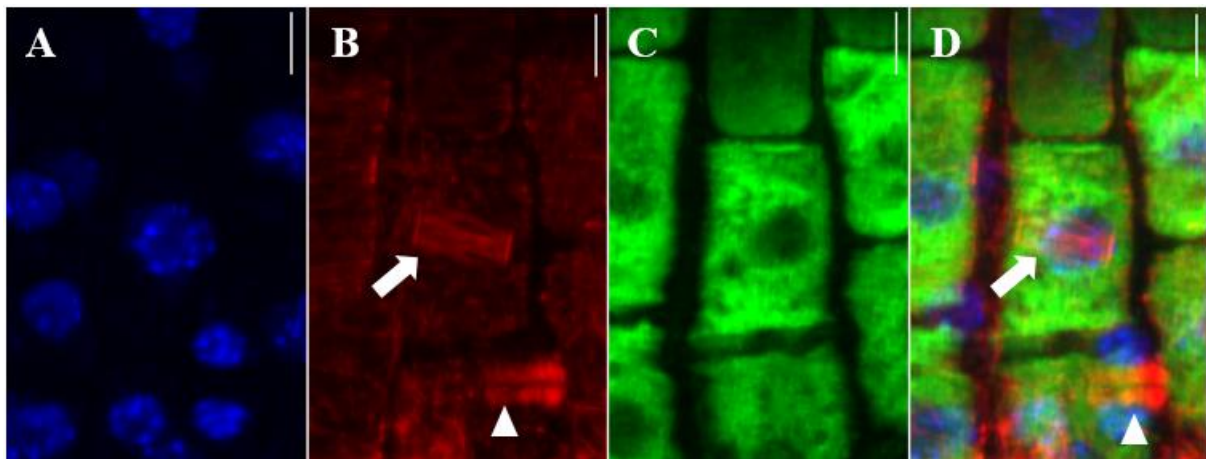
Obr. 29 Kvantitatívna analýza denzity pruhu Ann1-GFP v koreňoch transgénej línie Ann1-GFP na PVDF membráne po abiotickom strese. Denzita pruhu Ann1-GFP bola vyhodnotená v programe ImageJ a spracovaná v Exceli.

5.5. Imunocytochemické štúdium cytoskeletu u transgéennej línie Ann1-GFP metódou „whole mount“

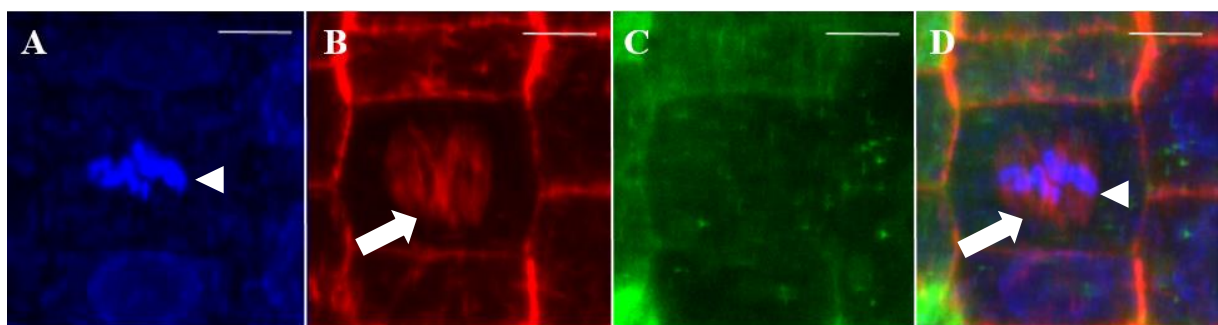
Imunocytochemicky, pomocou „whole mount“ metódy, bola sledovaná organizácia mikrotubulov v epidermálnych koreňových bunkách transgéennej línie Ann1-GFP. Mikrotubuly boli vizualizované použitím primárnej protilátky proti α -tubulínu, Ann1 bol vizualizovaný použitím primárnej protilátky proti GFP a DNA bola vizualizovaná použitím DAPI farbičky (Obr. 30). Niektoré meristematické bunky boli cytokineticky (Obr. 31) a mitoticky aktívne (Obr. 32) a boli pozorované mitotické figúry. Bol zachytený preprofázny zväzok mikrotubulov (PPB, Obr. 31B a D, šípka), ktorý stanoví orientáciu budúcej roviny delenia. Mitotické vretienko (Obr. 32B a D, šípka) s chromozómami v ekvatoriálnej rovine (Obr. 32A a D, trojuholník). Taktiež bol zachytený fragmoplast (Obr. 31B a D, trojuholník).



Obr. 30 Imunolokalizácia kortikálnych mikrotubulov a Ann1-GFP v koreňových epidermálnych bunkách klíčencov transgéennej línie Ann1-GFP. Lokalizácia DNA a jadier (A), mikrotubulov (B), Ann1-GFP (C) a zlúčené obrázky (D). Mierka 20 μ m.



Obr. 31 Imunolokalizácia kortikálnych mikrotubulov a Ann1-GFP v koreňových epidermálnych bunkách klíčencov transgéennej línie Ann1-GFP. Lokalizácia DNA a jadier (A), mikrotubulov (B), Ann1-GFP (C) a zlúčené obrázky (D). Šípky ukazujú na preprofázny zväzok mikrotubulov (B a D) a trojuholníky ukazujú na fragmoplast (B a D). Mierka 5 μ m.



Obr. 32 Imunolokalizácia mitotických mikrotubulov a Ann1-GFP v koreňových epidermálnych bunkách klíčencov transgéennej línie Ann1-GFP. Lokalizácia DNA a jadier (A), mikrotubulov (B), Ann1-GFP (C) a zlúčené obrázky (D). Šípky ukazujú na mitotické vretienko (B a D) a trojuholníky na chromozómy v ekvatoriálnej rovine (A a D). Mierka 5 μ m.

6. Diskusia

Jedným z cieľov práce bolo sledovanie vplyvu abiotického stresu na fenotypovú charakterizáciu koreňov vybraných línií *Arabidopsis thaliana* vystavených abiotickým stresom. Použili sa rastliny divokého typu Col-0, ktoré slúžili ako kontrola, rastliny pMAT-GFP exprimujúce chimérický gén pre cytoplasmatický fúzny proteín s GFP a transgénná línia Ann1-GFP, exprimujúca *Ann1* pod natívnym promótorom. Rastliny všetkých línií boli vystavené pôsobeniu soľného (NaCl) a oxidatívneho stresu (PQ). Odpovede rastlín na stres sú dynamické a zložité. Rozdiely nastávajú pri použití rôznych koncentrácií látok vyvolávajúcich stres (Dinneny *et al.*, 2008) a dĺžke pôsobenia stresora (Pinheiro *et Chaves*, 2011). Pri soľnom strese vidieť zníženú expanziu plochy listov (Wang *et Nil*, 2000) a koreňový systém je redukovaný v porovnaní s rastlinami kultivovanými v kontrolných podmienkach (Chartzolakis *et Klapaki*, 2000), čo potvrdili aj naše pozorovania. Rastliny transgéennej línie Ann1-GFP sú citlivejšie na soľný stres než rastliny divokého typu Col-0. V kontrolných podmienkach neboli pozorované rozdiely v predlžovaní koreňa (Obr. 4A). Avšak už pri koncentrácii 100mmol.l^{-1} NaCl bola priemerná dĺžka primárneho koreňa rastlín línie Ann1-GFP menšia než u Col-0 a pMAT-GFP (Obr. 5B). Pri koncentrácii 150 a 200mmol.l^{-1} NaCl bola situácia rovnaká, ale rastliny prestali rásť už po prvom dni od prenosu na média s rôznou koncentráciou NaCl (Obr. 4C, D). Bočné korene sa vôbec nevytvorili (Obr. 5C, D). Rastliny ovplyvňované soľným stresom môžu strácať chlorofyl (Agastian *et al.*, 2000), čo bolo možné pozorovať na rastlinách kultivovaných na médiu s pridaním 200mmol.l^{-1} NaCl (Obr. 5D). Soľný stres ovplyvnil aj klíčivosť semien všetkých testovaných línií. Počas soľného stresu dochádza k ovplyvneniu iónových transportérov a ATPázy, ktorá pumpuje H^+ ióny von z bunky a udržuje tak elektrochemický potenciál bunky, aby sa zlepšil príjem nutrientov (Xiong *et Zhu*, 2002). To vysvetľuje, prečo majú rastliny v týchto podmienkach problém s klíčením. Po dlhšom pôsobení sa pomocou špecifickej ATPázy uloženej v membráne vakuoly akumulujú ióny, ktoré sú vďaka soľnému stresu v bunke v nadmernom množstve a vyrovnáva sa tak elektrochemický potenciál vo vnútri bunky. Rastliny síce ešte môžu v obmedzenej miere rásť, ale sú omnoho menšie ako pri kontrolných podmienkach. Rastliny Col-0 a pMAT-GFP mali priemernú klíčivosť na kontrolnom médiu a na médiách s obsahom NaCl vyššiu ako transgénná línia Ann1-GFP (Obr. 6) a dĺžka primárneho koreňa sa so vzrastajúcou koncentráciou NaCl zmenšovala (Obr. 7). Na médiu s obsahom 200mmol.l^{-1} NaCl nevyklíčili žiadne semená zo študovaných línií.

Rozdiely v raste boli pozorované aj pri oxidatívnom strese, kedy sa produkuje viac ROS, ktoré všeobecne zaujímajú dôležitú úlohu pri raste buniek. Navyše stimulujú transportné kanály

v plazmatickej membráne, ktoré zabezpečujú príjem Ca^{2+} do buniek (Finkel *et al.*, 2000), ktorý tiež zohráva významnú úlohu v raste buniek. Avšak nadmerná koncentrácia ROS je už pre bunky toxická a po dlhšom pôsobení sa rastliny nemôžu normálne vyvíjať a zostávajú zakrpatené. Výsledky s aplikáciou dvoch rôznych koncentrácií PQ pri raste rastlín túto tendenciu potvrdili. Ukázalo sa, že transgénna línia Ann1-GFP je odolnejšia voči PQ než divoký typ Col-0 alebo pMAT-GFP. Po 21 dňoch kultivácie rastlín na médiu s obsahom $0,5\mu\text{mol.l}^{-1}$ PQ boli rastliny línie Ann1-GFP rezistentnejšie než rastliny Col-0 a pMAT-GFP. Zväčšenú tmavozelenú listovú ružicu, ktorá kvitla, malo až 80 % rastlín Ann1-GFP línie, v prípade pMAT-GFP to bolo len 20 % a u Col-0 33,3 % rastlín (Obr. 13C).

Annexíny patria do rodiny Ca^{2+} -viažucich proteínov, ktoré môžu viazať membránové fosfolipidy (Santoni *et al.*, 1998). Nami sledovaný annexín 1 je exprimovaný hlavne v cytoplazmatickej membráne a v cytoplazme (Lee, 2004). *In vivo* lokalizácia Ann1-GFP v koreňových, listových a hypokotylových epidermálnych bunkách pomocou laserovej konfokálnej mikroskopie bola potvrdená v zhode s literatúrou (Obr. 14A, B, C a D). Rastlinné annexíny sa podieľajú na organizácii a funkciách biologických membrán. Môžu zohrávať dôležitú úlohu v stresových odpovediach rastlín (Górecka *et al.*, 2005). Ann1 by mohol hrať úlohu pri intracelulárnej iónovej homeostáze. Keď sa zvýši hladina cytosolického vápnika, annexíny sa pohybujú z cytoplazmy smerom k povrchu cytoplazmatickej membrány a interagujú s cytoskeletom. V práci sme sa zamerali aj na pôsobenie mikrotubulárnych inhibítorov na abundanciu Ann1-GFP pomocou sledovania zmien v intenzite fluorescencie. Inhibítory MT sú chemicky rôznorodá skupina látok a sú účinné už pri veľmi nízkych koncentráciách (Jordan *et al.*, 1992). Za týmto účelom bol vybraný taxol a oryzalín. V transgénej línii Ann1-GFP bola overená interakcia Ann1 s mikrotubulárnym cytoskeletom, kedy sa po aplikácii inhibítorov MT znižovala intenzita fluorescencie Ann1-GFP v priebehu 60, resp. 70 min (Obr. 15 a 19). K overeniu správnosti experimentu bolo použité tekuté $\frac{1}{2}$ MS médium s DMSO ako kontrola, ktorého intenzita fluorescencie Ann1-GFP počas pozorovania nepatrne poklesla (Obr. 17 a 18). V prostredí soľného stresu, kedy dochádza k plazmolýze rastlinných buniek, sa zvyšuje príliv Ca^{2+} a tak sa zvyšuje koncentrácia cytosolického vápnika (Kiegle *et al.*, 2000; Shi *et al.*, 2000; Tracy *et al.*, 2008). Annexíny agregujú membránové plochy a tým sa zvyšuje intenzita fluorescencie Ann1-GFP (Obr. 23 a 25). Táto periférna väzba je reverzibilná, pretože po dostatočnom premytí tekutým $\frac{1}{2}$ MS médiom sa bunky a intenzita fluorescencie vrátili do pôvodného stavu (Obr. 24 a 25). Zvýšenie fluorescencie sa overilo aj biochemickou analýzou pomocou SDS-PAGE a Western blotu. Rastliny Ann1-GFP boli

inkubované v rovnakej koncentrácii NaCl ako pri *in vivo* lokalizácii a následne boli analyzované. Z výsledkov bolo zreteľne vidieť zvýšenú intenzitu fluorescencie Ann1-GFP v koreni (Obr. 28 a 29). V listoch je Ann1 zastúpený v menšej miere (Lee, 2004), čo potvrdila aj biochemická analýza (Obr. 28).

Napokon bola vykonaná analýza organizácie mikrotubulov u klíčencov línie Ann1-GFP pomocou imunofluorescenčného značenia tubulínu metódou „whole mount“ (Šamajová *et al.*, 2014). V bunkách vidieť normálne bunkové delenia a mitotické mikrotubulárne figúry vyskytujúce sa v bunkovom delení rastlín – PPB, fragmoplast (Obr. 31) a mitotické vretienko (Obr. 32). Asociáciu prípadne kolokalizáciu Ann1-GFP s mikrotubulami sa nám zatiaľ nepodarilo dokázať.

7. Záver

V literárnom prehľade bola detailne popísaná štruktúra annexínov ako multigénnej rodiny membránových proteínov a charakterizované annexíny vyskytujúce sa v *A. thaliana*. Podrobnejšie je popísaný nami sledovaný annexín 1, najpočetnejší annexín z rodiny annexínov u *Arabidopsis*. V prehľade sú zhrnuté základné poznatky o vápnikovom signalingu, cytoskelete rastlín, spôsoboch odpovedí rastlín na vybrané abiotické stresy a o modelovom druhu *A. thaliana* a jeho využití vo vedeckom výskume.

V experimentálnej časti bola prevedená fenotypová analýza Ann1-GFP za kontrolných podmienok ($\frac{1}{2}$ MS médium), pri pôsobení soľného stresu (75, 100, 150, 200 alebo 250 mmol.l⁻¹ NaCl) a pri pôsobení oxidatívneho stresu (0,1 alebo 0,5 μ mol.l⁻¹ paraquat). Bolo pozorovaných a popísaných mnoho zmien pri aplikácii týchto abiotických stresov, vrátane klíčivosti semien, dĺžky koreňov, vzdialenosti koreňovej špičky od prvých koreňových vláskov a fenotypové zmeny pôsobením oxidatívneho stresu. Tieto efekty boli paralelne porovnávané s rastlinami pMAT-GFP línie a divokého typu Col-0. Na soľný stres bola najcitlivejšia transgénna línia Ann1-GFP. Na médiách s obsahom NaCl dosahovali primárne korene tejto línie najkratšiu dĺžku a tiež klíčenie semien bolo viac inhibované v porovnaní s líniou pMAT-GFP a divokým typom Col-0. Avšak na oxidatívny stres bola transgénna línia Ann1-GFP najrezistentnejšia.

Ďalšou časťou bola *in vivo* lokalizácia Ann1-GFP po pôsobení mikrotubulárnych inhibítorov a soľného stresu. Obidva inhibítory, taxol a oryzalín, navodili zníženie intenzity fluorescencie Ann1-GFP v priebehu 60, resp. 70 min. Naopak NaCl navodil zvýšenie intenzity fluorescencie. Výsledky vplyvu soľného stresu na *in vivo* lokalizáciu Ann1-GFP boli následne overené pomocou Western blotu, kde sa potvrdilo zvýšenie denzity fluorescencie Ann1-GFP v koreňoch ovplyvnených NaCl.

Poslednou časťou bolo imunocytochemické štúdium mikrotubulov metódou „whole mount“. Bola sledovaná organizácia mikrotubulov u klíčencov Ann1-GFP pomocou imunofluorescenčne značeného tubulínu.

8. Zoznam použitej literatúry

- Agastian, P., Kingsley, S.J., Vivekanandan, M. (2000): Effect of salinity on photosynthesis and biochemical characteristics in mulberry genotypes. *Photosynthetica*. **38**: 287-290.
- Ali-Dinar, H.M., Ebert, G., Ludders, P. (1999): Growth, chlorophyll content, photosynthesis and water relations in guava (*Psidium guajava* L.) under salinity and different nitrogen supply. *Gartenbauwissenschaft*. **64**: 54-59.
- Allen, D.J., Ort, D.R. (2001): Impact of chilling temperatures on photosynthesis in warm climate plants. *Trends Plant Sci*. **6**: 36-42.
- Amarah, N.H., Alqudah, A.M., Amayreh, J.A., McAndrews, G.M. (2009): The effect of late-terminal drought stress on yield components of four barley cultivars. *J Agron Crop Sci*. **195**: 427-441.
- Amos, L.A. (2011): What tubulin drugs tell us about microtubule structure and dynamics. *Semin Cell Dev Biol*. **22**: 916-926.
- Anjum, S.A., Xie, X.Y., Wang, L.C., Saleem, M. F., Man, C., Lei, W. (2011): Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *Afr J Agric Res*. **6**: 2026-2032.
- Anthony, R.G., Reichelt, S., Hussey, P.J. (1999): Dinitroaniline herbicide resistant transgenic tobacco plants generated by co-overexpression of a mutant alpha-tubulin and a beta-tubulin. *Nat Biotechnol*. **17**: 712-716.
- Apel, K., Hirt H. (2004): Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol*. **55**: 373-99.
- Arabidopsis Genome Initiative (2000): Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*. **408**: 796-815.
- Arabidopsis Genome Initiative. (2000): Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*. **408**: 796-815.
- Asada, K. (1999): The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. **50**: 601-639.
- Bajer, A.S., Molè-Bajer, J. (1986): Drugs with colchicine-like effects that specifically disassemble plant but not animal microtubules. *Ann N Y Acad Sci*. **466**: 767-784.
- Baluška, F.S., Šamaj, J., Napier, R., Volkmann, D. (1999): Maize calreticulin localizes preferentially to plasmodesmata in root apex. *Plant J*. **19**: 481-488.
- Barton, G.J., Newman, R.H., Freemont, P.S., Crumpton, M.J. (1991): Amino acid sequence analysis of the annexin super-gene family of proteins. *Eur J Biochem*. **198**: 749-760.
- Baskin, T.I., Beemster, G.T., Judy-March, J.E., Marga, F. (2004): Disorganization of cortical microtubules stimulates tangential expansion and reduces the uniformity of cellulose microfibril alignment among cells in the root of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. **135**: 2279-2290.
- Batley, N.H., Blackbourn, H.D. (1993): The control of exocytosis in plant cells. *New Phytol*. **125**: 307-338.
- Bengough, A. G., McKenzie, B. M., Hallett, P. D., Valentine, T. A. (2011): Root elongation, water stress, and mechanical impedance: a review of limiting stresses and beneficial root tip traits. *J Exp Bot*. **62**: 59-68.
- Bethke, P.C., Jones, R.L. (2001): Cell death of barley aleurone protoplasts is mediated by reactive oxygen species. *Plant J*. **25**: 19-29.
- Bibikova, T. N., Blancaflor, E. B., Gilroy, S. (1999): Microtubules regulate tip growth and orientation in root hairs of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. **17**: 657-665.
- Blumwald, E., Aharon, G. S., Apse, M. P. (2000): Sodium transport in plant cells. *Biochim Biophys Acta*. **1465**: 140-51.
- Bohnert, H. J., Sheveleva, E. (1998): Plant stress adaptations-making metabolism move. *Curr Opin Plant Biol*. **1**: 267-74.

- Boustead, C.M., Smallwood, M., Small, H., Bowles, D.J., & Walker, J. H. (1989): Identification of calcium-dependent phospholipid-binding proteins in higher plant cells. *FEBS Letters*. **244**: 456-460.
- Brandizzi, F., Wasteneys, G.O. (2013): Cytoskeleton-dependent endomembrane organization in plant cells: an emerging role for microtubules. *Plant J*. **75**: 339-349.
- Bryk, R., Griffin, P., Nathan, C. (2000): Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins. *Nature*. **407**: 211-5.
- Cai, G., Faleri, C., Del Casino, C., Emons, A.M.C., Cresti, M. (2011): Distribution of callose synthase, cellulose synthase, and sucrose synthase in tobacco pollen tube is controlled in dissimilar ways by actin filaments and microtubules. *Plant Physiol*. **155**: 1169-1190.
- Cantero, A., Barthakur, S., Bushart, T.J., Chou, S., Morgan, R.O., Fernandez, M.P., Roux, S.J. (2006): Expression profiling of the Arabidopsis annexin gene family during germination, de-etiolation and abiotic stress. *Plant Physiol Biochem*. **44**: 13-24.
- Carter, C., Pan, S., Zouhar, J., Avila, E.L., Girke, T., Raikhel, N.V. (2004): The vegetative vacuole proteome of Arabidopsis thaliana reveals predicted and unexpected proteins. *The Plant Cell Online*. **16**: 3285-3303.
- Clark, G.B., Roux, S.J. (1995): Annexins of plant cells. *Plant Physiol*. **109**: 1133–1139.
- Clark, G.B., Dauwalder, M., Roux, S. J. (1998). Immunological and biochemical evidence for nuclear localization of annexin in peas. *Plant Physiol Biochem*. **36**: 621-627.
- Clark, G.B., Hu, S., Brady, S.R., Kovar, D.R., Staiger, C.J., Roux, S.J., Muday, G.K. (2000): Identification of plant actin-binding proteins by F-actin affinity chromatography. *Plant J*. **24**: 127-137.
- Clark, G.B., Sessions, A., Eastburn, D.J., Roux, S.J. (2001): Differential expression of members of the annexin multigene family in Arabidopsis. *Plant Physiol*. **126**: 1072-1084.
- Clark, G.B., Morgan, R.O., Fernandez, M.P., Roux, S.J. (2012): Evolutionary adaptation of plant annexins has diversified their molecular structures, interactions and functional roles. *New Phytologist*. **196**: 695-712.
- Corson, F., Hamant, O., Bohn, S., Traas, J., Boudaoud, A., Couder, Y. (2009): Turning a plant tissue into a living cell froth through isotropic growth. *Proc Natl Acad Sci*. **106**: 8453–8458.
- Cramer, G.R. (2010): Abiotic stress & plant responses from the whole vine to the genes. *Aust J Grape Wine Res*. **16**: 86-93.
- Creutz, C.E., Pazoles, C.J., Pollard, H.B. (1978): Identification and purification of an adrenal medullary protein (synexin) that causes calcium-dependent aggregation of isolated chromaffin granules. *J Biol Chem*. **253**: 2858-2866.
- Cyr, R.J., Palevitz, B.A. (1995): Organization of cortical microtubules in plant cells. *Curr Opin Cell Biol*. **7**: 65-71.
- Dabitz, N., Hu, N. J., Yusof, A. M., Tranter, N., Winter, A., Daley, M., Zschörnig, O., Brisson, A., Hofmann, A. (2005): Structural determinants for plant annexin-membrane interactions. *Biochemistry*. **44**: 16292-300.
- De Bodt, S., Skirycz, A., Obata, T., De Clercq, I., Claeys, H., De Rycke, R., Andriankaja, M., Van Aken, O., Van Breusegem, F., Fernie, A.R., Inze, D. (2010): Developmental stage specificity and the role of mitochondrial metabolism in the response of Arabidopsis leaves to prolonged mild osmotic stress. *Plant Physiol*. **152**: 226-244.
- de Carvalho-Niebel, F., Lescure, N., Cullimore, J.V., Gamas, P. (1998): The *Medicago truncatula* MtAnn1 gene encoding an annexin is induced by nod factors and during the symbiotic interaction with *Rhizobium meliloti*. *Mol Plant Microbe Interact*. **11**: 504–13.
- de Carvalho-Niebel, F., Timmers, A.C.J., Chabaud, M., Defaux-Petras, A., Barker, D.G. (2002): The Nod factor-elicited annexin MtAnn1 is preferentially localized at the nuclear periphery in symbiotically activated root tissues of *Medicago truncatula*. *Plant J*. **32**: 343–352.

- de Keijzer, J., Mulder, B.M., Janson, M.E. (2014): Microtubule networks for plant cell division. *Syst Synth Biol.* **8**: 187-194.
- Del Blanco, I.A., Rajaram, S., Kronstad, W.E., Reynolds, M.P. (2000): Physiological performance of synthetic hexaploid wheat-derived populations. *Crop Sci.* **40**: 1257-1263.
- Demidchik, V., Shabala, S.N., Coutts, K.B., Tester, M.A., Davies, J.M. (2003): Free oxygen radicals regulate plasma membrane Ca^{2+} & K^{+} -permeable channels in plant root cells. *J Cell Sci.* **116**: 81–88.
- Denecke, J., Carlsson, L.E., Vidal, S., Høglund, A.S., Ek, B., van Zeijl, M.J., Sinjorgo, K.M., Palva, E.T. (1995): The tobacco homolog of mammalian calreticulin is present in protein complexes in vivo. *Plant Cell.* **7**: 391–406.
- Derry, W. B., Wilson, L., Jordan, M. A. (1998): Low potency of taxol at microtubule minus ends: implications for its antimitotic and therapeutic mechanism. *Cancer research.* **58**: 1177-1184.
- Desikan, R., Hancock, J. T., Coffey, M. J., Neill, S. J. (1996): Generation of active oxygen in elicited cells of *Arabidopsis thaliana* is mediated by a NADPH oxidase-like enzyme. *FEBS letters.* **382**: 213-217.
- Dinneny, J.R., Long, T.A., Wang, J.Y., Jung, J.W., Mace, D., Pointer, S., Barron, C., Brady, S.M., Schiefelbein, J., Benfey, P.N. (2008): Cell identity mediates the response of *Arabidopsis* roots to abiotic stress. *Science.* **320**: 942-945.
- Dodd, A.N., Tracy, F.E., Gilliam, M., Webb, A.A., Tester, M. (2008): NaCl-induced changes in cytosolic free Ca^{2+} in *Arabidopsis thaliana* are heterogeneous and modified by external ionic composition. *Plant Cell Environ.* **31**: 1063-73.
- Domozych, D. S., Sørensen, I., Sacks, C., Brechka, H., Andreas, A., Fangel, J. U., Popper, Z. A. (2014): Disruption of the microtubule network alters cellulose deposition and causes major changes in pectin distribution in the cell wall of the green alga, *Penium margaritaceum*. *J Exp Bot.* **65**: 465-479.
- Dostál, V., Libusová, L. (2014): Microtubule drugs: action, selectivity, and resistance across the kingdoms of life. *Protoplasma.* **251**: 991-1005.
- Downing, K.H., Nogales E. (1998): Tubulin and microtubule structure. *Curr Opin Cell Biol.* **10**: 16-22.
- Dumontet, C., Jordan, M.A. (2010): Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* **9**: 790–803.
- Ehtesham, N.Z., Phan, T.N., Gaikwad, A., Sopory, S.K., Tuteja, N. (1999): Calnexin from *Pisum sativum*: cloning of the cDNA and characterization of the encoded protein. *DNA Cell Biol.* **18**: 853–862.
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D., Basra, S. M. A. (2009): Plant drought stress: effects, mechanisms and management. In *Sustainable Agriculture* (pp. 153-188). Springer Netherlands.
- Finkel, T., Holbrook, N. J. (2000): Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature.* **408**: 239-47.
- Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J. H., Mylona, P., Miedema, H., Torres, M. A., Dolan, L. (2003): Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature.* **422**: 442-446.
- Foyer, C.H., Noctor G. (2005): Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell.* **17**: 1866-75.
- Foyer, C.H., Noctor, G. (2009): Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxid Redox Signal.* **11**: 861–905.
- Foyer, C.H., Bloom, A.J., Queval, G., Noctor G. (2009): Photorespiratory metabolism: genes, mutants, energetics, and redox signaling. *Ann Rev Plant Biol.* **60**: 455–484.

- Furuyama, T., Dzelzkalns, V.A. (1999): A novel calcium-binding protein is expressed in Brassica pistils and anthers late in flower development. *Plant Mol Biol.* **39**: 729-37.
- Gardai, S.J., McPhillips, K.A., Frasc, S.C., Janssen, W.J., Starefeldt, A., Murphy-Ullrich, J.E., Furch, A.C., Hafke, J.B., Schulz, A., van Bel, A.J. (2007): Ca²⁺-mediated remote control of reversible sieve tube occlusion in *Vicia faba*. *J Exp Bot.* **58**: 2827–2838.
- Gerke, V., Creutz, C.E., Moss, S.E. (2005): Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **6**: 449-461.
- Gerke, V., Moss, S.E. (2002): Annexins: from structure to function. *Physiol Rev.* **82**: 331-71.
- Gidrol, X., Sabelli, P.A., Fern, Y.S., Kush, A.K. (1996): Annexin like protein from Arabidopsis thaliana rescues ΔoxyR mutant of *Escherichia coli* from H₂O₂ stress. *Proc Natl Acad Sci USA.* **93**: 11268–11273.
- Goddard, R. H., Wick S. M., Silflow C. D., Snustad D. P. (1994): Microtubule Components of the Plant Cell Cytoskeleton. *Plant Physiol.* **104**: 1-6.
- Górecka, K.M., Konopka-Postupolska, D., Hennig, J., Buchet, R., Pikula, S. (2005): Peroxidase activity of AnnAt1 from *Arabidopsis thaliana*. *Biochem Biophys Res Commun.* **336**: 868-75.
- Grant, J.J., Yun, B-W., Loake, G.J. (2000): Oxidative burst and cognate redox signalling reported by luciferase imaging: identification of a signal network that functions independently of ethylene, SA and Me-JA but is dependent on MAPKK activity. *Plant J.* **24**: 569–582.
- Guelette, B.S., Benning, U.F., Hoffmann-Benning, S. (2012): Identification of lipids and lipid-binding proteins in phloem exudates from Arabidopsis thaliana. *J Exp Bot.* **63**: 3603–3616.
- Gupta, G.S. (2012): Annexins (Lipocortins). In *Animal Lectins: Form, Function and Clinical Applications* (pp. 455-470). Springer Vienna.
- Harmon, A.C., Gribskov, M., Gubrium, E., Harper, J.F. (2001): The CDPK superfamily of protein kinases. *New Phytol.* **151**: 175–183.
- Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., Zhu, J. K., Bohnert, H. J. (2000): Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Ann Rev Plant Biol.* **51**: 463-499.
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.K., Bohnert, H.J. (2000): Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol.* **51**: 463–99.
- Hayes, M.J., Rescher, U., Gerke, V., Moss, S.E. (2004): Annexin–actin interactions. *Traffic.* **5**: 571-576.
- Henty-Ridilla, J.L., Li, J., Blanchoin, L., Staiger, C.J. (2013): Actin dynamics in the cortical array of plant cells. *Curr Opin Plant Biol.* **16**: 678-687.
- Hernandez, J.A., Campillo, A., Jiménez, A., Alarcón, J.J., Sevilla, F. (1999): Response of antioxidant systems and leaf water relations to NaCl stress in pea plants. *New Phytol.* **141**: 241-251.
- Hofmann, A. (2004): Annexins in the plant kingdom: perspectives and potentials. *Annexins.* **1**: 51–61.
- Hofmann, A., Benz, J., Liemann, S., Huber, R. (1997): Voltage dependent binding of annexin V, annexin VI and annexin VII-core to acidic phospholipid membranes. *Biochim Biophys Acta Biomembranes.* **1330**: 254-264.
- Hofmann, A., Delmer, D.P., Wlodawer, A. (2003): The crystal structure of annexin Gh1 from *Gossypium hirsutum* reveals an unusual S3 cluster — implication for cellulose synthase complex formation and oxidative stress response. *Eur J Biochem.* **270**: 2557–2564.
- Hofmann, A., Proust, J., Dorowski, A., Schantz, R., Huber, R. (2000): Annexin 24 from *Capsicum annuum* — X-ray structure and biochemical characterization. *J Biol Chem.* **275**: 8072–8082.
- Horie, T., Schroeder, J.I. (2004): Sodium transporters in plants. Diverse genes and physiological functions. *Plant Physiol.* **136**: 2457–2462.

- Hoshino, D., Hayashi, A., Temmei, Y., Kanzawa, N., Tsuchiya, T. (2004): Biochemical and immunohistochemical characterization of Mimosa annexin. *Planta*. **219**: 867-875.
- Hu, J., Wu, X., Yuan, S., Qian, D., Nan, Q., An, L., Xiang, Y. (2014): Annexin5 Plays a Vital Role in Arabidopsis Pollen Development via Ca²⁺-Dependent Membrane Trafficking. *PLoS one*. **9**: 102-407.
- Hu, N.J., Yusof, A.M., Winter, A., Osman, A., Reeve, A.K., Hofmann, A. (2008): The crystal structure of calcium-bound annexin Gh1 from Gossypium hirsutum and its implications for membrane binding mechanisms of plant annexins. *J Biol Chem*. **283**: 18314-18322.
- Hu, S., Brady, S. R., Kovar, D. R., Staiger, C. J., Clark, G. B., Roux, S. J., Muday, G. K. (2000): Identification of plant actin-binding proteins by F-actin affinity chromatography. *Plant J*. **24**: 127-137.
- Huang, Y., Wang, J., Zhang, L., Zuo, K. (2013): A cotton annexin protein AnxGb6 regulates fiber elongation through its interaction with actin 1. *PLoS ONE*. **8**: e66160.
- Chartzoulakis, K., Klapaki G. (2000): Response of two greenhouse pepper hybrids to NaCl salinity during different growth stages. *Sci Hortic*. **86**: 247-260.
- Chaves, M.M., Pereira, J.S., Maroco, J., Rodrigues, M.L., Ricardo, C.P.P., Osorio, M.L., Carvalho, I., Faria, T., Pinheiro, C. (2002): How plants cope with water stress in the field? Photosynthesis and growth. *Ann Bot*. **89**: 907–916.
- Cheng, S.H., Willmann, M.R., Chen, H.C., Sheen, J. (2002): Calcium signaling through protein kinases. The *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase gene family. *Plant Physiol*. **129**: 469–485.
- Chung, J.-S., Zhu, J.-K., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., Shi, H. (2008): Reactive oxygen species mediate Na⁺-induced *SOS1* mRNA stability in Arabidopsis. *Plant J*. **53**: 554–565.
- Ingram, J., Bartels, D. (1996): The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol.* **47**: 377–403.
- Iyengar, E.R.R., Reddy, M.P. (1996): Photosynthesis in high salt tolerant plants. In: Pesserkali, M. (Ed.). *Hand Book of Photosynthesis. Marshal Dekker. Baten Rose, USA*. pp. 56-65.
- Jami, S.K., Clark, G.B., Ayele, B.T., Ashe, P., Kirti, P.B. (2012): Genome-wide comparative analysis of annexin superfamily in plants. *PLoS one*. **7**: e47801.
- Jänicke, R. U., Porter, A. G., Kush, A. (1998): A novel Arabidopsis thaliana protein protects tumor cells from tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. **1402**: 70-78.
- Jeong, J.C., Shin, D., Lee, J., Kang, C.H., Baek, D., Cho, M.J., Kim, M.C., Yun, D.J. (2007): Isolation and characterization of a novel calcium/calmodulin-dependent protein kinase, AtCK, from Arabidopsis. *Mol Cells*. **24**: 276 – 282
- Jordan, M.A., Thrower, D., Wilson, L. (1992): Effects of vinblastine, podophyllotoxin and nocodazole on mitotic spindles. Implications for the role of microtubule dynamics in mitosis. *J Cell Sci*. **102**: 401–416.
- Kaplan, B., Davydov, O., Knight, H., Galon, Y., Knight, M.R., Fluhr, R., Fromm, H. (2006): Rapid transcriptome changes induced by cytosolic Ca²⁺ transients reveal ABRE-related sequences as Ca²⁺-responsive *cis* elements in Arabidopsis. *Plant Cell*. **18**: 2733–2748.
- Khan, M.A. (1999): Comparative influence of salinity and temperature on the germination of subtropical halophytes. In: *Halophyte uses in different climates I: ecological and ecophysiological studies: proceedings of the 3rd seminar of the EU Concerted Action Group IC 18CT 96-0055, Florence, Italy, 20 July, 1998 (Vol. 1, p. 77)*. Backhuys Publishers.
- Kiegle, E., Moore, C. A., Haseloff, J., Tester, M. A., Knight, M. R. (2000): Cell-type-specific calcium responses to drought, salt and cold in the *Arabidopsis* root. *Plant J*. **23**: 267–278.
- Kim, C.S., Liu, J., Ishitani, M., Halfter, U., Zhu, J.K. (2000): The Arabidopsis thaliana SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA*. **97**: 3735-3740.

- Knight, H. (2000): Calcium signalling during abiotic stress in plants. *Int Rev Cytol.* **195**: 269-325.
- Knoblauch, M., Peters, W.S., Ehlers, K., Van Bel, A.J.E. (2001): Reversible calcium-regulated stopcocks in legume sieve tubes. *Plant Cell.* **13**: 1221–1230.
- Kodavali, P.K., Skowronek, K., Koszela-Piotrowska, I., Strzelecka-Kiliszek, A., Pawlowski, K., Pikula, S. (2013): Structural and functional characterization of annexin 1 from *Medicago truncatula*. *Plant Physiol Biochem.* **73**: 56-62.
- Kolukisaoglu, U., Weinl, S., Blazevic, D., Batistic, O., Kudla, J. (2004): Calcium sensors and their interacting protein kinases: genomics of the *Arabidopsis* and rice CBL–CIPK signaling networks. *Plant Physiol.* **134**: 43–58.
- Komis, G., Luptovčiak, I., Doskočilová, A., Šamaj, J. (2015): Biotechnological aspects of cytoskeletal regulation in plants. *Biotechnol Adv.* doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.03.008.
- König, J., Horling, F., Lamkemeyer, P., Finkemeier, I., Kandlbinder, A., Baier, M., Dietz, K.J. (2003): Divergent light-, ascorbate-, and oxidative stress-dependent regulation of expression of the peroxiredoxin gene family in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **131**: 317-25.
- Konopka-Postupolska, D. (2007): Annexins: putative linkers in dynamic membrane cytoskeleton interactions in plant cells. *Protoplasma.* **230**: 203-215.
- Konopka-Postupolska, D., Clark, G., Goch, G., Debski, J., Floras, K., Cantero, A., Fijolek, B., Roux, S., Hennig, J. (2009): The role of annexin 1 in drought stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **150**: 1394-1410.
- Konopka-Postupolska, D., Clark, G., Hofmann, A. (2011): Structure, function and membrane interactions of plant annexins: An update. *Plant Science.* **181**: 230–241.
- Koornneef, M., Meinke, D. (2010): The development of *Arabidopsis* as a model plant. *Plant J.* **61**: 909-921.
- Kost, B., Mathur, J., Chua, N. H. (1999): Cytoskeleton in plant development. *Curr Opin Plant Biol.* **2**: 462-70.
- Kourie, J.I., Wood, H.B. (2000): Biophysical and molecular properties of annexin-formed channels. *Prog Biophys Mol Biol.* **73**: 91-134.
- Kovtun, Y., Chiu, W. L., Tena, G., Sheen, J. (2000): Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc Natl Acad Sci USA.* **87**: 2940-2945.
- Kush, A., Sabapathy, K. (2001): Oxy5, a novel protein from *Arabidopsis thaliana*, protects mammalian cells from oxidative stress. *Int J Biochem Cell Biol.* **33**: 591-602.
- Lambert, A. M. (1993): Microtubule-organizing centers in higher plants. *Curr Opin Cell Biol.* **5**: 116-22.
- Langhans, M., Niemes, S., Pimpl, P., Robinson, D.G. (2009): Oryzalin bodies: in addition to its anti-microtubule properties, the dinitroaniline herbicide oryzalin causes nodulation of the endoplasmic reticulum. *Protoplasma.* **236**: 73-84.
- Laohavisit, A., Brown, A.T., Cicuta, P., Davies, J.M. (2010): Annexins: Components of the calcium and reactive oxygen signaling network. *Plant Physiol.* **152**: 1824–1829.
- Laohavisit, A., Davies, J. M. (2011): Annexins. *New Phytologist.* **189**: 40–53.
- Laohavisit, A., Mortimer, J.C., Demidchik, V., Coxon, K.M., Stancombe, M.A., Macpherson, N., Brownlee, C., Hofmann, A., Webb, A.A.R., Miedema, H., Battey, N.H., Davies, J.M. (2009): *Zea mays* annexins modulate cytosolic free Ca²⁺ and generate a Ca²⁺-permeable conductance. *Plant Cell.* **21**: 479–493.
- Laohavisit, A., Shang, Z., Rubio, L., Cuin, T.A., Véry, A.A., Wang, A., Mortimer, J.C., Macpherson, N., Coxon, K.M., Battey, N.H., Brownlee, C., Park, O.K., Sentenac, H., Shabala, S., Webb, A.A., Davies, J.M. (2012): *Arabidopsis* annexin1 mediates the radical-activated plasma membrane Ca²⁺- and K⁺-permeable conductance in root cells. *Plant Cell.* **24**: 1522-1533.

- Lascano, H.R., Melchiorre, M.N., Luna, C.M., Trippi, V.S. (2003): Effect of photooxidative stress induce by paraquat in two wheat cultivars with differential tolerance to water stress. *Plant Science*. **164**: 841-846.
- Lee, S., Lee, E.J., Yang, E.J., Lee, J.E., Park, A.R., Song, W.H., Park, O.K. (2004): Proteomic identification of annexins, calcium- dependent membrane binding proteins that mediate osmotic stress and abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. **16**: 1378–1391.
- Lefèvre, J., Chernov, K.G., Joshi, V., Delga, S., Toma, F., Pastré, D., Curmi, P.A., Savarin, P. (2011): The C terminus of tubulin, a versatile partner for cationic molecules: binding of Tau, polyamines, and calcium. *J Biol Chem*. **286**: 3065–3078.
- Levine, A., Pennell, R., Palmer, R., Lamb, C.J. (1996): Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive response. *Curr Biol*. **6**: 427–437.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., Lamb, C.J. (1994): H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*. **79**: 583–593.
- Little, M., Seehaus T. (1988): Comparativ analysis of tubulin sequences. *Comp Biochem Physiol B*. **90**: 655-70.
- Liu, H.T., Li, G.L., Chang, H., Sun, D.Y., Zhou, R.G., Li, B. (2007): Calmodulin-binding protein phosphatase PP7 is involved in thermotolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ*. **30**: 156–64.
- Liu, J., Zhu, J.K. (1998): A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance. *Science*. **280**: 1943–45.
- Lizarbe, M.A., Barrasa, J.I., Olmo, N., Gavilanes, F., Turnay, J. (2013): Annexin-phospholipid interactions. Functional implications. *Int J Mol Sci*. **14**: 2652-2683.
- Luan, S., Kudla, J., Rodríguez-Concepción, M., Yalovsky, S., Grisse, W. (2002): Calmodulins and calcineurin B-like proteins: calcium sensors for specific signal response coupling in plants. *Plant Cell*. **14**: 389–400.
- Luis, A., Sandalio, L. M., Corpas, F. J., Palma, J. M., Barroso, J. B. (2006): Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiol*. **141**: 330-335.
- Mahajan, S., Tuteja, N. (2005): Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Arch Biochem Biophys*. **444**: 139 – 158.
- Mahajan, S., Pandey, G.K., Tuteja, N. (2008): Calcium- and salt-stress signaling in plants: Shedding light on SOS pathway. *Arch Biochem Biophys*. **471**: 146–158.
- Mahajan, S., Sopoy, S.K., Tuteja, N. (2006): CBL–CIPK paradigm: role in calcium and stress signaling in plants. *Proc Indian Natl Sci Acad USA*. **72**: 63–78.
- Mano, S., Hayashi, M., Nishimura, M. (1999): Light regulates alternative splicing of hydroxypyruvate reductase in pumpkin. *Plant Journal*. **17**: 309-320.
- Martínez-Noël, G., Tognetti, J., Nagaraj, V., Wiemken, A., Pontis, H. (2006): Calcium is essential for fructan synthesis induction mediated by sucrose in wheat. *Planta*. **225**: 183-191.
- Meinke, D.W., Rhee, S.Y., Weng, S., Flanders, D., Cherry, J.M., Dean, C., Lister, C., Anderson, M., Koornneef, M., Nickle, T., Smith, K., Rounsley, S. D. (1998): Genome maps 9. *Arabidopsis thaliana*. Wall chart. *Science* **282**: 663-667.
- Meloni, D.A., Oliva, M.A., Ruiz, H.A., Martinez, C.A. (2001): Contribution of proline and inorganic solutes to osmotic adjustment in cotton under salt stress. *J Plant Nutr*. **24**: 599-612.
- Mittler, R., Herr, E.H., Orvar, B.L., Van Camp, W., Willekens, H., Inzé, D., Ellis, B.E. (1999): Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates are hyperresponsive to pathogen infection. *Proc Natl Acad Sci USA*. **96**: 14165-14170.

- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V.B., Vandepoele, K., Gollery, M., Shulaev, V., Van, B.F. (2011): ROS signaling: the new wave? *Trends Plant Sci.* **16**: 300-309.
- Molassiotis, A., Fotopoulos, V. (2011): Oxidative and nitrosative signaling in plants: two branches in the same tree? *Plant Signal Behav.* **6**: 210-214.
- Monastyrskaya, K., Babiyshuk, E.B., Draeger, A. (2009): The annexins: spatial and temporal coordination of signaling events during cellular stress. *Cell Molec Life Sci.* **66**: 2623-42.
- Morimyo, M., Hongo, E., Hama-Inaba, H., Machida, I. (1992): Cloning and characterization of the *mvrC* gene of *Escherichia coli* K-12 which confers resistance against methyl viologen toxicity. *Nucleic Acid Res.* **20**: 3159-3165.
- Mortimer, J.C., Laohavisit, A., Macpherson, N., Webb, A., Brownlee, C., Battey, N.H., Davies, J.M. (2008): Annexins: multifunctional components of growth and adaptation. *J Expt Bot.* **59**: 533-54.
- Moss, S.E., Morgan, R.O. (2004): The annexins. *Genome Biol.* **5**: 219.
- Munns, R., Tester M. (2008): Mechanisms of salinity tolerance. *Annu Rev Plant Biol.* **59**: 651-81.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum.* **15**: 473-497.
- Nakamura, H. (2005): Thioredoxin and its related molecules: update 2005. *Antioxid Redox Signal.* **7**: 823-828.
- Napier, R.M., Trueman, S., Henderson, J., Boyce, J.M., Hawes, C., Fricker, M.D., Venis, M.A. (1995): Purification, sequencing and functions of calreticulin from maize. *J Exp Bot.* **46**: 1603-1613.
- Noctor, G., De Paepe, R., Foyer, C. H. (2007): Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants. *Trends Plant Sci.* **12**:125-34.
- Nogales, E. (2000): Structural insights into microtubule function. *Ann Rev Biochem.* **69**: 277-302.
- Noll, G.A., Fontanellaz, M.E., Rüping, B., Ashoub, A., van Bel, A.J., Fischer, R., Knoblauch, M., Prüfer, D. (2007): Spatial and temporal regulation of the forisome gene *for1* in the phloem during plant development. *Plant Mol Biol.* **65**: 285-294.
- Obata, T., Matthes, A., Koszior, S., Lehmann, M., Araujo, W.L., Bock, R., Sweetlove, L.J., Fernie, A.R. (2011): Alteration of mitochondrial protein complexes in relation to metabolic regulation under short-term oxidative stress in *Arabidopsis* seedlings. *Phytochemistry.* **72**: 1081-1091.
- Opas, M., Szewczenko-Pawlikowski, M., Jass, G.H., Mesaeli, N., Michalak, M. (1996): Calreticulin modulates cellular adhesiveness via regulation of expression of vinculin. *J Cell Biol.* **135**: 1-11.
- Parida, A.K., Das, A.B., Mitra, B. (2004): Effects of salt on growth, ion accumulation photosynthesis and leaf anatomy of the mangrove, *Bruguiera parviflora*. *Trees Struct Funct.* **18**: 167-174.
- Pfannschmidt, T., Brautigam, K., Wagner, R., Dietzel, L., Schroter, Y., Steiner, S., Nykytenko, A. (2009): Potential regulation of gene expression in photosynthetic cells by redox and energy state: approaches towards better understanding. *Ann Bot.* **103**: 599-607.
- Pickett-Heaps, A.J.D., Gunning, B.E.S., Brown, R.C. (1999): The cytoplasmic concept in dividing plant cells: cytoplasmic domains and the evolution of spatially organized cell division. *Am J Bot.* **86**: 153-172.
- Pinheiro, C., Chaves, M.M. (2011): Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data? *J Exp Bot.* **62**: 869-882.
- Plieth, C., Hansen, U.P., Knight, H., Knight, M.R. (1999): Temperature sensing by plants: the primary characteristics of signal perception and calcium response. *Plant J.* **18**: 491-497.

- Proust, J., Houlne, G., Schantz, M.L., Shen, W.H., Schantz, R. (1999): Regulation of biosynthesis and cellular localization of Sp32 annexins in tobacco BY2 cells. *Plant Mol Biol.* **39**: 361–372.
- Renew, S., Heyno, E., Schopfer, P., Liskay, A. (2005): Sensitive detection and localization of hydroxyl radical production in cucumber roots and Arabidopsis seedlings by spin trapping electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Plant J.* **44**: 342–347.
- Rhee, H. J., Kim, G. Y., Huh, J. W., Kim, S. W., Na, D. S. (2000): Annexin I is a stress protein induced by heat, oxidative stress and a sulfhydryl-reactive agent. *Eur J Biochem.* **267**: 3220–3225.
- Richards, S. L., Laohavisit, A., Mortimer, J. C., Shabala, L., Swarbreck, S. M., Shabala, S., Davies, J. M. (2014): Annexin 1 regulates the H₂O₂-induced calcium signature in Arabidopsis thaliana roots. *Plant J.* **77**: 136–145.
- Rodriguez, P.L., Cutler, S.R., Finkelstein, R.R., Abrams, S.R. (2010): Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annu Rev Plant Biol.* **61**: 651–79.
- Romero-Aranda, R., Soria, T., Cuartero, J. (2001): Tomato plant-water uptake and plant-water relationships under saline growth conditions. *Plant Sci.* **160**: 265–272.
- Sagi, M., Fluhr, R. (2006): Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. *Plant Physiol.* **141**: 336–40.
- Samuel, M.A., Miles, G.P., Ellis B.E. (2000): Ozone treatment rapidly activates MAPK signalling in plants. *Plant J.* **22**: 367–376.
- Samuels, A.L., Giddings, T.H., Staehelin, L.A. (1995): Cytokinesis in tobacco BY-2 and root tip cells: a new model of cell plate formation in higher plants. *J Cell Biol.* **130**: 1345–1357.
- Sanders, D., Brownlee, C., Harper, J.F. (1999): Communicating with calcium. *Plant Cell.* **11**: 691–706.
- Sanders, D., Pelloux, J., Brownlee, C., Harper, J.F. (2002): Calcium at the crossroads of signaling. *Plant Cell.* **14**: 401–417.
- Santoni, V., Rouquié, D., Doumas, P., Mansion, M., Boutry, M., Degand, H., Rossignol, M. (1998): Use of a proteome strategy for tagging proteins present at the plasma membrane. *Plant J.* **16**: 633–641.
- Sarwat, M., Tuteja, N. (2007): Calnexin: a versatile calcium binding integral membrane-bound chaperone of endoplasmic reticulum. *Cal Bind Proteins.* **2**: 36–50.
- Seals, D.F., Randall, S.K. (1997): A vacuole-associated annexin protein, VCaB42, correlates with the expansion of Tobacco cells. *Plant Physiol.* **115**: 753–761.
- Seigneurin-Berny, D., Rolland, N., Dorne, A.J., Joyard, J. (2000): Sulfolipid is a potential candidate for annexin binding to the outer surface of chloroplast. *Biochem Biophys Res Commun.* **272**: 519–524.
- Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R.S., Pessarakli, M. (2012): Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J Bot.* Article ID 217037, 26 p.
- Sharma, S.S., Dietz K.J. (2006): The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *J Exp Bot.* **57**: 711–26.
- Shi, H., Ishitani, M., Kim, C., Zhu, J.K. (2000): The Arabidopsis thaliana salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *Proc Natl Acad Sci USA.* **97**: 6896–901.
- Shi, H., Zhu, J. K. (2002): Regulation of expression of the vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene AtNHX1 by salt stress and abscisic acid. *Plant Mol Biol.* **50**: 543–550.
- Skirycz, A., Inze, D. (2010): More from less: plant growth under limited water. *Curr Opin Biotechnol.* **21**: 197–203.
- Slama, I., Abdelly, C., Bouchereau, A., Flowers, T., Savouré, A. (2015): Diversity, distribution and roles of osmoprotective compounds accumulated in halophytes under abiotic stress. *Ann Bot.* **115**: 433–47.

- Smith P.D., Moss S.E. (1994): Structural evolution of the annexin supergene family. *Trends Genet.* **10**: 241–246
- Staelhelin, L.A., Hepler, P.K. (1996): Cytokinesis in higher plants. *Cell.* **84**: 821-824.
- Staiger, C. J. (2000): Signaling to the action cytoskeleton in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* **51**: 257-288.
- Stanton, R. A., Gernert, K. M., Nettles, J. H., Aneja, R. (2011): Drugs that target dynamic microtubules: a new molecular perspective. *Med Res Rev.* **31**: 443-481.
- Stierle, A., Strobel, G., Stierle, D. (1993): Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science.* **260**: 214-6.
- Swarbreck, S.M., Colaço, R., Davies, J.M. (2013): Update on plant calcium-permeable channels. *Plant Physiol.* **163**: 1514–1522.
- Šamaj, J., Müller, J., Beck, M., Bohm, N., Menzel, D. (2006): Vesicular trafficking, cytoskeleton and signalling in root hairs and pollen tubes. *Trends Plant Sci.* **11**: 594–600.
- Šamajová, O., Plíhal, O., Al-Yousif, M., Hirt, H., Šamaj, J. (2013): Improvement of stress tolerance in plants by genetic manipulation of mitogen-activated protein kinases. *Biotechnol Adv.* **31**: 118-28.
- Šamajová, O., Komis, G., Šamaj, J. (2014): Immunofluorescent localization of MAPKs and colocalization with microtubules in Arabidopsis seedling whole-mount probes. *Methods Mol Biol.* **1171**: 107-115.
- Takahashi, S., Seki, M., Ishida, J., Satou, M., Sakurai, T., Narusaka, M., Kamiya, A., Nakajima, M., Enju, A., Akiyama, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (2004): Monitoring the expression profiles of genes induced by hyperosmotic, high salinity, and oxidative stress and abscisic acid treatment in Arabidopsis cell culture using a full-length cDNA microarray. *Plant Mol Biol.* **56**: 29-55.
- Takemoto, D., Hardham, A. R. (2004): The cytoskeleton as a regulator and target of biotic interactions in plants. *Plant Physiol.* **136**: 3864-76.
- Talukdar, T., Gorecka, K.M., de Carvalho-Niebel, F., Downie, J.A., Cullimore, J., Pikula, S. (2009): Annexins-calcium-and membrane-binding proteins in the plant kingdom. *Acta Biochim Pol.* **56**: 199-210.
- Tattersall, E.A., Grimplet, J., Deluc, L., Wheatley, M.D., Vincent, D., Osborne, C., Ergul, A., Lomen, E., Blank, R.R., Schlauch, K.A., Cushman, J.C., Cramer, G.R. (2007): Transcript abundance profiles reveal larger and more complex responses of grapevine to chilling compared to osmotic and salinity stress. *Funct Integr Genomics.* **7**: 317-333.
- Tenhaken, R., Levine, A., Brisson, L.F., Dixon, R.A., Lamb, C. (1995): Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. *Proc Natl Acad Sci USA.* **92**: 4158-4163.
- Thonat, C., Mathieu, C., Crevecoeur, M., Penel, C., Gaspar, T., Boyer, N. (1997): Effects of a mechanical stimulation on localization of annexin-like proteins in *Bryonia dioica* internodes. *Plant Physiol.* **114**: 981-988.
- Tracy, F.E., Gilliam, M., Dodd, A.N., Webb, A.A.R., Tester M. (2008): NaCl-induced changes in cytosolic free Ca²⁺ in Arabidopsis thaliana are heterogeneous and modified by external ionic composition. *Plant Cell Environ.* **31**: 1063–1073.
- Tracy, F.E., Gilliam, M., Dodd, A.N., Webb, A.A.R., Tester, M. (2008): Cytosolic free Ca²⁺ in Arabidopsis thaliana are heterogeneous and modified by external ionic composition. *Plant Cell Environl.* **31**: 1063-73.
- Tuteja, N. (2009): Integrated calcium signaling in plants. *Signaling in Plants.* 29-49. Springer Berlin Heidelberg.
- Tuteja, N., Mahajan, S. (2007): Calcium signaling network in plants: an overview. *Plant Signal Behav.* **2**: 79-85.

- Tzima, E., Trotter, P.J., Orchard, M.A., Walker, J.H. (2000): Annexin V relocates to the platelet cytoskeleton upon activation and binds to a specific isoform of actin. *Eur J Biochem.* **267**: 4720–4730.
- Ulm, R., Ichimura, K., Mizoguchi, T., Peck, S.C., Zhu, T., Wang, X., Shinozaki, K., Paszkowski, J. (2002): Distinct regulation of salinity and genotoxic stress responses by Arabidopsis MAP kinase phosphatase 1. *EMBO J.* **21**: 6483-6493.
- Wang, X. (2001): Plant phospholipases. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* **52**: 211–231.
- Wang, X. (2005): Regulatory functions of phospholipase D and phosphatidic acid in plant growth, development, and stress responses. *Plant Physiol.* **139**: 566-573.
- Wang, Y., Nil, N. (2000): Changes in chlorophyll, ribulose biphosphate carboxylase-oxygenase, glycinebetain content, photosynthesis and transpiration in Amaranthus tricolor leaves during salt stress. *J Hortic Sci Biotechnol.* **75**: 623-627.
- Ward, J.M., Mäser, P., Schroeder, JI. (2009): Plant ion channels: gene families, physiology, and functional genomics analyses. *Ann Rev Physiol.* **71**: 59–82.
- Wasteneys, G. O., Galway, M. E. (2003): Remodeling the cytoskeleton for growth and form: an overview with some new views. *Annu Rev Plant Biol.* **54**: 691-722.
- Wasteneys, G.O., Ambrose, J.C. (2009): Spatial organization of plant cortical microtubules: close encounters of the 2D kind. *Trends Cell Biol.* **19**: 62-71.
- Wilkinson, S., Davies, W. J. (2010): Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community. *Plant Cell Environ.* **33**: 510-525.
- Wu, S.J., Lei, D., Zhu, J.K. (1996): SOS1, a genetic locus essential for salt tolerance and potassium acquisition. *Plant Cell.* **8**: 617–27.
- Wu, Y., Kuzma, J., Marechal, E., Graeff, R., Lee, H.C. (1997): Abscisic acid signaling through cyclic ADP-ribose in plants. *Science.* **278**: 2126–30.
- Xiong, L., Schumaker, K. S., Zhu, J.K. (2002): Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *The Plant Cell Online.* **14**: 165-S183.
- Xiong, L., Zhu, J.K. (2001): Abiotic stress signal transduction in plants: molecular and genetic perspectives. *Physiol Plant.* **112**:152–66.
- Xiong, L., Zhu, J-K. (2002): Salt stress. *The Arabidopsis book* **1**: e0048. doi:10.1199/tab.0048.
- Yerushalmi, H., Lebendiker, M., Shuldiner, S. (1995): EmrE, an Escherichia coli 12-kDa multidrug transporter, exchanges toxic cations and H⁺ and is soluble in organic solvents. *J Biol Chem.* **270**: 6856–6863.
- Zhang, F., Li, S., Yang, S., Wang, L., Guo, W. (2015): Overexpression of a cotton annexin gene, GhAnn1, enhances drought and salt stress tolerance in transgenic cotton. *Plant Mol Biol.* **87**: 47-67.
- Zhang, L., Lu, Y.T. (2003): Calmodulin-binding protein kinases in plants. *Trends Plant Sci.* **8**: 123–127.
- Zhu, J.K. (2000): Genetic analysis of plant salt tolerance using Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol.* **124**: 941–48.
- Zhu, J.K. (2001): Cell signaling under salt, water and cold stresses. *Curr Opin Plant Biol.* **4**: 401–6.
- Zhu, J.K. (2003): Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Curr Opin Plant Biol.* **6**: 441-445.
- Zhu, J.-K., Hasegawa, P.M., Bressan, R. A. (1997): Molecular aspects of osmotic stresses in plants. *Crit Rev Plant Sci.* **16**: 253-277.
- Żwawiak, J., Zaprutko, L. (2014): A brief history of taxol. *J Med Sci.* **1**: 47.

9. Zoznam použitých skratiek

<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ABA	kyselina abscisová
Ann1	annexín 1
Ann1-GFP	transgénna línia exprimujúca s GFP značený annexín 1 pod vlastným promótorom
AnnAt1-8	annexíny 1-8 u <i>Arabidopsis</i>
Anx1Mt1	annexín 1 z <i>Medicago trunculata</i>
ANXA ₁₋₁₃	annexíny 1-13 u stavovcov
Asp	kyselina asparagová
AtCP1	<i>Arabidopsis</i> capping protein/uzatvárací proteín u <i>Arabidopsis</i>
ATHK1	<i>Arabidopsis</i> receptor histidine kinases/receptorové histidín kinázy u <i>Arabidopsis</i>
ATP	adenosintrifosfát
BSA	hovädzí sérový albumín
Ca ²⁺	vápenatý kation
CaBP-22	calcium binding protein/Ca ²⁺ -viažuci proteín
cADPR	cyclic adenosine diphosphate ribose/cyklická adenosindifosfát ribóza
CaM	kalmodulin
CaMK	CaM-dependent protein kinases/na CaM-závislé proteín kinázy
CCaMK	Ca ²⁺ /CaM-dependent protein kinases/Ca ²⁺ /CaM-závislé proteín kinázy
CDPK	Ca ²⁺ -dependent protein kinases/na Ca ²⁺ -závislé proteín kinázy
CNGC	cyclic nucleotide-gated channels/cyklické nukleotidové kanály
CNX	kalnexin
Col-0	ekotyp Columbia-0 (divoký typ)
CRK	CDPK-related protein kinases/CDPK-príbuzné proteín kinázy
CRT	kalretikulin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTT	dithiothreitol
EDTA	kyselina etylendiamintetraoctová, chelatačné činidlo
EF-motív	motív helix-slučka-helix
GFP	zelený fluorescenčný proteín
Gly	kyselina glutámová
GST	glutathion S-transferáza
GTP	guanosintrifosfát
H ⁺	vodíkový kation
H ₂ O ₂	peroxid vodíka
HIK33	histidine kinase/histidín kináza
IP3	inozitol-1,4,5-trifosfát

K ⁺	draslíkový katión
KCl	chlorid draselný
MS-médium	Murashige and Skoog medium
MT	mikrotubuly
MTSB	mikrotubuly stabilizačný pufor
NaCl	chlorid sodný
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát
NH ₂	amino skupina
O ₂ ⁻	superoxidový anión
Obr.	obrázok
OH [·]	hydroxylový radikál
PAL	fenylalanin amoniak-lyáza
PBS	fosfátom tlmený soľný roztok
PCP	pistil-expressed Ca ²⁺ -binding protein/Ca ²⁺ -viažuce proteíny exprimované v piestiku
PIPES	piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonová kyselina)
PLD	fosfolipáza D
pMAT	transgéna línia exprimujúca chimérický gén pre cytoplasmatický fúzny proteín s GFP
PP7	serín/treonín fosfatáza
PPB	preprofázny zväzok
PQ	paraquat (1,1-dimetyl-4,4-bipyridium dichlorid)
RNS	reaktívne formy dusíka
ROS	reaktívne formy kyslíka
SIPK/CIPK	SOS3/CBL interacting protein kinases/serín/treonín proteín kinázy
SLN1	osmosensor histidíne kinase/histidín osmosenzorová kináza
SOS	salt overly sensitive/precitlivelý na soľ
Tab.	tabuľka
TEMED	tetrametyletylendiamín
TCH2, 3	produkt génu u <i>A. thaliana</i>
TRIS	pufor, (tris-hydroxymetyl)aminometán
Trp	tryptofán
UV-B	ultrafialové žiarenie B