

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2015

Veronika Kapustová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Fenotypová charakterizace nadexpresní linie
profilinu 2 u *Arabidopsis* v podmínkách
vybraných abiotických stresů**

Bakalářská práce

Veronika Kapustová

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Forma studia: Prezenční

Olomouc 2015

Vedoucí práce: Mgr. Olga Šamajová, Dr.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky a s použitím odborné literatury.

V Olomouci dne

.....

Veronika Kapustová

Souhrn

Rostliny, jako sesilní organismy, jsou neustále vystavovány nepříznivým environmentálním podmínkám a stresovým faktorům. Vyvinuly si však složité mechanismy, které jim umožňují se na tyto nepříznivé podmínky adaptovat.

Teoretická část práce se věnuje základní charakteristice modelové rostliny *Arabidopsis thaliana*, rostlinnému cytoskeletu a aktin vázajícím proteinům – především pak profilinu, všudypřítomnému proteinu, který reguluje dynamiku aktinového cytoskeletu. V neposlední řadě jsou popsány abiotické stresy u rostlin – solný a oxidativní stres.

Jedním z cílů experimentální části bylo sledování vlivů solného, hyperosmotického a oxidativního stresu na klíčení semen a růst rostlin. V experimentech jsou porovnávány různé linie *Arabidopsis thaliana* – divoký typ Col-0, nadexpresní linie exprimující GFP značený profilin 2 pod kontrolou 35S promotoru (PRF2-GFP) a transgenní linie stabilně exprimující chimérický gen pro cytoplazmatický fúzní protein s GFP (pMAT-GFP).

Dalším cílem bylo pozorování vlivu inhibitorů cytoskeletu na buňky rostlin transgenní linie PRF2-GFP *in vivo* podmínkách pomocí konfokální mikroskopie. Pomocí těchto experimentů byla dokázána interakce PRF2 s aktinovým cytoskeletem a mikrotubuly.

Posledním cílem bylo imunocytochemické studium cytoskeletu u transgenní linie PRF2-GFP metodou „whole mount“. V meristematických buňkách kořene byla pozorována buněčná dělení a mitotické struktury a byla prokázána částečná kolokalizace aktinových filament s PRF2-GFP.

Summary

Plants, as sessile organisms, are constantly exposed to unfavourable environmental conditions and stress factors. However, they developed complex mechanisms which allow them to adapt to these unfavourable conditions.

Theoretical part of the thesis is dealing with general characteristics of model plant *Arabidopsis thaliana*, plant cytoskeleton and actin-binding proteins – mainly profilin, an ubiquitous protein which regulates dynamics of actin cytoskeleton. Last but not least, there are described abiotic stresses in plants – salt and oxidative stress.

One of the aims of experimental part was observation of salt, hyperosmotic and oxidative stress effects on seed germination and plant growth. Different lines of *Arabidopsis thaliana* were compared in experiments – wild type Col-0, overexpressing line expressing GFP-tagged profilin 2 under the control of 35S promoter (PRF2-GFP) and transgenic line stably expressing chimeric gene for cytoplasmic fusion protein with GFP (pMAT-GFP).

Another aim was monitoring of cytoskeleton inhibitors effect on transgenic line PRF2-GFP cells in *in vivo* conditions by using confocal microscopy. By these experiments an interaction between PRF2 and actin cytoskeleton and microtubules was proved.

Last aim was imunocytochemical studying of cytoskeleton in transgenic line PRF2-GFP by using „whole mount” method. Cell divisions and mitotic structures in meristematic root cells were observed and partial colocalization of actin filaments and PRF2-GFP was proved.

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala především své školitelce Mgr. Olze Šamajové, Dr. za ochotu, cenné rady, připomínky a zvláště pak věnovaný čas v průběhu celé bakalářské práce. Mé velké díky patří také celému kolektivu z Oddělení buněčné biologie Centra regionu Haná, a to za jejich ochotu kdykoli pomoci a poradit. V neposlední řadě děkuji také prof. RNDr. Jozefu Šamajovi, DrSc. za možnost pracovat na tomto oddělení. Tato práce byla podpořena studentským projektem IGA PŘF2015_015.

Obsah

1 ÚVOD	9
2 CÍLE PRÁCE	10
3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	11
3.1 Huseníček rolní - <i>Arabidopsis thaliana</i>	11
3.2 Cytoskelet rostlin	11
3.2.1 Mikrotubuly	12
3.2.2 Aktinová filamenta – mikrofilamenta	14
3.3 Aktin vázající proteiny	19
3.3.1 Profilin	21
3.4 Abiotický stres u rostlin	26
3.4.1 Solný stres	27
3.4.2 Oxidativní stres	28
4 MATERIÁL A METODIKA	29
4.1 Materiál	29
4.1.1 Biologický materiál	29
4.1.2 Chemikálie	29
4.1.3 Roztoky a média	31
4.1.4 Přístroje	35
4.1.5 Software	35
4.2 Metodika	35
4.2.1 Příprava médií pro kultivaci rostlin <i>in vitro</i>	35
4.2.2 Kultivace rostlin ve stresových podmínkách	36
4.2.2.1 Působení solného a hyperosmotického stresu na růst kořenů rostlin PRF2-GFP	36
4.2.2.2 Působení solného a hyperosmotického stresu na klíčení semen rostlin PRF2-GFP	37
4.2.2.3 Působení solného, hyperosmotického a oxidativního stresu na změny fenotypu rostlin	37
4.2.3 <i>In vivo</i> lokalizace PRF2-GFP v odpovědi na působení inhibitorů cytoskeletu	37
4.2.4 Imunolokalizace MT a AF pomocí metody „whole mount“	38
5 VÝSLEDKY	40
5.1 Fenotypová charakterizace transgenní linie PRF2-GFP	40
5.1.1 Vliv solného a hyperosmotického stresu na růst kořenů	40
5.1.2 Vliv solného a hyperosmotického stresu na klíčení semen	43
5.1.3 Vliv solného, hyperosmotického a oxidativního stresu na změny fenotypu rostlin	47

5.2	<i>In vivo</i> lokalizace PRF2-GFP v odpovědi na působení inhibitorů cytoskeletu	51
5.2.1	Lokalizace PRF2-GFP v buňkách <i>A. thaliana</i> v kontrolních podmínkách	51
5.2.2	Vliv inhibitorů cytoskeletu na buňky <i>A. thaliana</i>	51
5.3	Imunocytochemické studium cytoskeletu u transgenní linie PRF2-GFP metodou „whole mount“	59
6	DISKUZE	61
7	ZÁVĚR	64
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	65
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	72

1 Úvod

Rostliny, jako sesilní organismy, si vyvinuly složité biochemické a molekulárně-genetické mechanismy, které jim umožňují rychle zachytávat a přenášet signály z vnějšího prostředí a spouštět různé obranné mechanismy. Tak se rostliny nepřetržitě přizpůsobují rychle se měnícím okolním podmínkám. Aktinový cytoskelet je důležitou složkou odpovědi buněk na abiotické podněty (Henty-Ridilla *et al.*, 2013). Aktin se přímo účastní signalingu při stresu suchem a reakce na chlad a gravitaci (Meagher *et al.*, 2011). Profiliny jsou malé multifunkční aktin vázající proteiny o molekulové hmotnosti 12 – 14 kDa (Kandasamy *et al.*, 2002b). Potlačují nukleaci aktinových filament (AF) a blokují připojování podjednotek na (-) konec, což omezuje růst AF pouze na (+) konec (Henty-Ridilla *et al.*, 2013). Kromě aktinu profiliny také interagují s jinými ligandy, jako například s membránovým fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátem (PIP2), krátkými úseky proteinů bohatými na prolin (PLP – poly-L-prolin) a aktin-asociovanými proteiny 2/3 (ARP 2/3) (Kandasamy *et al.*, 2002b). *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) má starobylou a vysoce divergentní multigenovou rodinu kódující pět odlišných izoform profilinu, které se na základě své tkáňové lokalizace rozdělují do dvou skupin – vegetativní a generativní (Kandasamy *et al.*, 2002b). Profiliny hrají roli při interakci aktinového cytoskeletu s cytoplazmatickou membránou, při umístění organel a při vezikulárním transportu pomocí aktinového cytoskeletu (Sun *et al.*, 2013). Profiliny mají vliv i na růst a vývoj rostlin, mají potenciál pozměňovat architekturu buněk a morfogenezi rostlin (Ramachandran *et al.*, 2000; McKinney *et al.*, 2001, Kandasamy *et al.*, 2002a).

2 Cíle práce

Teoretická část

1. Vypracování literární rešerše se zaměřením na cytoskelet rostlin a odpovědi rostlinných buněk na stres.

Experimentální část

1. Testování optimálních kultivačních podmínek pro pozorování vývoje a růstu rostlin ve stresových podmínkách *in vitro* (solný, hyperosmotický a oxidativní stres).
2. Charakteristika změn fenotypů rostlin kultivovaných ve stresových podmínkách. Kvalitativní a kvantitativní vyhodnocení růstových parametrů.
3. *In vivo* lokalizace profilinu 2 po působení inhibitorů cytoskeletu.
4. Imunolokalizace cytoskeletu metodou „whole mount“.

3 Současný stav řešené problematiky

3.1 Huseníček rolní - *Arabidopsis thaliana*

A. thaliana je dvouděložná kvetoucí rostlina z čeledi *Brassicaceae*. Jedná se o široce rozšířený efemérní druh rostliny s krátkým životním cyklem.

A. thaliana je nejdůležitější modelový organismus pro molekulárně biologický a genetický výzkum v oblasti rostlinné biologie. Ze všech známých druhů kvetoucích rostlin je právě *A. thaliana* druhem nejdůkladněji prostudovaným. Vyznačuje se mnohými výhodnými vlastnostmi, které ho předurčují k tomu být modelovým organismem, používaným pro různé výzkumné činnosti. Mezi tyto vlastnosti patří malý genom, krátká generační doba, produkce velkého množství semen a snadná a předvídatelná mutageneze. Velkým přínosem je i malá velikost, čímž je omezena potřeba velkého prostoru pro růst rostlin (Koornneef *et* Meinke, 2010).

V průběhu evoluce došlo k duplikaci celého genomu *A. thaliana* a k následným ztrátám a zároveň lokálním duplikacím genů. Důležitým bodem rostlinného výzkumu bylo osekvenování genomu *A. thaliana*. Analýza genomové sekvence odhalila, že genom *A. thaliana* je velký 125 Mb a obsahuje 25 498 genů kódujících proteiny (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Pozdější studie prokázala, že tento odhad byl nižší, než je skutečná velikost genomu. S použitím průtokové cytometrie bylo zjištěno, že reálná velikost genomu *A. thaliana* je asi 157 Mb, což je přibližně o 25 % více, než se předpokládalo dříve (Bennett *et al.*, 2003).

3.2 Cytoskelet rostlin

Cytoskelet je propojená síť vláken, která vytváří proteinové lešení buňky. Navzdory svému názvu cytoskelet není neměnná struktura. Je to vysoce dynamický systém, umožňující rychlou adaptivní organizaci, ale i přesto je to systém dobře uspořádaný. Jeho funkce je umožněná neustálou spotřebou energie (Huber *et al.*, 2013).

Cytoskelet vykonává tři základní funkce – prostorově organizuje obsah buňky, fyzicky a biochemicky spojuje buňku s extracelulárním prostředím a vyvolává koordinované síly umožňující pohyb buňky nebo změnu jejího tvaru. Pro dosažení těchto funkcí cytoskelet propojuje aktivity mnoha cytoplazmatických proteinů a organel (Fletcher *et* Mullins, 2010).

Existují tři typy cytoskeletálních filament – AF, mikrotubuly (MT) a intermediální filamenta (Cooper *et* Hausman, 2007). Všechny typy jsou organizovány do sítí, které odolávají deformaci, ale mohou měnit své uspořádání v reakci na nějaké vnější vlivy.

Filamenta hrají důležitou roli v zajišťování a udržování integrity buněčných kompartment (Fletcher *et* Mullins, 2010). Polymerizace a depolymerizace aktinových a MT vláken způsobuje vznik orientovaných sil, které vyvolávají změny tvaru buňky, a řídí organizaci buněčných složek prostřednictvím motorových proteinů (Fletcher *et* Mullins, 2010). Ukázalo se, že transport organel v živočišných buňkách je závislý na MT a jejich motorových proteinech – kinesinu a dyneinu, zatímco v rostlinných buňkách jsou organely transportovány prostřednictvím aktinu a myozinu (Brandizzi *et* Wasteneys, 2013). Struktura cytoskeletálních sítí je kontrolována několika skupinami regulačních proteinů. Mezi tyto proteiny patří nukleaci podporující faktory, které iniciují vytváření filament; krycí proteiny, které zastavují růst filament; polymerázy, které podporují rychlý nebo naopak trvalejší růst filament; depolymerizační a štěpící faktory, které rozkládají filamenta; stabilizující faktory a síťující proteiny, které organizují a zpevňují cytoskeletální sítě (Fletcher *et* Mullins, 2010). Nejdůležitějšími rozdíly mezi třemi základními typy cytoskeletálních vláken jsou jejich mechanická tuhost, polarita, dynamika jejich seskupování a typ motorových proteinů, se kterými asociují (Fletcher *et* Mullins, 2010). V rostlinných buňkách jsou přítomny pouze MT a AF, intermediální filamenta přítomna nejsou, podobně jako u hub (Herrmann *et* Strelkov, 2011). Z tohoto důvodu se budu dále věnovat pouze rostlinným MT a AF.

3.2.1 Mikrotubuly

MT jsou duté valcovité útvary, mající v průměru asi 25 nm, které jsou součástí cytoskeletu eukaryot. Skládají se z heterodimerů α - a β -tubulinu, které se spojují a vytváří protofilamenta (Nogales *et al.*, 1999). Dvanáct až patnáct těchto protofilament se laterálně spojuje a prochází podélně po stěně MT vlákna (Hunter *et* Wordeman, 2000). Důležitým znakem MT je jejich strukturní polarita. Heterodimery α - a β -tubulinu se na sebe skládají pravidelně vždy α -tubulin s β -tubulinem a naopak. Nikdy se na sebe nevážou souhlasné typy tubulinu. Výsledkem tohoto způsobu skládání je, že MT obsahuje (+) a (-) konec, přičemž α -tubulin se nachází na (-) konci a β -tubulin je přítomen na (+) konci MT (Nogales *et al.*, 1999; Wade, 2009).

MT jsou nejtuzší ze všech tří polymerních vláken, a zároveň mají nejkomplexnější dynamiku skládání a rozkládání filament. Během interfáze buněčného cyklu buňky využívají tuhost MT a shromažďují radiální MT, které slouží jako centra a „dráhy“ pro intracelulární dopravu. V průběhu mitózy se MT přeskupují za tvorby dělicího vřeténka, které je nezbytné pro rozdělení sesterských chromatid. Dělicí vřeténko je struktura schopná najít a připojit se na chromozómy, což je umožněno dynamikou jednotlivých MT (Fletcher *et* Mullins, 2010).

MT cytoskelet se vyznačuje takzvanou dynamickou nestabilitou, která mu umožňuje se pohotově reorganizovat. Dynamická nestabilita umožňuje MT vláknům střídat období pomalého růstu a rychlého zkracování (Mitchison *et* Kirschner, 1984). Důležitou roli v regulaci tohoto nerovnovážného stavu má guanosin trifosfát (GTP). Vazebné místo pro GTP mají jak α -, tak β -tubulin. GTP vázaný na β -tubulin je hydrolyzován během, nebo brzy po polymerizaci. Výsledná guanosindifosfát (GDP)-vázající MT síť je nestabilní, upřednostňuje depolymerizaci a způsobuje dynamické chování MT (Müller-Reichert *et al.*, 1998; Cooper *et* Hausman, 2007; Rice *et al.*, 2008).

V eukaryotických buňkách se nacházejí oblasti zvané centrozomy nebo MT organizační centra (MTOC – microtubule organizing center). Na těchto místech přednostně dochází k nukleaci MT, které rostou ven z příslušných center směrem k cytoplazmatické membráně (+) koncem napřed. Na rozdíl od rostlinných buněk se v buňkách obratlovců nachází specifické „organely“, složené z MT – centrioly, které jsou zakotvené v MTOC. (-) konec MT obvykle zůstává připojen k MTOC a vzniklá MT síť je zapojena do vnitrobuněčného transportu (Wade, 2009).

Doposud je známo mnoho proteinů, které interagují s MT, ale nepochybně stále zbývá mnoho dalších, které ještě nebyly objeveny. Mezi tyto proteiny patří především tradiční proteiny asociované s MT (MAPs – microtubule-associated proteins) a motorové proteiny kinesin a dynein (Wade, 2009, Brandizzi *et* Wasteney, 2013). Do polymerizace a depolymerizace MT je zapojeno několik základních MAPs. Nukleace MT začíná z γ -tubulinového komplexu (γ TuC – γ -tubulin complex). Existují dva velikostně rozdílné komplexy γ -tubulinu – malý γ -tubulinový komplex (γ TuSC – γ -tubulin small complex) a kruhový γ -tubulinový komplex (γ TuRC – γ -tubulin ring complex) (Hamada, 2007; Raynaud-Messina *et* Merdes, 2007). MAP200/MOR1 aktivuje dynamickou nestabilitu, a tím reguluje délku MT (Hamada, 2007). Katanin je jediný MAP depolymerizující MT u rostlin, jehož funkcí je štěpit dlouhé MT na kratší nebo oddělovat MT na (-) konci z nukleačních míst (Hamada, 2007; Ehrhardt *et* Shaw, 2006). Další MAPs jsou spojeny s organizací a funkcemi MT sítě. Proteiny z rodiny MAP65 způsobují svazkování MT pomocí příčných můstků. Proteiny vážící se na (+) konec MT (+TIPs) jsou zapojeny do intracelulárního transportu a účastní se vazby MT na jiné buněčné struktury, jako například cytoplazmatickou membránu, Golgiho aparát (GA) a kinetochor (Hamada, 2007). V důsledku své polarizace jsou MT vhodné jako dráhy pro molekulární motory, které se podél MT pohybují, a zprostředkovávají tak transport buněčných organel a vezikul (Fletcher *et* Mullins, 2010). Molekulární motory asociující s MT jsou proteiny patřící do rodin kinesinů a dyneinů. Tyto proteiny využívají

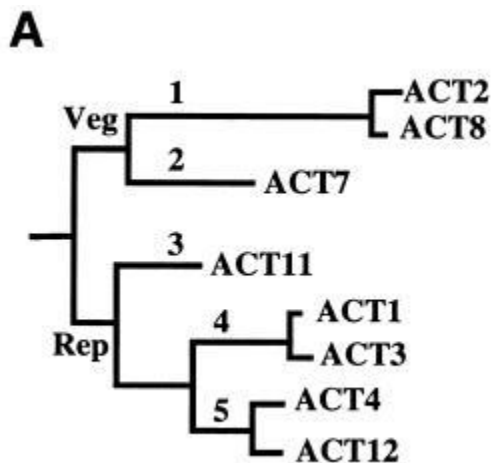
k pohybu energii uvolněnou při hydrolýze adenosintrifosfátu (ATP). Kinesiny slouží především k transportu vezikul a organel v buňkách podél MT (Lee *et al.*, 2004). Kinesiny obsahují motorovou doménu, ve které se nachází ATP-vazebné místo a MT-vazebné oblasti. Běžní zástupci kinesinové rodiny se po MT pohybují směrem k jejich (+) konci (Wade, 2009). Zástupci dyneinů jsou, stejně jako kinesiny, důležití pro přenos organel a vezikul, a navíc jsou zapojeni do organizace dělicího vřeténka, segregace chromozómů a migrace jádra v buňce. Dyneiny mají taktéž motorovou doménu s ATP-vazebným místem, která je zodpovědná za pohyb podél MT. Cytoplazmatické dyneiny se zpravidla pohybují směrem k (-) konci MT (Wade, 2009).

3.2.2 Aktinová filamenta – mikrofilamenta

Aktin je hlavní cytoskeletální protein ve většině buněk. Globulární aktin (G-aktin) je vysoce konzervovaný globulární protein o molekulární hmotnosti 42 kDa, který má na svém povrchu dva hlavní laloky, které jsou rozděleny hlubokým důlkem s nukleotid-vázajícím místem a místem pro vazbu dvouvalentního kationtu. G-aktin polymerizuje za vzniku AF (F-aktin – filamentární aktin), která mají v průměru asi 5 - 7 nm, a jsou tak nejtenčí ze všech cytoskeletálních vláken. Aby došlo ke tvorbě nového AF, musí nejprve tři podjednotky F-aktinu vytvořit jádro, které umožňuje polymerizaci na obou koncích (Cooper *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2014). Aktinové vlákno má helikální strukturu, skládá se ze dvou stočených řetězců tvořených monomery G-aktinu. Molekuly G-aktinu v řetězci směřují stejným směrem podél osy vlákna, což AF uděluje jejich strukturní polaritu, podobně jako u MT (Meagher *et al.*, 2011). Dle odhadů rostlinný pyl obsahuje až 200 μ M aktinu. Avšak pouze 5 – 10 % z celkového množství je ve formě F-aktinu (Gibbon *et al.*, 1999; Snowman *et al.*, 2002). Výsledky jsou k dispozici pouze pro pyl rostlin, pro lepší představu by bylo třeba odhadnout obsah aktinu také v somatických pletivech. Nicméně tato zjištění jsou vcelku překvapující vzhledem k odhadům získaným u savčích buněk. Zde tvoří F-aktin až kolem 50 % celkového obsahu aktinu (Li *et al.*, 2014).

V rostlinných, stejně jako v živočišných buňkách, se neustále zvyšuje počet genů, které kódují jednotlivé složky aktinového cytoskeletu. U krytosemenných rostlin existuje více než 12 genových rodin, kódujících mnoho aktinů a aktin vázajících proteinů (Meagher *et al.*, 2011). V genomu *A. thaliana* je v aktinové genové rodině obsaženo 10 genů pro aktin, z čehož 8 genů kóduje funkční proteiny a 2 jsou pravděpodobně pseudogeny. Podle primární struktury proteinů se aktinová rodina rozděluje do dvou hlavních tříd – vegetativní a reprodukční. U *A. thaliana* je identifikováno 8 izotypů aktinu, které se rozdělují do pěti

podtříd (Obr. 1). Vegetativní třída se skládá ze dvou podtříd. Jedna z nich je jednočlenná – ACT7. Druhá podtřída zahrnuje dva blízce příbuzné izotypy – ACT2 a ACT8. Reproductivní třída sestává ze tří podtříd. Podtřída ACT11 je jednočlenná, zatímco ostatní dvě podtřídy jsou dvoučlenné a skládají se vždy ze dvou podobných izotypů aktinu – ACT1/3 a ACT4/12 (Kandasamy *et al.*, 2002a).



Obr. 1 Izotypy aktinu u *A. thaliana* (převzato z Kandasamy *et al.*, 2002a).

Růst nových mikrofilament je iniciován ze tří míst – v cytoplazmě *de novo*, ze strany jiného AF nebo svazku AF, anebo z konce existujícího AF nebo jeho fragmentu (Staiger *et al.*, 2010). Nukleace ze strany vznikajícího AF přitom obvykle ze všech tří způsobů převažuje (Henty-Ridilla *et al.*, 2013). Aby došlo ke tvorbě AF *de novo*, musí tři podjednotky F-aktinu vytvořit jádro, které umožňuje polymerizaci na obou koncích (Li *et al.*, 2014). Každá podjednotka F-aktinu může vázat ATP nebo ADP (adenosindifosfát). Jak již bylo uvedeno výše, pro AF je typická jejich polarita, kterou jim uděluje specifické uspořádání jednotlivých podjednotek AF, a také rozdíly v počtu ATP-vázajících a ADP-vázajících aktinů (Li *et al.*, 2014). Za rovnovážného stavu *in vitro* ATP-vázající aktin upřednostňuje vazbu na (+) konec AF, zatímco ADP-vázající aktin má tendenci se odpojovat z (-) konce AF. Ihned po připojení podjednotky na (+) konec dochází k hydrolýze ATP za vzniku ADP a fosfátu. Fosfát je následně z molekuly aktinu uvolněn a starší oblasti AF se skládají pouze z ADP-vázajícího aktinu (Li *et al.*, 2014). Další vlastností typickou pro rovnovážný stav aktinu *in vitro* je takzvaný „treadmilling“, pomocí něhož je růst na (+) konci AF vyrovnán zkracováním AF na (-) konci (Li *et al.*, 2014). Obvykle můžeme v kortexu pozorovat pouze jeden rostoucí konec AF v daném čase, ačkoli výjimečně se mohou prodlužovat oba konce (Henty-Ridilla *et al.*, 2013). V souvislosti s polymerizací a depolymerizací AF se uvádí takzvaná kritická

koncentrace (C_c), což je rovnovážná koncentrace volného G-aktinu a AF (Lodish *et al.*, 2003). Obecně platí, že ATP-aktin má nižší C_c než ADP-aktin. Při dosažení kritické koncentrace na konci AF se rychlost připojování aktinových podjednotek k AF rovná rychlosti disociace podjednotek na téže konci. V takovémto případě se tedy nemění délka aktinového vlákna. Ke změnám dochází v případě, že se koncentrace G-aktinu liší od hodnoty C_c . Pokud je koncentrace G-aktinu vyšší, než je hodnota C_c , tak dochází k polymerizaci vláken. Naopak je-li koncentrace G-aktinu nižší než hodnota C_c , tak za takových podmínek dochází k depolymerizaci vláken. AF mají (+) konec charakterizovaný rychlým růstem a nižší C_c . Naopak pro (-) konec AF je typický pomalý růst a vyšší C_c . (Chen *et al.*, 2000). Na rozdíl od dynamické nestability kortikálních MT rostoucí konce AF typicky nepřecházejí do stádia depolymerizace. Navíc depolymerizace AF na nerostoucím konci se objevuje pouze vzácně. Tento fakt je v rozporu s konvenčním modelem „treadmillingu“ popisujícím reorganizaci AF *in vitro*, kdy dochází k trvalému odstraňování aktinových podjednotek na jednom konci AF, zatímco na druhém konci se aktinové podjednotky neustále přidávají. *In vivo* je rozklad AF způsoben jejich účinným štěpením na fragmenty (Staiger *et al.*, 2009). AF jsou pružnější než MT. Avšak vysoké množství proteinů se na mikrofilamenta váže, což vede ke tvorbě vysoce organizovaných struktur zahrnujících větvené sítě či svazky AF, které jsou mnohem pevnější než samostatná vlákna. Svazky mikrofilament jsou důležité pro mezibuněčnou komunikaci, zatímco vysoce větvené sítě AF se podílejí na změnách tvaru buněk (Fletcher *et Mullins*, 2010).

AF jsou důležitou složkou cytoskeletu eukaryot, kde plní několik různých rolí. Aktin má funkci při určování polaritě buněk, buněčném dělení, pohybu organel, vezikulárním transportu a je důležitý pro aktivitu jádra, tvorbu buněčné stěny a prodlužování buněk (Meagher *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2014). Na rozdíl od živočišných buněk ty rostlinné upřednostňují aktinová vlákna před MT jako dráhy pro transport na dlouhé vzdálenosti. Aktinová síť také pohání pohyb organel, jako jsou chloroplasty, mitochondrie a GA, a umožňuje pozici kompartment vázaných na cytoplazmatickou membránu v buňce (Henty-Ridilla *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014). Rostlinné buněčné organely připojené na AF se pohybují nezávisle po buňce na myozinových motorech v relativně nehybné cytoplasmě. Převládající aktivity, které mění tvar cytoskeletu, a ovlivňují transport nákladů v některých prodlužujících se buňkách, jsou růst na (+) konci AF, štípání mikrofilament a změny v mikrofilamentové síti (Meagher *et al.*, 2011). V nedávné době bylo dokázáno, že AF jsou zapojena do transportu sekretorických vezikul, obsahujících polysacharidy a proteiny, a syntetického aparátu buněčné stěny do cytoplazmatické membrány, a také do obnovy membrán a integrálních

membránových proteinů během endocytózy (Henty-Ridilla *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014). Je zřejmé, že pohyb rostlinných sekretorických organel je především závislý na aktinovém cytoskeletu. Chemická inhibice AF totiž vedla k narušení přestavby tubulů endoplazmatického retikula (ER) (Sparkes *et al.*, 2009) a pohybu GA (Brandizzi *et al.*, 2002). Ačkoli je aktinový cytoskelet nezbytný pro pohyb těchto organel, jeho porušení neovlivňuje negativně transport na krátké vzdálenosti v raných sekretorických dráhách. ER a GA tedy nepotřebují AF pro vzájemnou komunikaci (Brandizzi *et al.*, 2002). Na druhou stranu je aktinový cytoskelet potřebný pro transport proteinů z GA do centrální vakuoly (Kim *et al.*, 2005). Rychlá přestavba buněčné architektury je evidentním znakem mnoha signálních odpovědí a spekuluje se, že přestavba vyžaduje změnu aktivity nebo subcelulární distribuci klíčových aktin vázajících proteinů (Li *et al.*, 2014). Aktin je důležitou složkou odpovědi buněk na biotické a abiotické podněty, jako například v průběhu vrozené imunitní odpovědi na napadení patogeny (Henty-Ridilla *et al.*, 2013). Aktin a aktin depolymerizující faktory (ADF) se přímo účastní glukózového signalingu, signalingu při stresu suchem, reakce při napadení patogeny, reakce na chlad a gravitaci a kontroly buněčného cyklu (Meagher *et al.*, 2011). Přestože všechna eukaryota disponují aktinovým cytoskeletem, jeho distribuce v rostlinných buňkách je odlišná od živočišných buněk. Zároveň rostlinný aktinový cytoskelet je přítomen v průběhu celého buněčného cyklu, ale jeho organizace se liší během jednotlivých fází. Organizace aktinu se taktéž liší v různých rostlinných tkáních – endospermu, meristemických či vakuolizovaných buňkách (Staiger *et al.*, 2000). Aktin je součástí tří jedinečných cytoskeletálních struktur – fragmoplastu, preprofázového svazku a interfázního kortikálního cytoskeletu. Aktin je tak nezbytný pro průběh mitózy i cytokineze. Aktinový a MT cytoskelet jsou silně svázány v průběhu mitózy (Staiger *et al.*, 2000). Dělicí vřeténko se vytváří v souladu s rovinou dělení danou preprofázovým svazkem a tzv. na aktin prázdnu zónou (actin-depleted zone), které pro změnu určují pozici buněčné přepážky (Field *et al.*, 1999; Kojo *et al.*, 2013). Většina aktinového preprofázového svazku mizí z kortikálních oblastí po rozpadu jaderného obalu, což vede ke vzniku na aktin prázdné zóny (Staiger *et al.*, 2000). Preprofázový svazek určuje polohu a orientaci dělicího vřeténka, na kterém je pro změnu závislá poloha a orientace fragmoplastu (Yoneda *et al.*, 2005; Kojo *et al.*, 2013). Po vzniku dělicího vřeténka jej aktinová vlákna obklopují a překřížují (Staiger *et al.*, 2000). V pozdní anafázi se ve středu dělicího vřeténka objevují dvě sady AF. Tato AF se tvoří *de novo* blízko proximálního povrchu nově se tvořících dceřiných jader a jejich (+) konce směřují směrem k buněčné přepážce (Staehein *et al.*, 1996). V telofázi se tato AF zkracují a rozšiřují za tvorby věnce, až dosáhnou mateřské buněčné stěny. Vysoce

vakuolizované buňky reagují na nějaké poranění tím, že opětovně vstupují do buněčného cyklu. Prvním znamením nadcházející mitózy je centrování jádra. V G2 fázi buněčného cyklu se cytoplazmatická vlákna rozbíhají od periferie jádra k buněčnému kortexu. Jsou orientována ve dvou směrech – podél budoucí roviny dělení odpovídající fragmozómu a podél budoucí polární osy polarizující jádro před jeho dělením. Tato cytoplazmatická vlákna obsahují dlouhá aktinová vlákna a několik MT, obě tyto složky cytoskeletu jsou zapojeny do prostorové kontroly pozice jádra, což vede k polarizaci buňky před mitózou. (Staiger *et al.*, 2000).

Kortikální mikrofilamenta v epidermálních buňkách hypokotylu *A. thaliana* sestávají minimálně ze dvou různých populací filament – aktinové svazky a individuální AF. Svazky jsou struktury vyššího řádu tvořené dvěma či více samostatnými AF (Staiger *et al.*, 2009). Svazky se tvoří proplétáním samostatných AF a rozpadají se jak uvolňováním jednotlivých AF, tak jejich štěpením (Li *et al.*, 2014). Aktinové svazky jsou v porovnání se samostatnými AF delší, mají vyšší intenzitu fluorescence, delší životnost a jsou podstatně méně štípány. Jsou také rovnější, tužší a většinou jsou orientovány rovnoběžně v cytoplazmě, zatímco samostatná AF jsou orientována spíše náhodně (Staiger *et al.*, 2009; Henty-Ridilla *et al.*, 2013). Samostatná AF v kortikálních oblastech buňky jsou extrémně dynamická, objevují se a opět mizí, přeskupují se a splývají za tvorby svazků během intervalu několika desítek sekund. Nejvýraznějším výsledkem kvantitativních analýz dynamiky samostatných AF je objev, že převažujícím mechanismem rozkladu AF je jejich štěpení. Zkracování AF depolymerizací je v epidermálních buňkách hypokotylu pozorováno vzácně, objevuje se téměř o jeden řád méně často než růst AF (Li *et al.*, 2014). O souhrnném mechanismu reorganizace AF, tedy jejich rychlé elongaci na (+) konci a rozpadu AF způsobenému jejich štípáním, se mluví jako o tzv. stochastické dynamice, jako protikladu k „treadmillingu“ (Staiger *et al.*, 2009; Henty-Ridilla *et al.*, 2013). Ve většině studií je celkové chování AF při jejich reorganizaci konstantní až na výjimky, které zahrnují převážně pomalé rychlosti elongace AF, měřené například v pylové láčce a svěracích buňkách průduchů u *A. thaliana* (Henty-Ridilla *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2013; Qu *et al.*, 2013). V několika málo studiích se dokonce rychlost elongace téměř rovná rychlosti rozkladu AF, což možná naznačuje mechanismus reorganizace podobný „treadmillingu“ (Henty-Ridilla *et al.*, 2013). Samostatná AF také projevují další znaky dynamického chování. Procházejí například neustálými změnami tvaru, které zahrnují ohýbání a narovnávání. K ohýbání a narovnávání AF pravděpodobně dochází v důsledku aktivity myozinových motorů, které posouvají antiparalelní AF proti sobě, nebo způsobují klouzávání AF po cytoplazmatické membráně (Staiger *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2014).

Pro mikroskopickou analýzu aktinového cytoskeletu v živých buňkách nelze dobře použít přímé značení aktinu pomocí zeleného fluorescenčního proteinu (GFP – green fluorescent protein). Namísto tohoto postupu se využívají domény nebo motivy z aktin vázajících proteinů (ABPs – actin-binding proteins) pro konstrukci nepřímých reportérů F-aktinu pro mikroskopii živých rostlinných buněk. Nejčastěji používané konstrukty u rostlin jsou druhá aktin vázající doména z *A. thaliana* (FABD2) a Lifeact reportér pocházející z kvasinek (Voigt *et al.*, 2005; Vidali *et al.*, 2009; Dyachok *et al.*, 2014). Oba tyto reportéry byly použity pro měření parametrů dynamiky AF *in vivo*. Používání reportérů připravených z myšího nebo lidského talinu (GFP-mouse Talin, GFP-human Talin) není v tomto případě vhodné, protože dochází ke vzniku kvantitativních rozdílů v organizaci cytoskeletu a růstu rostlin, stabilizaci svazků AF a inhibici štěpení mikrofilament endogenními ADF (Li *et al.*, 2014).

3.3 Aktin vázající proteiny

Na aktinová vlákna se připojuje řada ABPs, které regulují organizaci aktinu a AF. Purifikovaný rostlinný aktin může *in vitro* rychle vytvářet AF, avšak v buňkách je dynamické chování a reorganizace aktinu ovlivňováno prostřednictvím ABPs (Henty-Ridilla *et al.*, 2013). Během téměř dvaceti let proteinové biochemie spolu se sekvenováním genů bylo odhaleno několik tuctů rostlinných ABPs (Henty-Ridilla *et al.*, 2013). Mnoho známých ABPs se váže na stejné místo AF, a proto se předpokládá, že si konkurují. Mezi několika proteiny existuje vztah pozitivní kooperace a mají tendenci vytvářet terciární komplexy, ale většina ABPs kooperuje negativně (dos Remedios *et al.*, 2003). Většina ABPs jsou komplexní nebo multidoménové proteiny, které mají jednu nebo i více funkcí (Li *et al.*, 2014). ABPs regulují skládání a rozkládání (např. profilin, ADF/cofilin, thymosin β_4), nukleaci *de novo* (např. aktin-asociované proteiny 2/3 - ARP2/3, Wiskott–Aldrich syndrome protein - WASP, formin), křížení a svazování AF (např. fimbrin, filamin), anebo jsou zapojeny do tvorby nadmolekulárních struktur, jako jsou fokální adheze (např. vinculin, talin, integrin) a jiné membránové interakce (např. spektrin, protein 4.1, ankyrin, adducin) (Hussey *et al.*, 2002). ABPs se mohou vázat jak na G-aktin, tak na F-aktin, případně na oba. Proteiny vážící se na monomery aktinu (např. profilin, aktin depolymerizující faktor - ADF) regulují množství a aktivitu podjednotek. Nukleační faktory vytváří centra pro tvorbu AF z monomerů, anebo z aktin-profilinových komplexů. Štěpící proteiny (např. ADF, villin) zkracují AF tvorbou zlomů v mikrofilamentové kostře, čímž se vytvářejí nové konce AF. Krycí proteiny (např. krycí proteiny - CP, villin) se váží na (+) konce a omezují připojování nebo odpojování

podjednotek. AF mohou být stabilizována pomocí proteinů vázajících se ze strany, nebo mohou tvořit vyšší struktury, jako svazky či sítě pomocí svazkujících proteinů či proteinů vytvářejících příčné vazby (např. villin, fimbrin) (Li *et al.*, 2014). Přehled některých ABPs spolu s jejich funkcemi se nachází v Tab. 1 (Kovar *et al.*, 2000a; Huang *et al.*, 2003; Staiger *et al.* Blanchoin, 2006).

Tab. 1 Přehled některých ABPs

ABP	funkce
profilin	vazba na G-aktin, potlačení spontánní nukleace AF a blokování připojování podjednotek na (-) konec
ADF	zvýšení rychlosti depolymerizaci AF na (-) konci AF, tvorba nových konců štěpením AF
ARP 2/3	nukleace AF <i>de novo</i>
formin	nukleace AF <i>de novo</i> a svazkování
CP	inhibice elongace na (+) konci a depolymerizace AF
fimbrin	zesíťování AF tvorbou příčných vazeb

Hussey *et al.* (2002) se zabývali analýzou nejstudovanějších ABPs, kdy hledali jejich homology v TAIR (The *Arabidopsis* Information Resource) databázi genomu. 36 z 67 analyzovaných ABPs nevykazovalo žádné blízké homologie v této databázi. Především se v TAIR databázi nenacházejí žádné proteiny, které by měly podobnost s proteiny potřebnými pro tvorbu fokálních adhezí (vinculin, talin, integrin). Také tam není přítomen žádný homolog thymosinu β_4 , ačkoli ostatní z již zmíněných proteinů regulujících skládání a rozkládání AF (profilin, ADF) se tam nacházejí. Navíc tam jsou forminy, které pravděpodobně regulují přinejmenším profilin. Villinová genová rodina je taktéž v databázi přítomna, ale neexistují jasné rozdíly mezi členy této genové rodiny, tak jako jsou rozdíly například mezi gelsolinem a villinem v živočišných buňkách. Pozoruhodný je fakt, že se v databázi nachází proteiny ARP2 a ARP3, které jsou součástí komplexu potřebného pro *de novo* iniciaci tvorby AF, ale nenachází se tam žádný homolog WASP. U *A. thaliana* se také vyskytuje fimbrinová genová rodina, ve které je identifikován spektrin jako humánní homolog, chybí však jasný homolog spektrinu. Zajímavé je, že homolog proteinu 4.1, proteinu zapojeného do interakce cytoplazmatické membrány s aktinovým cytoskeletem, je v databázi přítomen, zatímco ankyrin ani adducin, proteiny s podobnou funkcí, ne.

Myoziny jsou mechanochemické enzymy mající konzervovanou hlavovou motorovou doménu zodpovědnou za ATPázovou aktivitu a vazbu na aktin. Z evolučního hlediska lze rostlinné myoziny zařadit do třídy VIII a XI v super rodině myozinů eukaryot (Sparkes, 2011). Myoziny obsahují v oblasti ocasu náklad-vázající doménu, která je zodpovědná za transport organel a vezikul podél aktinových vláken. Myoziny jsou navíc zřejmě zodpovědné za tvorbu síly pohánějící vzájemné klouzání AF a klouzání AF na cytoplazmatické membráně (Li *et al.*, 2014).

3.3.1 Profilin

Profilin je malý všudypřítomný ABP o molekulové hmotnosti 12 – 14 kDa, který má komplexní efekty na dynamiku aktinového cytoskeletu u eukaryot. Profilin se váže na G-aktin v poměru 1:1 a tvoří s ním komplexy (Ramachandran *et al.*, 2000; Kandasamy *et al.*, 2007). Profilin spolu s ADF jsou nejvíce exprimované ABPs u rostlin (Kandasamy *et al.*, 2007). Poprvé byl rostlinný profilin objeven jako alergen v břízovém pylu (Valenta *et al.*, 1992). Později byl profilin identifikován jako aktin vázající protein u vyšších rostlin (Valenta *et al.*, 1993). Kromě aktinu profilin také interaguje s jinými ligandy, jako například s membránovým PIP2, PLP a ARP2/3 komplexem. Profilin, jako multifunkční protein, je pravděpodobně zapojen do signálních drah, a jeho interakce s PIP2 může mít efekt na PIP2 signaling různorodým ovlivňováním aktivity fosfolipázy C. Pravděpodobně profilin také propojuje PIP2 signaling s aktinovým cytoskeletem (Staiger *et al.*, 2000; Kandasamy *et al.*, 2002b). Imunofluorescenční analýza ukázala, že na cytoplazmatické membráně kořenových buněk kukuřice se PIP2 soustřeďuje do samostatných domén, které jsou podobné doménám bohatým na profilin. Ošetření mastoparanem, aktivátorem fosfolipázy C, způsobuje redistribuci PIP2 a přestavbu aktinového cytoskeletu. Předpokládá se, že profilin prostřednictvím PIP2 propojuje cytoplazmatickou membránu s aktinovým cytoskeletem (Sun *et al.*, 2013).

Sekundární a terciární struktury všech profilinů jsou vysoce konzervované (Jockusch *et al.*, 2007). Avšak fakt, že u různých druhů a dokonce i u téhož organismu existují různé izoformy profilinu, může být známkou rozdílných funkcí jednotlivých členů rodiny profilinů (Sun *et al.*, 2013). Ukázalo se také, že profiliny jednoděložných a dvouděložných rostlin jsou sekvenčně vysoce homologické. Profilin izolovaný z jednoděložné trávy bojínka lučního byl ze 79 % identický s profilinem pocházejícím z břízy. Naopak profiliny některých obratlovců, bakterií nebo zástupců skupiny *Amoebozoa* jsou homologické pouze asi ze 30 – 40 % se zmíněným profilinem z břízy (Valenta *et al.*, 1993). Na rozdíl od jednoduchých lidských či kvasinkových systémů má *A. thaliana* starobylou a vysoce divergentní multigenovou rodinu

kódující pět odlišných izoform profilinu. Těchto pět izoform je vysoce homologních vzhledem k jejich nukleotidovým a aminokyselinovým sekvencím (Ramachandran *et al.*, 2000; Kandasamy *et al.*, 2002b). V rámci profilinové rodiny *A. thaliana* jsou PRF1 a PRF2 vysoce homologické v aminokyselinové sekvenci, kdy se liší pouze v 10 ze 131 aminokyselinových zbytků (Wang *et al.*, 2009).

Profilin je součástí všech rostlinných tkání a plní důležité funkce v rostlinách tím, že má komplexní efekty na AF. Potlačuje nukleaci AF a blokuje připojování podjednotek na (-) konec, což omezuje růst AF pouze na (+) konec (Henty-Ridilla *et al.*, 2013). Mikroinjekce profilinu do rostlinných buněk způsobila depolymerizaci AF (Staiger *et al.*, 1994), zatímco nadexprese profilinu ve stabilně transformovaných buňkách vedla k polymerizaci aktinu v kortikální oblasti buněk (Finkel *et al.*, 1994). Ramachandran *et al.* (2000) zjistili, že úroveň exprese profilinu v buňkách je kritická pro jejich elongaci. Redukce úrovně exprese PRF1 v transgenních rostlinách o 50 % vedla k poruchám elongace buněk, nicméně nenastaly žádné detekovatelné změny v kortikálním aktinovém cytoskeletu. Naopak transgenní rostliny nadexprimující PRF1 měly delší kořeny a kořenové vlásky, přičemž uspořádání kortikálního aktinového cytoskeletu se nelišilo od standardního uspořádání u divokého typu (Ramachandran *et al.*, 2000). Úroveň exprese profilinu se také ukázala být důležitá pro udržení tvaru buněk. Snížená exprese profilinu vedla ke zvětšení epidermálních, kortikálních a endodermálních buněk, zatímco jiné epidermální buňky byly na pokraji zhroucení pravděpodobně v důsledku oslabené buněčné stěny. Překvapivým zjištěním jejich experimentů byl fakt, že transgenní rostliny se sníženou expresí profilinu kvetly dříve než divoký typ a rostliny nadexprimující profilin (Ramachandran *et al.*, 2000).

Pomocí specifických monoklonálních protilátek se studovala distribuce jednotlivých izoform profilinu ve tkáních *A. thaliana* (Kandasamy *et al.*, 2002b). Výsledky ukázaly, že tři z pěti izoform (PRF1, PRF2 a PRF3) jsou konstitutivně exprimovány v téměř všech orgánech a tkáních *A. thaliana*, včetně zárodečného vaku v různých stádiích vývoje a mikrospor v brzkých stádiích mikrosporogeneze. Na druhou stranu ostatní izoformy (PRF4 a PRF5) se exprimují především ve zralém pylu. Na základě lokalizace jednotlivých izoform byly profiliny rozděleny do dvou tříd – konstitutivní neboli též vegetativní a pylově-specifické neboli reproduktivní (Huang *et al.*, 1996; Kandasamy *et al.*, 2002b). Během vývoje pylu vegetativní profiliny představují veškerou populaci profilinu v mikrosporocytech a vyvíjejících se mikrosporách, avšak ve zralém pylu a rostoucích pylových láčkách vegetativní profiliny tvoří jen velmi malou část a převažují zde generativní profiliny. Při vývoji samčího gametofytu tedy dochází k náhlé změně v expresi jednotlivých izoform profilinu, zatímco

v rámci celého vývoje samičího gametofytu zůstávají konstitutivní profiliny hlavní složkou. Imunocytochemické studium pylových láček *A. thaliana* odhalilo, že izoformy profilinu jsou přítomné a více či méně rovnoměrně rozloženy v cytoplasmě (Kandasamy *et al.*, 2002b). Toto zjištění je však v ostrém kontrastu s pozorováním distribuce profilinu v rostoucích kořenových vláscích, jakožto dalším orgánu s polarizovaným růstem. Pro kořenové vlášení je typická specifická lokalizace profilinu ve špičkách kořenových vlásků (Baluška *et al.*, 2000).

McKinney *et al.* (2001) experimentovali s T-DNA inzerčním mutantem PRF1 u *A. thaliana* (*prf1-1*), který obsahoval inzerci v promotorové oblasti genu před počátkem transkripce, což by nemělo mít vliv na kvalitu konečného proteinu. Homozygotní *prf1-1* mutanti však ukázali sníženou expresi PRF1 genu v mladých semenáčcích, zatímco exprese v dospělých rostlinách nebyla ovlivněna. Dále zjistili, že proteinová hladina PRF1 u divokého typu je závislá na světle. Semenáčky divokého typu klíčící ve tmě měly totiž několikrát vyšší hladinu PRF1 než semenáčky, které klíčily na světle. Toto však neplatilo pro *prf1-1* mutanta, u nějž hladiny PRF1 nebyly regulovány světlem. To je možné vysvětlit tím, že v případě mutanta T-DNA inzerce způsobila oddělení regulačních sekvencí potřebných k dané odpovědi od genu pro PRF1. Délka hypokotylů semenáčků homozygotního *prf1-1* mutantu byla delší než u divokého typu (McKinney *et al.*, 2001). Mezi další defekty u semenáčků *prf1-1* patřilo opožděné klíčení, opožděný vývoj kotyledonů a prvních pravých listů.

Podle studie Kandasamy *et al.* (2002a) se ukázalo, že změněná exprese reprodukční izoformy aktinu ACT1 ve vegetativních pletivech je pro rostlinu velmi toxická, způsobuje masivní polymerizaci a svazkování AF a vyvolává různé vývojové defekty, jako zakrslost a opožděné kvetení. Důvodem tohoto efektu je pravděpodobně fakt, že správná funkce ACT1 je závislá na interakci s příslušnými reprodukčními ABPs, které se ve vegetativních pletivech nenacházejí. To prokázali Kandasamy *et al.* (2007) svým zjištěním, že současná exprese ACT1 spolu s reprodukčním PRF4 v tomtéž vegetativním pletivu způsobí téměř úplné potlačení toxického efektu ACT1, a takovéto rostliny měly typický vzhled a aktinový cytoskelet podobný kontrolním rostlinám (Kandasamy *et al.*, 2007). Ačkoli změněná exprese ACT1 spolu s vegetativním PRF1 ukázala pouze nepatrný efekt na potlačení toxického efektu ACT1, tento výsledek jasně ukázal, že existují preferenční třídově-specifické interakce mezi izoformami aktinu a profilinu v rostlinách. Změněná exprese pouze u různých izoform samotného profilinu nezapříčinila žádné nezvyklé efekty. Pravděpodobně zde došlo k integraci reprodukčních profilinů s přirozeně se vyskytujícími vegetativními aktiny (Kandasamy *et al.*, 2007).

Fan *et al.* (2013) zjistili, že nadexprese PRF3 v *A. thaliana* způsobuje viditelné růstové defekty, jako např. opožděné klíčení a redukci délky hypokotylu a kořene. Mikroskopická analýza ukázala, že zkrácení délky hypokotylu bylo způsobeno inhibicí elongace buněk a nadexprese PRF3 způsobila ztrátu silných aktinových vláken v hypokotylových buňkách, což naznačuje, že tato aktinová vlákna mají důležitou roli pro elongaci buněk (Fan *et al.*, 2013). Tato zjištění kontrastovala s předchozími experimenty s T-DNA inzerčními mutanty *prf1-1* (McKinney *et al.*, 2001), kteří vykazovali naopak prodloužené hypokotyly. Exprese profilinu je tedy možným limitujícím faktorem elongace buněk *A. thaliana* (Fan *et al.*, 2013).

Dvě třídy profilinů se zdají být funkčně odlišné ve většině krytosemenných rostlin. Vegetativní profiliny mají vyšší afinitu k PLP, váží více G-aktinu a narušují cytoplazmatickou architekturu aktinu rychleji než reproduktivní profiliny (Kovar *et al.*, 2000b). Dále bylo zjištěno, že PRF1 má mnohem vyšší afinitu ke G-aktinu a PLP než PRF2. Subcelulární lokalizace PRF1 a PRF2 je taktéž rozdílná (Wang *et al.*, 2009). Pomocí konfokální mikroskopie byly pozorovány transgenní rostliny *A. thaliana* exprimující fúzní proteiny PRF1-GFP a PRF2-GFP. Zjistilo se, že PRF1-GFP má filamentární uspořádání podobné AF, zatímco PRF2-GFP vytváří v buňkách polygonální síť imitující ER (Wang *et al.*, 2009). Ošetření rostlin s latrunkulinem A, inhibítolem polymerizace aktinového cytoskeletu, a jeho následné vymytí ukázalo, že filamentárně uspořádaný PRF1 pravděpodobně asociuje s AF, protože došlo k částečnému obnovení filamentárního uspořádání PRF1-GFP. Na druhou stranu, totéž ošetření s latrunkulinem A a následné zotavení odhalilo, že PRF2-GFP není vázán na aktinový cytoskelet, ale zřejmě kolokalizuje s ER. Tato zjištění potvrzují, že i přes vysokou strukturní podobnost jsou PRF1 a PRF2 nejspíše funkčně rozdílné (Wang *et al.*, 2009).

Takáč *et al.* (2011) se zabývali studiem efektů brefeldinu A (BFA), inhibitoru recyklace a sekrece vezikul, na kořenové buňky *A. thaliana*. Ve výsledku se ukázalo, že BFA zapříčiňuje vznik takzvaných BFA kompartmentů a zároveň ovlivňuje expresi několika proteinů v kořenových buňkách. Mimo jiné byla zjištěna upregulace PRF2 v důsledku inkubace s BFA. Zároveň se ukázalo, že se PRF2 akumuluje kolem a uvnitř BFA kompartment, což je navíc doprovázeno přestavbou aktinového cytoskeletu. PRF2 je tedy nejspíše v závislosti na BFA zapojen do interakce mezi vezikulárním transportem a aktinovým cytoskeletem.

Přehled funkcí profilinů v rostlinných buňkách je shrnut v Tab. 2 (Sun *et al.*, 2013).

Tab. 2 Přehled funkcí rostlinných profilinů

Zapojení do buněčné dráhy	Profilin	Buňky a/nebo ligandy
Interakce mezi cytoplazmatickou membránou a aktinovým cytoskeletem	ZmPRO3	Kořenové buňky kukuřice, PIP2
	AtPRF1, atd.	Endosperm semen <i>A. thaliana</i> , kořenové buňky; forminy (AtFH1, AtFH5 a AtFH6)
	PcPRF1	Kultivované buňky petržele
Umístění organel pomocí aktinového cytoskeletu	Profiliny z <i>A. thaliana</i>	Protoplasty mezofylových buněk <i>A. thaliana</i> , protein vnější membrány chloroplastů – CHUP1
	není k dispozici	Listové buňky rýže, formin (OsFH5)
	AtPRF2	Epidermální buňky, trichomy, ER kmenových epidermálních buněk <i>A. thaliana</i>
	není k dispozici	Kořenové buňky <i>A. thaliana</i> , formin (AtFH8)
Vezikulární transport pomocí aktinového cytoskeletu	PvPRO1	Kořenové hlízky fazolu, fosfoinositid-3-kinázy třídy III
	AtPRF2	Trans-Golgi systém (TGN) v kořenových buňkách <i>A. thaliana</i>

3.4 Abiotický stres u rostlin

Rostliny, jako sesilní organismy, se na rozdíl od živočichů nedokáží vyhnout nepříznivým podmínkám vnějšího prostředí (Smékalová *et al.*, 2014). Vyvinuly si však specifické mechanismy, které jim umožňují detekovat environmentální změny, odpovídat na komplexní stresové podmínky, minimalizovat poškození a zachovávat zdroje důležité pro růst a reprodukci (Atkinson *et Urwin*, 2012). Zásadní strategií rostlin, jak se adaptovat na měnící se podmínky prostředí, je regulace genové exprese (Sham *et al.*, 2015). Je zřejmé, že rostliny přeprogramovávají své buněčné odpovědi v reakci na neustále se měnící environmentální faktory (Sham *et al.*, 2015). Většina experimentů testuje vliv jediného abiotického stresu, avšak v přirozených podmínkách je rostlina převážně vystavena více stresovým faktorům souběžně (Rizhsky *et al.* 2004). V případě, že na rostlinu působí více různých abiotických stresů, je schopna aktivovat specifickou a unikátní stresovou odpověď (Atkinson *et Urwin*, 2012). Příkladem takovéto odpovědi je obranný mechanismus rostlin indukovaný kombinací teplotního stresu a stresu suchem, který je charakterizován potlačením fotosyntézy, zesílením intenzity dýchání, souborem obranných a metabolických transkriptů a akumulací sacharózy a dalších sacharidů (Rizhsky *et al.*, 2004). Existuje mnoho podobností v odpovědi na tuto kombinaci stresů u *A. thaliana* (Rizhsky *et al.*, 2004) a u tabáku (Rizhsky *et al.*, 2002), což naznačuje, že tento způsob obrany je konzervovaný mezi různými druhy rostlin. Tvorba plodin odolných vůči stresovým faktorům, jak transgenně, tak pomocí šlechtění, je velmi rozšířená (Atkinson *et Urwin*, 2012). Například rezistence k abiotickým stresům byla navozena v různých plodinách prostřednictvím genetické manipulace s transkripčními faktory nebo antioxidantními proteiny (Bhatnagar-Mathur *et al.*, 2008).

Ve všech eukaryotických organismech mají mitogen aktivované proteinkinázy (MAPK) a jejich signální dráhy nezbytnou roli pro přenos signálu zapojeného do stresových odpovědí. MAPK signální dráhy jsou uspořádané do modulů, které se skládají z MAPK kináz kináz, MAPK kináz a MAPK. Aktivace jednotlivých složek spočívá v jejich reversibilní fosforylaci. MAPK, jakožto poslední člen MAPK signální dráhy, se přemísťuje do jádra a reguluje transkripční faktory nebo jiné proteiny účastníci se transkripce, což vede k regulaci genové exprese a přeprogramování stresové odpovědi nebo rostlinného vývoje (Šamajová *et al.*, 2013).

3.4.1 Solný stres

Zasolení půd je celosvětový problém v zemědělství, protože způsobuje snížení úrody v postižených oblastech. Rostliny se rozdělují na základě jejich odpovědi na solný stres na dvě základní skupiny – halofyty a glaukofyty. Halofyty žijí přirozeně ve vysoce zasoleném prostředí, ale takovýchto rostlin je pouze minimum. Valná většina rostlin jsou glaukofyty, které nedokáží tolerovat vysoké hladiny solí stejně jako halofyty. Za normálních podmínek je osmotický tlak v rostlinných buňkách vyšší než v okolním prostředí, což rostlina využívá pro příjem vody a rozpuštěných minerálů do kořenových buněk. Když je rostlina vystavena osmotickému stresu ve formě nadměrně zasoleného prostředí, je osmotický tlak prostředí vyšší než uvnitř rostlinných buněk a dochází ke snížení schopnosti rostliny přijímat potřebnou vodu a minerály (Kader *et* Lindberg, 2010). Na druhou stranu sodné kationty (Na^+) a chloridové anionty (Cl^-) se dostávají do buněk a mají toxický efekt na buněčné membrány a metabolickou aktivitu v buňkách, poškozují homeostázu vody a iontů (Huh *et al.*, 2002; Mazel *et al.*, 2004; Kader *et* Lindberg, 2010). Nadměrné zasolení také vyvolává oxidativní stres, genotoxicitu, nutriční poruchy a poškozují buněčné dělení a zvětšování buněk. Souhrnně tyto efekty negativně ovlivňují růst rostlin, vývoj a mohou vést až ke smrti (Carillo *et al.*, 2011). Působením solného stresu dochází v rostlině k ovlivnění důležitých procesů, jako je fotosyntéza, proteosyntéza a energetický a lipidový metabolismus (Carillo *et al.*, 2011). Rostlina může pod vlivem solného stresu procházet mnohými změnami, přičemž některé z nich jsou čistě adaptivního charakteru, zatímco mnohé mohou být patologickými následky přímého poškození rostliny. Znalost těchto změn je důležitá, protože mohou sloužit jako vhodné cíle pro genovou supresi za cílem zvýšení odolnosti rostlin vůči stresu (Zhu, 2002). Osmotická tolerance rostlin zahrnuje schopnost snášet nedostatečný přísun vody v důsledku solného stresu a schopnost udržet tvorbu a růst nových listů a vodivost průduchů (Carillo *et al.*, 2011). Dalším obranným mechanismem proti solnému stresu je minimalizování množství Na^+ , které se akumuluje v cytosolu především listových buněk. Tento proces zahrnuje regulaci genové exprese specifických iontových kanálů a transporterů (Carillo *et al.*, 2011). Příkladem je regulace transportu sodných iontů do vakuol. Nadexprese vakuolárního Na^+/H^+ antiporteru u rajčete totiž umožnila rostlinám růst v prostředí s 200mM koncentrací NaCl (Zhang *et* Blumwald, 2001). Další důležitou obrannou strategií je biosyntéza a akumulace osmolytů (Hasegawa *et al.*, 2000).

3.4.2 Oxidativní stres

Je nutné, aby byl rostlinný metabolismus regulován za účelem efektivní integrace různorodých biosyntetických drah redukčního charakteru. Tato regulace však úplně nedokáže zabránit aktivaci molekulárního kyslíku a tvorbě reaktivních forem kyslíku (ROS), konkrétně superoxidového aniontu ($O_2^{\cdot-}$), peroxidu vodíku (H_2O_2), hydroxylového radikálu (OH^{\cdot}) a singletového kyslíku (1O_2) (Perl-Treves *et* Perl, 2002; Foyer *et* Noctor, 2005). ROS se aktivně účastní různých biologických procesů, zahrnující například růst buněk, programovanou buněčnou smrt a senescenci buněk (Finkel, 2003). Rostlinné buňky produkují ROS (H_2O_2 a $O_2^{\cdot-}$) jako druhé posly v mnoha procesech spojených s rostlinným růstem a vývojem. Navíc produkce velkého množství $O_2^{\cdot-}$ na cytoplazmatické membráně je jeden z hlavních způsobů, kterým rostlina přenáší signály o změnách prostředí (Foyer *et* Noctor, 2005). Situace, které vyvolávají zvýšenou tvorbu ROS, se souhrnně označují jako oxidativní stres, což ukazuje na škodlivý proces. Ve skutečnosti je to ale pravděpodobně v mnoha případech právě naopak a zvýšená oxidace je nezbytnou součástí signálů, které rostlina využívá k přizpůsobení se environmentálním a vývojovým podnětům (Foyer *et* Noctor, 2005). Primární obranou rostlin proti oxidativnímu stresu jsou důmyslné mechanismy, které regulují elektrontransportní řetězec a obecně fotosyntézu. Tyto mechanismy jsou zodpovědné za správné propojení světelných a temnostních reakcí fotosyntézy a za adaptaci světlosběrného komplexu na měnící se podmínky. Ve výsledku je tak produkce ROS redukována na minimum (Perl-Treves *et* Perl, 2002). ROS jsou neustále produkovány ve všech buněčných kompartmentech jako vedlejší produkt buněčného metabolismu a přežití buňky je závislé na adekvátní ochraně. Veškeré aerobní organismy si vyvinuly mnoho obranných mechanismů, které zahrnují enzymy i neenzymatické antioxidanty. Mezi antioxidantní enzymy patří superoxid dismutáza (SOD), glutathion peroxidáza, glutathion reductáza a kataláza. Detoxikace často vyžaduje sled více kroků, aby se zabránilo přeměně jedné ROS v jinou, více škodlivou. To lze předvést na příkladu SOD, která katalyzuje přeměnu $O_2^{\cdot-}$ na H_2O_2 . Nedostatečnost v následujícím kroku detoxikace H_2O_2 vede k akumulaci H_2O_2 , inaktivaci SOD a tvorbě OH^{\cdot} (Perl-Treves *et* Perl, 2002).

4 Materiál a metodika

4.1 Materiál

4.1.1 Biologický materiál

V experimentech byla použita semena *A. thaliana*, ekotyp Columbia-0 (Col-0, divoký typ) a nadexpresní linie exprimující GFP značený profilin 2 pod kontrolou 35S promotoru (*35S::PRF2:GFP*), dále v textu pouze jako PRF2-GFP. Jako kontrola byla použita semena *A. thaliana* stabilně exprimující chimérický gen pro cytoplazmatický fúzní protein s GFP, dále v textu pouze jako pMAT-GFP (Mano *et al.*, 1999). Všechna semena byla povrchově vysterilizována pomocí ethanolu (EtOH) ve 3 krocích:

- 1) promývání semen 5 min v 70% EtOH,
- 2) promývání semen 2 – 3 min v 96% EtOH,
- 3) 3x 5 min promývání v destilované vodě. Mezi každým promytím byla voda odpipetovaná a napipetovaná čistá. Vysterilizovaná semena byla nanášena na sterilní filtrační papír.

4.1.2 Chemikálie

Desert Biological:

meiceláza

Duchefa Biochemie:

Murashige & Skoog základní směs solí (MS salts)

sorbitol

Invitrogen:

Alexa Fluor 488 konjugovaná sekundární protilátka (kozí anti-králičí)

Alexa Fluor 488 konjugovaná sekundární protilátka (kozí anti-myší)

Alexa Fluor 488 konjugovaná sekundární protilátka (kozí anti-potkaní)

Alexa Fluor 546 konjugovaná sekundární protilátka (kozí anti-myší)

Alexa Fluor 546 konjugovaná sekundární protilátka (kozí anti-potkaní)

polyklonální primární protilátka anti-GFP (králičí)

Penta:

ethanol

Serotec:

monoklonální primární protilátka anti- α -tubulin YOL1/34 (potkaní)

Serva:

macerozym

Sigma aldrich:

1,1-dimethyl-4,4-bipyridium dichlorid (PQ – paraquat)

4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)

borohydrid sodný (Na[BH₄])

brefeldin A (BFA)

celuláza

dihydrát hydrogenfosforečnanu sodného (Na₂HPO₄ · 2H₂O)

dihydrogenfosforečnan draselný (KH₂PO₄)

dimethylsulfoxid (DMSO)

glutaraldehyd

glycerol

heptahydrát síranu hořečnatého (MgSO₄ · 7H₂O)

hovězí sérový albumin (BSA)

hydroxid draselný (KOH)

chlorid sodný (NaCl)

kyselina ethylenglykol-bis-(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraoctová (EGTA)

latrunkulin B

methanol

monoklonální primární protilátka anti-aktin (myší)

Nonidet P-40

oryzalin

paraphenylendiamin

paraformaldehyd

phytagel

piperazin-N,N'-bis-(ethansulfonová kyselina) (PIPES)

sacharóza

taxol

xylene

Ostatní:

imerzní olej 518F (Zeiss)

4.1.3 Roztoky a média

Pevné ½ MS médium

2,2 g.l ⁻¹	Murashige & Skoog základní směs solí (MS salts)
10 g.l ⁻¹	sacharóza
8 g.l ⁻¹	phytagel
	dH ₂ O
	pH 5,8; sterilizováno autoklávováním

Tekuté ½ MS médium

2,2 g.l ⁻¹	Murashige & Skoog základní směs solí (MS salts)
10 g.l ⁻¹	sacharóza
	dH ₂ O
	pH 5,8; sterilizováno autoklávováním

Pevné kultivační ½ MS médium s obsahem 75mmol.l⁻¹ NaCl

2,2 g.l ⁻¹	Murashige & Skoog základní směs solí (MS salts)
10 g.l ⁻¹	sacharóza
8 g.l ⁻¹	phytagel
4,383 g.l ⁻¹	NaCl
	dH ₂ O
	pH 5,8; sterilizováno autoklávováním

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

2,2 g.l ⁻¹	Murashige & Skoog základní směs solí (MS salts)
10 g.l ⁻¹	sacharóza
8 g.l ⁻¹	phytagel
5,844 g.l ⁻¹	NaCl
	dH ₂ O
	pH 5,8; sterilizováno autoklávováním

Pevné kultivační ½ MS médium s obsahem 125mmol.l⁻¹ NaCl

2,2 g.l ⁻¹	Murashige & Skoog základní směs solí (MS salts)
10 g.l ⁻¹	sacharóza
8 g.l ⁻¹	phytagel
7,305 g.l ⁻¹	NaCl
	dH ₂ O
	pH 5,8; sterilizováno autoklávováním

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

2,2 g.l ⁻¹	Murashige & Skoog základní směs solí (MS salts)
10 g.l ⁻¹	sacharóza
8 g.l ⁻¹	phytagel
8,766 g.l ⁻¹	NaCl
	dH ₂ O
	pH 5,8; sterilizováno autoklávováním

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

2,2 g.l ⁻¹	Murashige & Skoog základní směs solí (MS salts)
10 g.l ⁻¹	sacharóza
8 g.l ⁻¹	phytagel
	dH ₂ O
	pH 5,8; sterilizováno autoklávováním
100 µl	PQ, sterilizován filtrací a přidán do sterilního média

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

2,2 g.l ⁻¹	Murashige & Skoog základní směs solí (MS salts)
10 g.l ⁻¹	sacharóza
8 g.l ⁻¹	phytagel
	dH ₂ O
	pH 5,8; sterilizováno autoklávováním
500 µl	PQ, sterilizován filtrací a přidán do sterilního média

Pevné kultivační ½ MS médium s obsahem 200mmol.l⁻¹ sorbitolu

2,2 g.l ⁻¹	Murashige & Skoog základní směs solí (MS salts)
10 g.l ⁻¹	sacharóza
8 g.l ⁻¹	phytagel
36,434 g.l ⁻¹	sorbitol
	dH ₂ O
	pH 5,8; sterilizováno autoklávováním

Pevné kultivační ½ MS médium s obsahem 400mmol.l⁻¹ sorbitolu

2,2 g.l ⁻¹	Murashige & Skoog základní směs solí (MS salts)
10 g.l ⁻¹	sacharóza
8 g.l ⁻¹	phytagel
72,868 g.l ⁻¹	sorbitol
	dH ₂ O
	pH 5,8; sterilizováno autoklávováním

EGTA (0,5mol.l⁻¹ zásobní roztok)

3,8 g	EGTA
10 ml	dH ₂ O
	pevný KOH
	pH 8

PBS (fosfátem tlumený solný roztok)

0,14 mol.l ⁻¹	NaCl
2,7 mmol.l ⁻¹	KCl
6,5 mmol.l ⁻¹	Na ₂ HPO ₄ . 2H ₂ O
1,5 mmol.l ⁻¹	KH ₂ PO ₄
	dH ₂ O
	pH 7,3

MTSB (mikrotubuly stabilizující pufr)

50 mmol.l ⁻¹	PIPES
5 mmol.l ⁻¹	MgSO ₄ . 7H ₂ O
5 mmol.l ⁻¹	EGTA
	pevný KOH
	dH ₂ O
	pH 6,9

Fixační roztok

5 ml	MTSB
1,88 ml	paraformaldehyd (8%)
200 µl	glutaraldehyd (25%)
292 µl	dH ₂ O

Redukční roztok

50 mg	NaBH ₄
50 ml	PBS

Permeabilizační roztok

8,8 ml	PBS
1 ml	DMSO (10%)
0,2 ml	Nonidet P-40 (2%)

Zalévací médium

100 mg	paraphenylendiamin
100 µl	DMSO
10 ml	PBS
	pH 8,3
90 ml	glycerol (100%)

4.1.4 Přístroje

analytické váhy XA110/2X, Radwag (Polsko)

binokulární lupa Leica M165FC (Německo) s CCD kamerou, Leica Microsystem (Německo)
digestoř, Merci (Česká republika)

elektromagnetická míchačka MSH-420, Boeco (Německo)

fotoaparát Nikon (Japonsko)

fytotronová komora, Weiss Gallenkamp (Německo)

Image Scanner III Epson (Japonsko)

konfokální laserový skenovací mikroskop LSM 710, Zeiss (Německo)

laboratorní předvážky S1502, BEL (Itálie)

pH metr Cyberscan 310, Eurotech Instruments (Singapur)

sterilní laminární box Faster (Itálie)

třepačka s nastavitelnou teplotou inkubace ES-20, Biosan (Lotyšsko)

vortex, Labnet (USA)

4.1.5 Software

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

4.2 Metodika

4.2.1 Příprava médií pro kultivaci rostlin *in vitro*

Pro všechny experimenty bylo použito ½ MS médium (Murashige *et* Skoog, 1962), které se připravilo následovně: v 1 l destilované vody bylo rozpuštěno za stálého míchání 10 g sacharózy a 2,2 g MS salts. Roztoku se upravilo pH na 5,8 pomocí roztoku KOH. Do 4 termolahví o objemu 1 l se dalo po 2 g phytogelu a přililo se po 250 ml připraveného média. Médium bylo sterilizováno autoklávováním.

Vliv abiotických stresů na rostliny byl testován pomocí kultivace rostlin na pevných médiích s obsahem určité koncentrace chemické látky, která navodila stresové podmínky. Solný stres byl navozen přidáním NaCl. Hyperosmotický stres byl vyvolán přidavkem sorbitolu. Oxidativní stres byl indukován přidavkem PQ. NaCl a sorbitol byly vždy přidány spolu s ostatními složkami média před autoklávováním. Sterilní PQ byl přidán do vysterilizovaného média. Koncentrace jednotlivých účinných látek jsou uvedeny v Tab. 3.

Tab. 3 Koncentrace použitých látek při abiotickém stresu v *in vitro* podmínkách.

Typ abiotického stresu	Účinná látka	Koncentrace
Solný stres	NaCl	75mmol.l ⁻¹
		100mmol.l ⁻¹
		125mmol.l ⁻¹
		150mmol.l ⁻¹
Hyperosmotický stres	sorbitol	200mmol.l ⁻¹
		400mmol.l ⁻¹
Oxidativní stres	PQ	0,1μmol.l ⁻¹
		0,5μmol.l ⁻¹

4.2.2 Kultivace rostlin ve stresových podmínkách

4.2.2.1 Působení solného a hyperosmotického stresu na růst kořenů rostlin PRF2-GFP

Semena *A. thaliana* (divoký typ Col-0, PRF2-GFP a pMAT-GFP) byla nasazena na Petriho misky, obsahující ½ MS médium, misky byly uloženy při 4 °C v chladničce na 48 h, a následně kultivovány ve vertikální poloze ve fytotronové komoře při konstantních podmínkách (21 °C, vlhkost 71 %, denní režim 16/8 h). Sazení a přenášení rostlin se provádělo ve sterilním boxu. Po 4 dnech kultivace byly semenáčky opatrně přeneseny na čtvercové Petriho misky, obsahující médium s přidavkem určité koncentrace NaCl nebo sorbitolu. Misky byly dále kultivovány ve vertikální poloze ve fytotronové komoře za shodných podmínek (viz výše). Růst rostlin byl pravidelně sledován v průběhu několika dní s použitím skeneru a programu EPSON Scan, a poté byl vyhodnocen v programech ImageJ a Microsoft Excel.

4.2.2.2 Působení solného a hyperosmotického stresu na klíčení semen rostlin PRF2-GFP

Semena *A. thaliana* (divoký typ Col-0, PRF2-GFP a pMAT-GFP) byla nasazena na čtvercové Petriho misky, obsahující ½ MS médium s přidavkem 150mmol.l⁻¹ NaCl nebo 400mmol.l⁻¹ sorbitolu. Petriho misky byly uloženy při 4 °C v chladničce na 48 h, a poté kultivovány ve fytotronové komoře za shodných podmínek (viz výše). Semenáčky byly vyfoceny pomocí binokulární lupy po 84 h a bylo vyhodnoceno klíčení semen po 24, 48 a 72 h.

4.2.2.3 Působení solného, hyperosmotického a oxidativního stresu na změny fenotypu rostlin

Semena *A. thaliana* (divoký typ Col-0, PRF2-GFP a pMAT-GFP) byla nasazena na Petriho misky, obsahující ½ MS médium, misky byly uloženy při 4 °C v chladničce na 48 h, a následně kultivovány ve vertikální poloze ve fytotronové komoře za shodných podmínek (viz výše). Čtyřdenní semenáčky byly přeneseny na kulaté Petriho misky, obsahující 0,1 a 0,5µmol.l⁻¹ PQ, 75, 100 a 125mmol.l⁻¹ NaCl nebo 200mmol.l⁻¹ sorbitol. Misky byly dále kultivovány v horizontální poloze ve fytotronové komoře za shodných podmínek (viz výše). 14. a 21. den po přenesení byly misky vyfoceny fotoaparátem ve sterilním boxu a byly vyhodnoceny změny fenotypu rostlin.

4.2.3 In vivo lokalizace PRF2-GFP v odpovědi na působení inhibitorů cytoskeletu

Semena nadexpresní linie PRF2-GFP byla nasazena na Petriho misky, obsahující ½ MS médium, misky byly uloženy při 4 °C v chladničce na 48 h, a následně kultivovány ve vertikální poloze ve fytotronové komoře za shodných podmínek (viz výše). Tří- až pětidenní semenáčky se umístili do mikrokómůrky, která se skládala z podložního a krycího skla. Na podložní sklo se po stranách umístila oboustranná lepicí páska, do kapky tekutého ½ MS média se položil semenáček a krycím sklem se přikryl tak, aby byl celý umístěný pod sklem. Takto připravený mikroskopický preparát se vložil na 30 min do vlhké komůrky pro adaptaci, a poté se pozoroval pomocí konfokálního laserového skenovacího mikroskopu LSM 710 od firmy Zeiss (laser: 488 nm; filtr pro GFP: 496 – 526 nm) v programu Zen 2012 Black software (Zeiss).

Pro sledování změn profilinu 2 byl použit inhibitor aktinového cytoskeletu – latrunkulin B a inhibitory MT – taxol a oryzalin. Před aplikací inhibitorů se nejprve zdokumentovaly hypokotylové buňky rostlin a perfúzí byl přidán roztok latrunkulinu B

(10 μ mol.l⁻¹), taxolu (1 μ mol.l⁻¹), anebo oryzalinu (2 μ mol.l⁻¹) v tekutém ½ MS médiu. Roztok inhibitoru se přidával mikropipetou v objemu asi 150 μ l ke kotyledonům a u kořene se odsával filtračním papírem. Poté byly vybrané hypokotylové buňky skenovány každých 10 min po dobu 60 min. Jako kontrola byl vždy použit roztok DMSO v tekutém ½ MS médiu ve shodné koncentraci jako inhibitor.

4.2.4 Imunolokalizace MT a AF pomocí metody „whole mount“

Semena *A. thaliana* (divoký typ Col-0, PRF2-GFP) byla nasazena na Petriho misky, obsahující ½ MS médium, misky byly uloženy při 4 °C v chladničce na 48 h, a následně kultivovány ve vertikální poloze ve fytotronové komoře za shodných podmínek (viz výše). Ve čtyřdenních semenáčcích byly imunolokalizovány MT a AF pomocí metody „whole mount“ (Sauer *et al.*, 2006; Šamajová *et al.*, 2014). Semenáčky byly fixovány ve fixačním médiu po dobu 1 h za použití vakua. Fixované rostliny byly dvakrát po 10 min promyty v ½ MTSB a dvakrát po 10 min v PBS. Aldehydové skupiny byly redukovány redukčním roztokem třikrát po 5 min. Po promytí (3x 5 min v PBS) pokračovala fixace. Semenáčky byly inkubovány ve 100% methanolu po dobu 10 min při teplotě 37 °C, a to třikrát nebo do vymizení chlorofylu. Dále byly inkubovány v roztoku EtOH s xylenem v poměru 1:1 po dobu 10 min při teplotě 37 °C, a to celkem třikrát. Poté byly inkubovány v 98% ethanolovém roztoku xyleny po dobu 10 min při teplotě 37 °C, a to celkem třikrát. Následně byla zopakována inkubace v roztoku EtOH s xylenem (1:1) po dobu 10 min při pokojové teplotě, a to celkem dvakrát. Poté následovala inkubace v 99% EtOH po dobu 10 min při pokojové teplotě, a to celkem dvakrát. Poté byla provedena rehydratace semenáčků v klesající ethanolové řadě – 90% EtOH, 75% EtOH, 50% EtOH a 25% EtOH, a to vždy po 5 min při pokojové teplotě. Všechny předchozí kroky byly provedeny v digestoři. Semenáčky byly promyty dvakrát po 5 min v PBS. Poté byly buněčné stěny natráveny směsí enzymů – meiceláza, celulóza a macerozym po dobu 30 min při teplotě 37 °C. Semenáčky byly promyty čtyřikrát po dobu 5 min v PBS a následně byly inkubovány v permeabilizačním roztoku po dobu 1 h při pokojové teplotě. Po promytí (4x 10 min v PBS) byly semenáčky blokovány roztokem 3% (w/v) BSA v PBS po dobu 1 h při pokojové teplotě. Poté byla provedena inkubace s primární potkaní monoklonální protilátkou anti- α -tubulin, která byla ředěna v roztoku 2% (w/v) BSA v PBS v poměru 1:300, anebo s primární myší monoklonální protilátkou anti-aktin, která byla ředěna v roztoku 2% (w/v) BSA v PBS v poměru 1:100. K části semenáčků byla ještě přidána polyklonální králičí protilátka anti-GFP, která byla ředěna v roztoku 2% (w/v) BSA v PBS v poměru 1:300. Inkubace všech vzorků probíhala 30 min ve vakuu, a poté při teplotě 4 °C

celou noc. Následně byly vzorky promyty šestkrát po 10 min v 3% (w/v) roztoku BSA v PBS. Dále byla ke vzorkům přidána sekundární značená protilátka (Alexa Fluor 488 kozí anti-potkaní IgG, Alexa Fluor 488 kozí anti-myší IgG, Alexa Fluor 488 kozí anti-králičí IgG, Alexa Fluor 546 kozí anti-potkaní IgG, anebo Alexa Fluor 546 kozí anti-myší IgG), která byla vždy ředěna v roztoku 2% (w/v) BSA v PBS v poměru 1:500. Inkubace všech vzorků probíhala nejprve 1,5 h při 37 °C, a poté 1,5 h při pokojové teplotě. Od inkubace se sekundární protilátkou se vzorky ponechaly již po celou dobu ve tmě. Vzorky byly promyty třikrát po 10 min v PBS. Následně se vzorky barvily pomocí DAPI 15 min při pokojové teplotě. Zásobní roztok DAPI (10mmol.l⁻¹ v DMSO) byl naředěn v PBS v poměru 1:1000. Poté byly vzorky promyty třikrát po 10 min v PBS. Na konec byly vzorky přeneseny na podložní skla do kapky zalévacího média a přikryty krycími skly. Hotové preparáty byly uzavřeny pomocí laku na nehty. Vzorky byly vyhodnocovány pomocí konfokálního laserového skenovacího mikroskopu LSM 710 od firmy Zeiss. Na snímání preparátu byly vybrány vhodné přednastavené parametry (laser pro DAPI: 405 nm, GFP a Alexa Fluor 488: 488 nm, Alexa Fluor 546: 561 nm; filtr pro DAPI: 400 – 487 nm, GFP a Alexa Fluor 488: 494 – 533 nm, Alexa Fluor 546: 566 – 620 nm).

5 Výsledky

Výsledky dosažené v průběhu bakalářské práce jsou představeny v této kapitole a jsou rozděleny na tři samostatné části. První část představuje fenotypovou charakterizaci transgenní linie PRF2-GFP (konstrukt *35S::PRF2:GFP*) v kontrolních podmínkách, při solném, hyperosmotickém a oxidativním stresu. Byly vyhodnoceny délky primárních kořenů, byl sledován vliv stresových podmínek na klíčení semen a fenotyp rostlin. Druhá část kapitoly se zabývá pozorováním vlivu inhibitorů cytoskeletu na buňky rostlin transgenní linie PRF2-GFP v *in vivo* podmínkách pomocí konfokální mikroskopie. Poslední část je zaměřena na imunolokalizaci cytoskeletu v buňkách rostlin PRF2-GFP metodou „whole mount“.

5.1 Fenotypová charakterizace transgenní linie PRF2-GFP

Na fenotypovou charakterizaci se použily rostliny Col-0, transgenní linie PRF2-GFP, příp. rostliny pMAT-GFP. Semena byla vysazena na pevné ½ MS médium bez vitaminů a po čtyřech dnech byly semenáčky přeneseny na média s obsahem NaCl, sorbitolu nebo PQ. Aby se vyloučil mechanický stres způsobený přenosem rostlin na média, přenášely se i kontroly. Případně byla semena vysazena přímo na média s obsahem NaCl nebo sorbitolu.

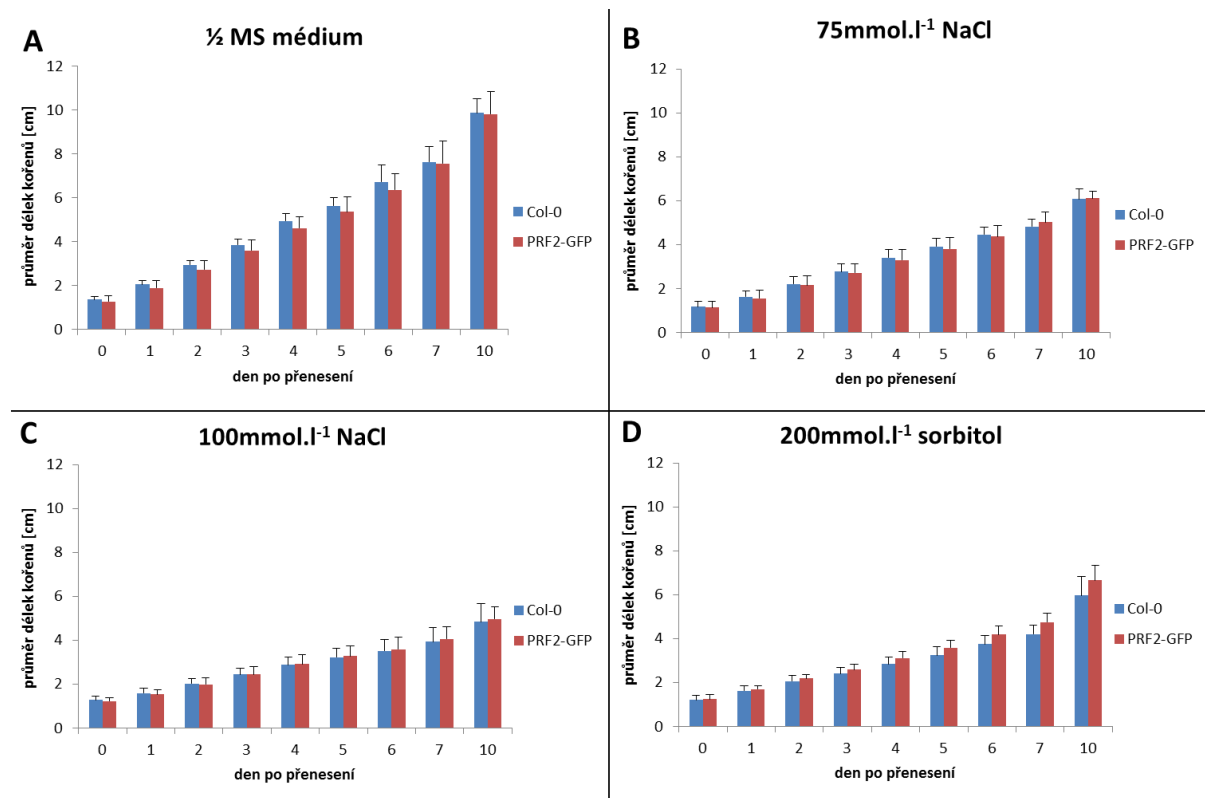
Porovnáváním délky primárního kořene rostlin na kontrolním médiu (½ MS médium) a pod vlivem stresu se zjistilo, že solný a hyperosmotický stres vyvolávají inhibici prodlužovacího růstu primárních kořenů a klíčení semen (Obr. 2 a 5). Hyperosmotický a oxidativní stres mají vliv na viabilitu a fenotyp studovaných linií *A. thaliana* – Col-0, pMAT-GFP a PRF2-GFP (Obr. 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11 a 12).

5.1.1 Vliv solného a hyperosmotického stresu na růst kořenů

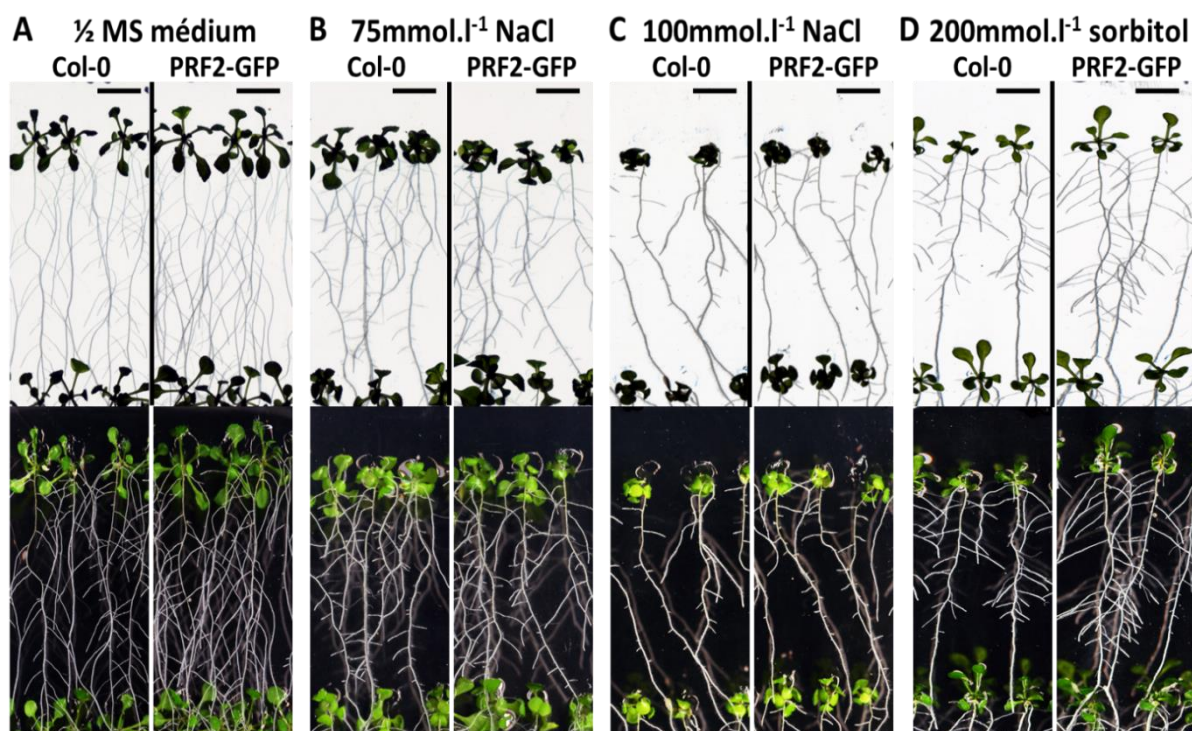
Testování vlivu hyperosmotického stresu na prodlužovací růst primárních kořenů bylo provedeno ve dvou biologických opakováních. Experiment spočíval ve vysazení semen na ½ MS médium bez vitaminů a následném přenesení 4-denních semenáčků na média s obsahem 75mmol.l^{-1} NaCl, 100mmol.l^{-1} NaCl a 200mmol.l^{-1} sorbitolu. Petriho misky byly skenovány v průběhu 10 dní a byla vyhodnocena délka primárních kořenů.

Na kontrolním médiu 10. den po přenosu byla délka primárních kořenů u obou linií podobná. Rostliny Col-0 dosahovaly průměrné délky 9,85 cm a rostliny PRF2-GFP byly dlouhé v průměru 9,80 cm (Obr. 2A). Všechny rostliny na tomto médiu měly normálně vyvinuté boční kořeny a listové růžice (Obr. 3A). Solný a hyperosmotický stres inhibovaly prodlužovací růst primárních kořenů a měly i vliv na vývoj listových růžic, bočních kořenů a kořenových vlásků. Na médiu s obsahem 75mmol.l^{-1} NaCl ukazovaly obě linie 10. den po

přenosu znatelnou inhibici prodlužovacího růstu primárního kořene oproti kontrolním podmínkám, nebyl však viditelný rozdíl v inhibici růstu mezi jednotlivými liniemi. Průměrná délka primárních kořenů rostlin Col-0 činila 6,07 cm a rostliny PRF2-GFP dosahovaly průměrné délky primárního kořene 6,11 cm (Obr. 2B). Rostliny na tomto médiu měly menší listové růžice, kratší boční kořeny než rostliny na kontrolním médiu (Obr. 3B). Na médiu s obsahem 100mmol.l^{-1} NaCl byla ještě zřetelnější inhibice prodlužovacího růstu primárních kořenů 10. den po přenosu, větší vliv měla tato koncentrace i na vývoj listových růžic, bočních kořenů. Délky primárních kořenů jednotlivých linií byly srovnatelné. Rostliny Col-0 dosahovaly průměrné délky primárních kořenů 4,84 cm, zatímco rostliny PRF2-GFP 4,97 cm (Obr. 2C). Rostliny měly menší listové růžice, málo bočních kořenů a téměř žádné kořenové vlásky (Obr. 3C). 200mmol.l^{-1} sorbitol měl podobný vliv na inhibici prodlužovacího růstu primárních kořenů jako 75mmol.l^{-1} NaCl. Desátý den po přenosu měly rostliny PR2-GFP primární kořen dlouhý v průměru 6,66 cm, zatímco rostliny Col-0 pouze 5,97 cm (Obr. 2D). Rostliny měly menší listové růžice a kratší boční kořeny než rostliny na kontrolním médiu (Obr. 3D).



Obr. 2 Porovnání průměrných délek primárních kořenů linií Col-0 a PRF2-GFP v podmínkách solného a hyperosmotického stresu. Délka kořenů byla měřena v průběhu 10 dní po přenosu 4-denních rostlin na kontrolní médium (A), na médium s obsahem 75 (B) a 100mmol.l⁻¹ NaCl (C) a 200mmol.l⁻¹ sorbitolu (D).



Obr. 3 Přehled kořenů rostlin Col-0 a PRF2-GFP 10. den po přenosu na kontrolní médium (A), na médium s obsahem 75 (B) a 100mmol.l⁻¹ NaCl (C) a 200mmol.l⁻¹ sorbitolu (D). Měřítko odpovídá 1 cm.

5.1.2 Vliv solného a hyperosmotického stresu na klíčení semen

Pro studium klíčivosti semen *A. thaliana* byla nasazena semena linií Col-0, pMAT-GFP a PRF2-GFP přímo na média s obsahem NaCl a sorbitolu. Schopnost klíčení semen byla zaznamenána po 24, 48 a 72 h. Byla stanovena klíčivost semen v procentech na kontrolním médiu (1/2 MS médium), na médiu s obsahem 150mmol.l⁻¹ NaCl a 400mmol.l⁻¹ sorbitolu.

Po 72 h byla vyhodnocena klíčivost semen v procentech (Tab. 4, 5, 6 a 7; Obr. 4 a 5) a po 84 h byly rostliny vyfoceny v binokulární lupě (Obr. 6). Ukázalo se, že solný i hyperosmotický stres mají vliv na klíčení semen. Klíčivost semen na kontrolním médiu byla již po 1 dni vysoká (Tab. 4, Obr. 4A), zatímco v případě 150mmol.l⁻¹ NaCl a 400mmol.l⁻¹ sorbitolu žádná semena po 1 dni nevyklíčila (Tab. 5 a 6, Obr. 4B a C). Druhý den kultivace začala klíčit i semena na médiích s NaCl a sorbitolem (Tab. 5 a 6, Obr. 4B a C), avšak klíčivost semen PRF2-GFP na médiu s NaCl byla i nadále nulová (Tab. 5, Obr. 4B). Na médiu s NaCl teprve 3. den kultivace vyklíčila část semen PRF2-GFP (Tab. 5, Obr. 4B). Po třetím dni kultivace byla klíčivost semen na kontrolním médiu nejvyšší v případě všech linií (Tab. 7, Obr. 5) a semenáčky se normálně vyvíjely a rostly (Obr. 6A). Na médiu s 400mmol.l⁻¹ sorbitolem byla klíčivost semen nižší než na kontrolním médiu, přičemž nejméně klíčila semena PRF2-GFP (Tab. 7, Obr. 5). Semenáčky měly inhibován prodlužovací růst primárních

kořenů a většina kořenů měla kořenové vlásky (Obr. 6C). Na médiu se 150mmol.l^{-1} NaCl byla klíčivost semen nejnižší u všech linií a semena PRF2-GFP měla nejnižší procento klíčivosti (Tab. 7, Obr. 5). Rostliny měly také inhibován růst primárních kořenů (Obr. 6B).

Tab. 4 Klíčivost semen vybraných linií *A. thaliana* – Col-0, pMAT-GFP a PRF2-GFP v průběhu 3 dnů kultivace na kontrolním médiu.

Den kultivace	Klíčivost (%)		
	Col-0	pMAT-GFP	PRF2-GFP
1. den	88,75	72,5	86,08
2. den	93,75	92,5	98,73
3. den	93,75	95	98,73

Tab. 5 Klíčivost semen vybraných linií *A. thaliana* – Col-0, pMAT-GFP a PRF2-GFP v průběhu 3 dnů kultivace na médiu s obsahem 150mmol.l^{-1} NaCl.

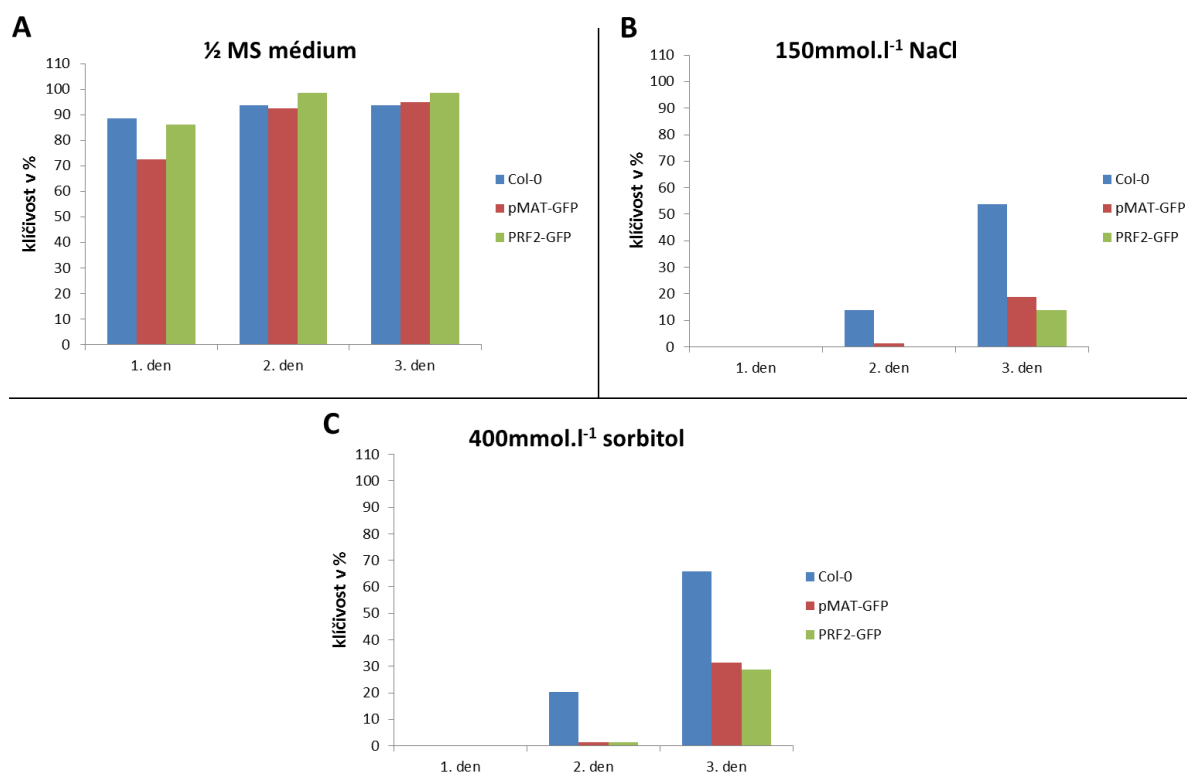
Den kultivace	Klíčivost (%)		
	Col-0	pMAT-GFP	PRF2-GFP
1. den	0	0	0
2. den	13,75	1,25	0
3. den	53,75	18,75	13,92

Tab. 6 Klíčivost semen vybraných linií *A. thaliana* – Col-0, pMAT-GFP a PRF2-GFP v průběhu 3 dnů kultivace na médiu s obsahem 400mmol.l^{-1} sorbitolu.

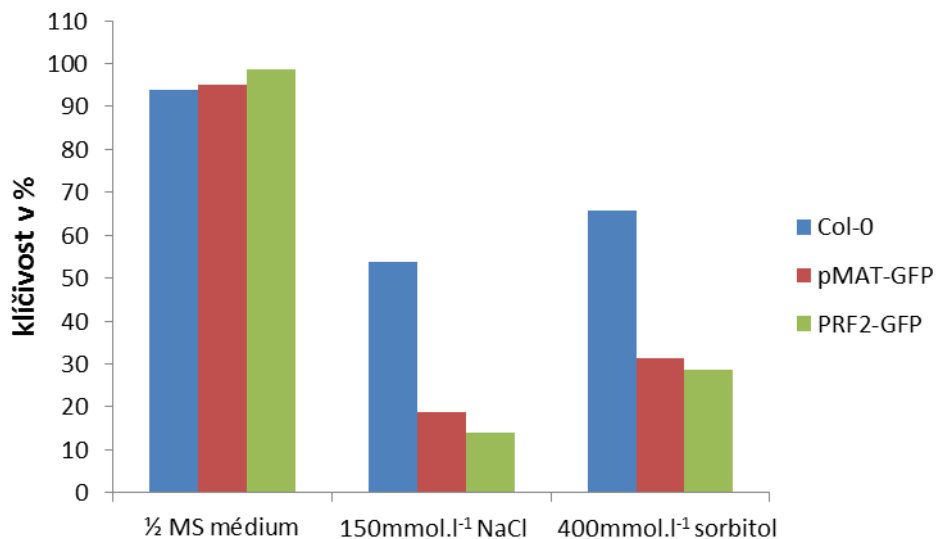
Den kultivace	Klíčivost (%)		
	Col-0	pMAT-GFP	PRF2-GFP
1. den	0	0	0
2. den	20,25	1,25	1,25
3. den	65,82	31,25	28,75

Tab. 7 Přehled klíčivosti semen vybraných linií *A. thaliana* – Col-0, pMAT-GFP a PRF2-GFP na médiích po 72 h od začátku kultivace.

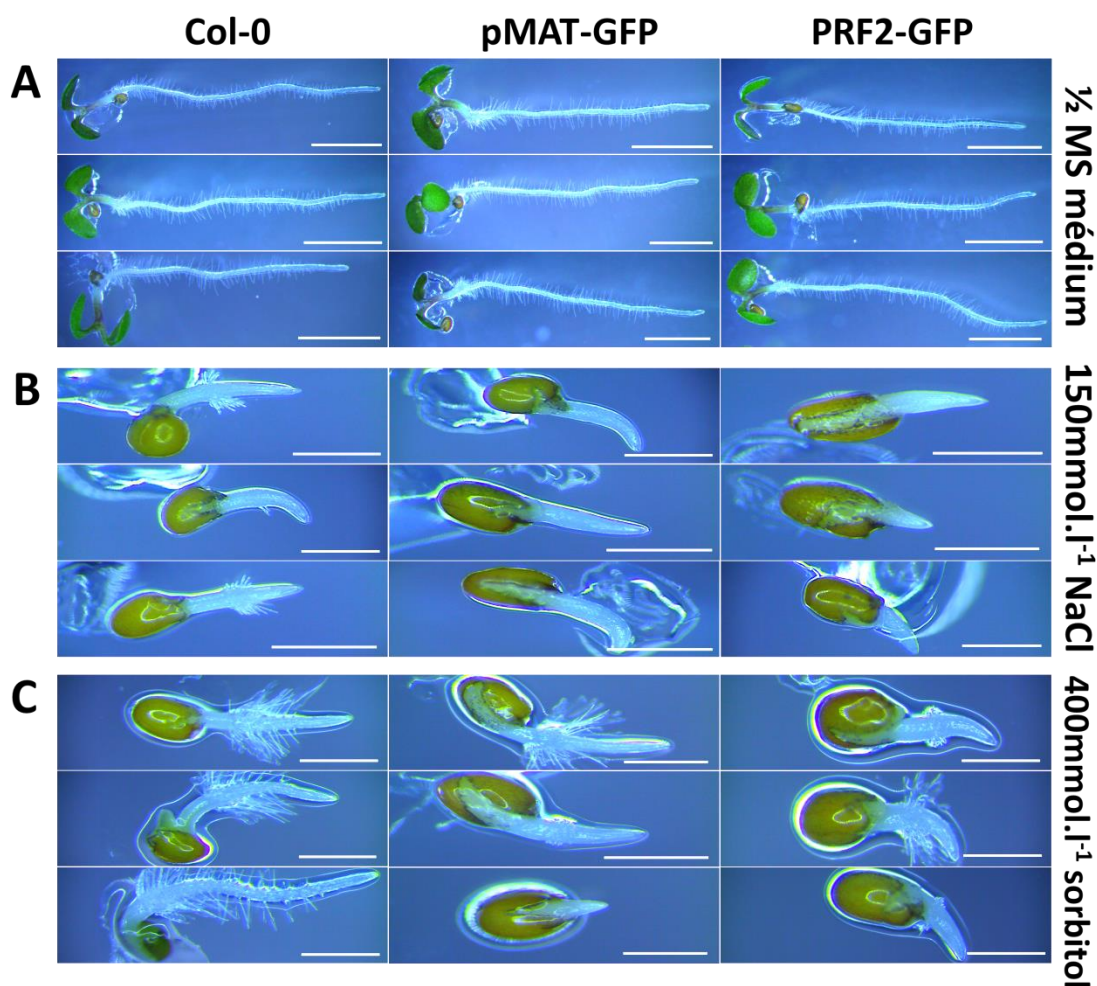
Typ média	Klíčivost (%)		
	Col-0	pMAT-GFP	PRF2-GFP
½ MS médium	93,75	95	98,73
150mmol.l ⁻¹ NaCl	53,75	18,75	13,92
400mmol.l ⁻¹ sorbitol	65,82	31,25	28,75



Obr. 4 Porovnání klíčivosti semen vybraných linií *A. thaliana* – Col-0, pMAT-GFP a PRF2-GFP. Klíčivost se sledovala po 24, 48 a 72 h od začátku kultivaci na kontrolním médiu (A), na médiu s obsahem 150mmol.l⁻¹ NaCl (B) a 400mmol.l⁻¹ sorbitolu (C).



Obr. 5 Souhrnný graf klíčivosti semen *A. thaliana* po 72 h od začátku kultivace.



Obr. 6 Detaily klíčících rostlin Col-0, pMAT-GFP a PRF2-GFP na kontrolním médiu (A), na médiu s obsahem 150mmol.l^{-1} NaCl (B) a 400mmol.l^{-1} sorbitolu (C). Semena byla zdokumentována 84 h od začátku kultivace. Meřítka odpovídají 2 mm (A) a 500 μm (B a C).

5.1.3 Vliv solného, hyperosmotického a oxidativního stresu na změny fenotypu rostlin

Pro studium změn fenotypů a viability byly použity rostliny transgenní linie PRF2-GFP a pMAT-GFP a jako kontrola rostliny Col-0. Solný stres byl navozen použitím NaCl, hyperosmotický sorbitolem a oxidativní stres byl navozen použitím PQ. Čtyřdenní semenáčky byly přeneseny na kulaté Petriho misky obsahující 75, 100 a 125mmol.l⁻¹ NaCl; 200mmol.l⁻¹ sorbitol nebo 0,1 a 0,5μmol.l⁻¹ PQ. Petriho misky byly vyfotografovány 14. a 21. den po přenosu.

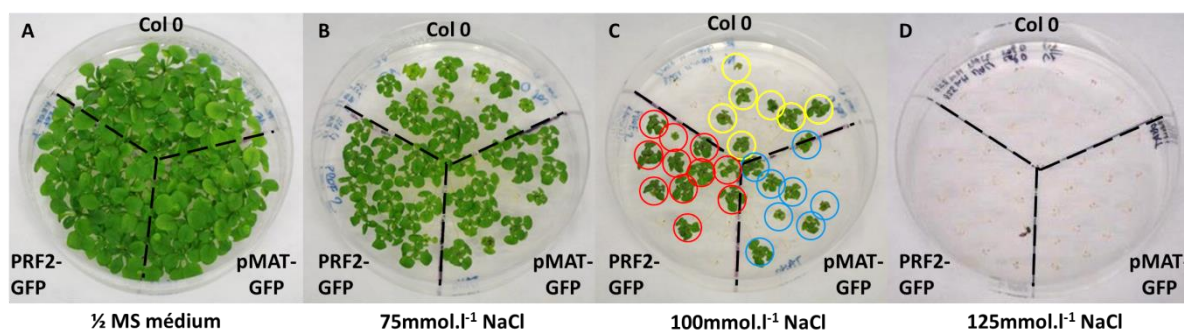
U všech koncentrací NaCl, sorbitolu i PQ byl dobře viditelný rozdíl ve fenotypu mezi rostlinami na kontrolním médiu a rostlinami pod vlivem stresů. Ve všech případech mají rostliny na kontrolním médiu větší listové růžice a bohatší kořenový systém (Obr. 7A, 8A, 9A, 10A, 11A a 12A).

V případě solného stresu lze vidět shodné změny po 14 i 21 dnech (Obr. 7 a 8). Na médiu s přidavkem 75mmol.l⁻¹ NaCl měly všechny rostliny redukovaný vývoj listové růžice a kořenového systému (Obr. 7B a 8B) v porovnání s rostlinami na kontrolním médiu (Obr. 7A a 8A). Všechny rostliny PRF2-GFP bez větších problémů přežily na tomto solném médiu (Obr. 7B a 8B). Také 93,3 % rostlin pMAT-GFP a Col-0 na tomto médiu přeživalo (Obr. 7B a 8B). Médium s přidavkem 100mmol.l⁻¹ NaCl mělo výraznější vliv na viabilitu rostlin, kdy na tomto médiu přeživalo 73,3 % rostlin PRF2-GFP, 53,3 % rostlin pMAT-GFP a jen 46,7 % rostlin Col-0 (Obr. 7C a 8C – červené, modré a žluté kruhy). V případě média s přidavkem 125mmol.l⁻¹ NaCl se všechny rostliny PRF2-GFP, pMAT-GFP i Col-0 přestaly vyvíjet a nepřežily (Obr. 7D a 8D). Z experimentů lze tedy usuzovat, že rostliny transgenní linie PRF2-GFP jsou odolnější vůči působení NaCl než rostliny Col-0 a pMAT-GFP.

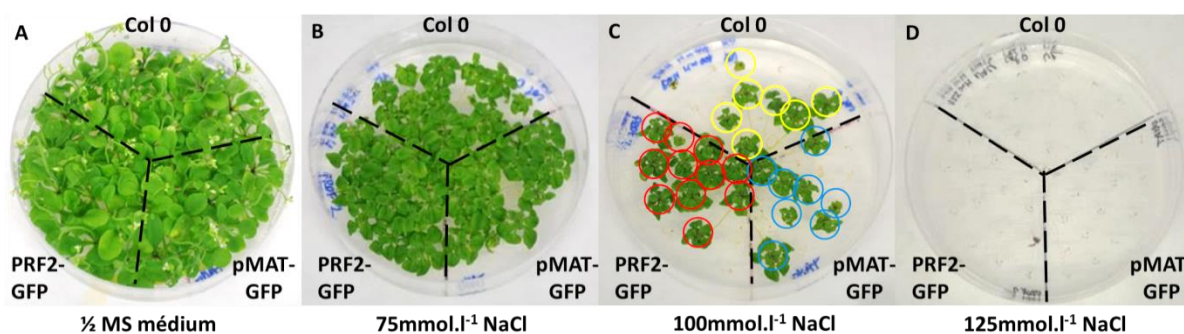
Hyperosmotický stres navozený přidáním 200mmol.l⁻¹ sorbitolu do média měl vliv na růst a fenotyp rostlin. Po 14 dnech kultivace všechny rostliny přežily, ale měly redukovaný vývoj listových růžic (Obr. 9B) oproti rostlinám na kontrolním médiu (Obr. 9A). Rostliny PRF2-GFP měly viditelně větší listové růžice v porovnání s rostlinami Col-0 a pMAT-GFP (Obr. 9B). Po 21 dnech kultivace byly rozeznatelné rostliny se žlutozelenými listovými růžicemi, které u Col-0 a pMAT-GFP tvořily shodně 40 % všech rostlin a u PRF2-GFP jen 26,7 % (Obr. 10B – žluté, modré a červené kruhy). Ostatní rostliny měly tmavě zelené růžice. Rostliny transgenní linie PRF2-GFP jsou odolnější i vůči působení sorbitolu než rostliny Col-0 a pMAT-GFP.

V případě oxidativního stresu navozeného přidáním PQ do média byl po 14 dnech kultivace viditelný rozdíl ve fenotypu mezi kontrolním médiem a oběma koncentracemi PQ.

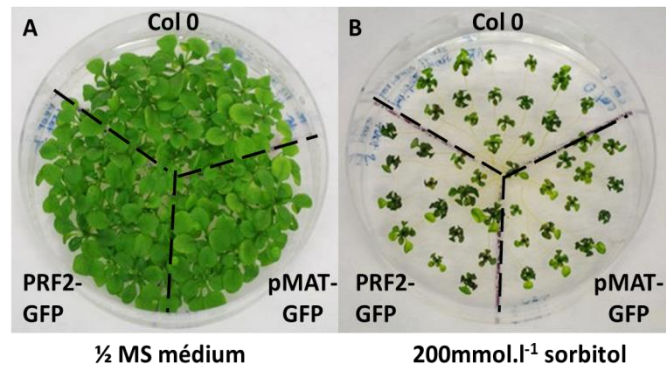
Na médiu s přidavkem $0,1\mu\text{mol.l}^{-1}$ PQ všechny rostliny přežily, měly však zřejmě menší listové růžice (Obr. 11B) než rostliny na kontrolním médiu (Obr. 11A). Větší vliv na růst rostlin měl $0,5\mu\text{mol.l}^{-1}$ PQ, kdy 86,7 % rostlin PRF2-GFP přeživalo a dále se vyvíjelo, u Col-0 to činilo 80 % a u pMAT-GFP jen 68,8 % (Obr. 11C – červené, žluté a modré kruhy). U ostatních rostlin došlo k redukci růstu listové růžice a kořenů. Po 21 dnech kultivace nastaly změny na médiu s $0,1\mu\text{mol.l}^{-1}$ PQ, kdy se 100 % rostlin PRF2-GFP stále dobře vyvíjelo a kvetlo. U pMAT-GFP to bylo jen 93,3 % a u Col-0 86,7 % (Obr. 12B – červené, žluté a modré kruhy). Na médiu s $0,5\mu\text{mol.l}^{-1}$ PQ přeživalo a kvetlo 80 % rostlin PRF2-GFP, 53,3 % rostlin Col-0 a pouze 43,8 % rostlin pMAT-GFP (Obr. 12C – červené, žluté a modré kruhy). Výsledky ukazují, že rostliny PRF2-GFP jsou odolnější vůči oxidativnímu stresu než rostliny Col-0 a pMAT-GFP.



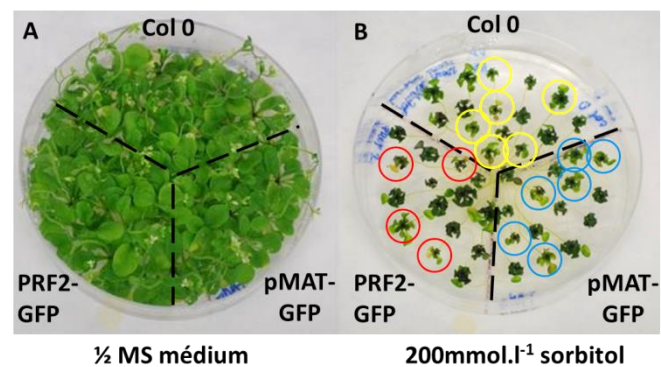
Obr. 7 Vliv solného stresu na vybrané linie *A. thaliana* – Col-0, pMAT-GFP a PRF2-GFP po 14 dnech kultivace na kontrolním médiu (A), médiu s obsahem 75 (B), 100 (C) a 125mmol.l^{-1} NaCl (D).



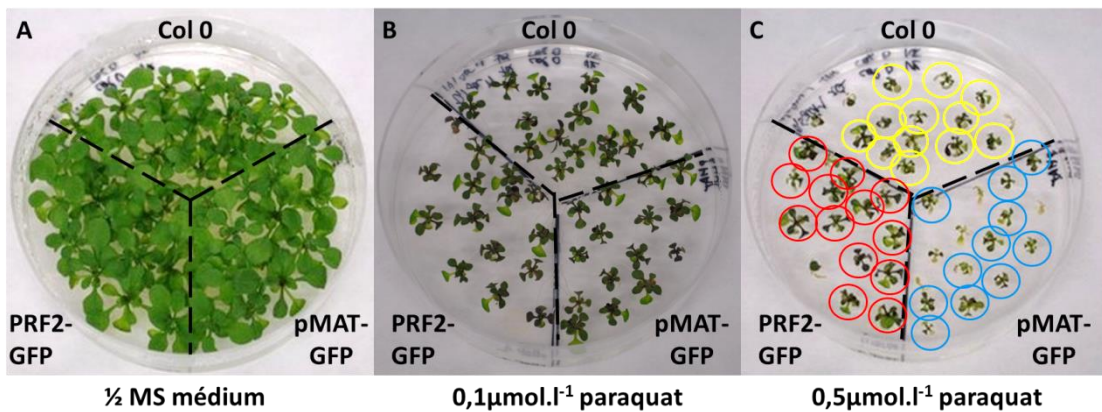
Obr. 8 Vliv solného stresu na vybrané linie *A. thaliana* – Col-0, pMAT-GFP a PRF2-GFP po 21 dnech kultivace na kontrolním médiu (A), médiu s obsahem 75 (B), 100 (C) a 125mmol.l^{-1} NaCl (D).



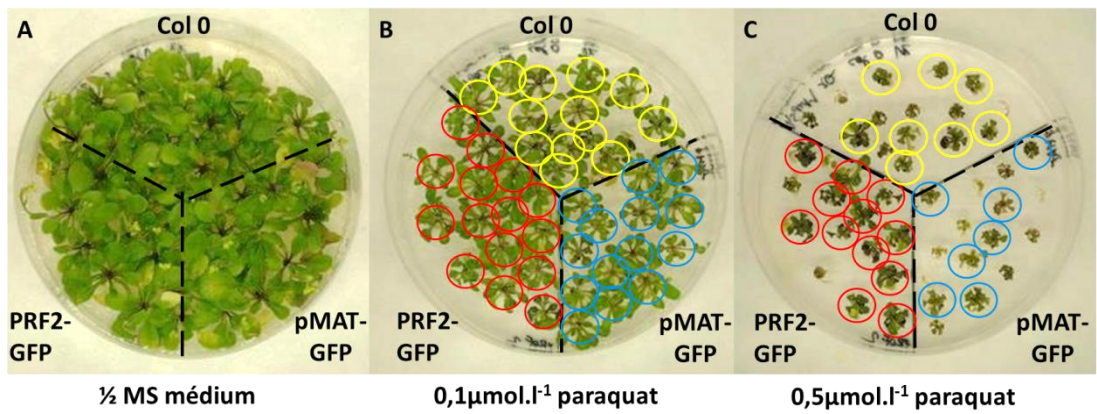
Obr. 9 Vliv hyperosmotického stresu na vybrané linie *A. thaliana* – Col-0, pMAT-GFP a PRF2-GFP po 14 dnech kultivace na kontrolním médiu (A) a médiu s obsahem 200mmol.l⁻¹ sorbitolu (B).



Obr. 10 Vliv hyperosmotického stresu na vybrané linie *A. thaliana* – Col-0, pMAT-GFP a PRF2-GFP po 21 dnech kultivace na kontrolním médiu (A) a médiu s obsahem 200mmol.l⁻¹ sorbitolu (B).



Obr. 11 Vliv oxidativního stresu na vybrané linie *A. thaliana* – Col-0, pMAT-GFP a PRF2-GFP po 14 dnech kultivace na kontrolním médiu (A), médiu s obsahem 0,1 (B) a 0,5 μmol.l⁻¹ PQ (C).

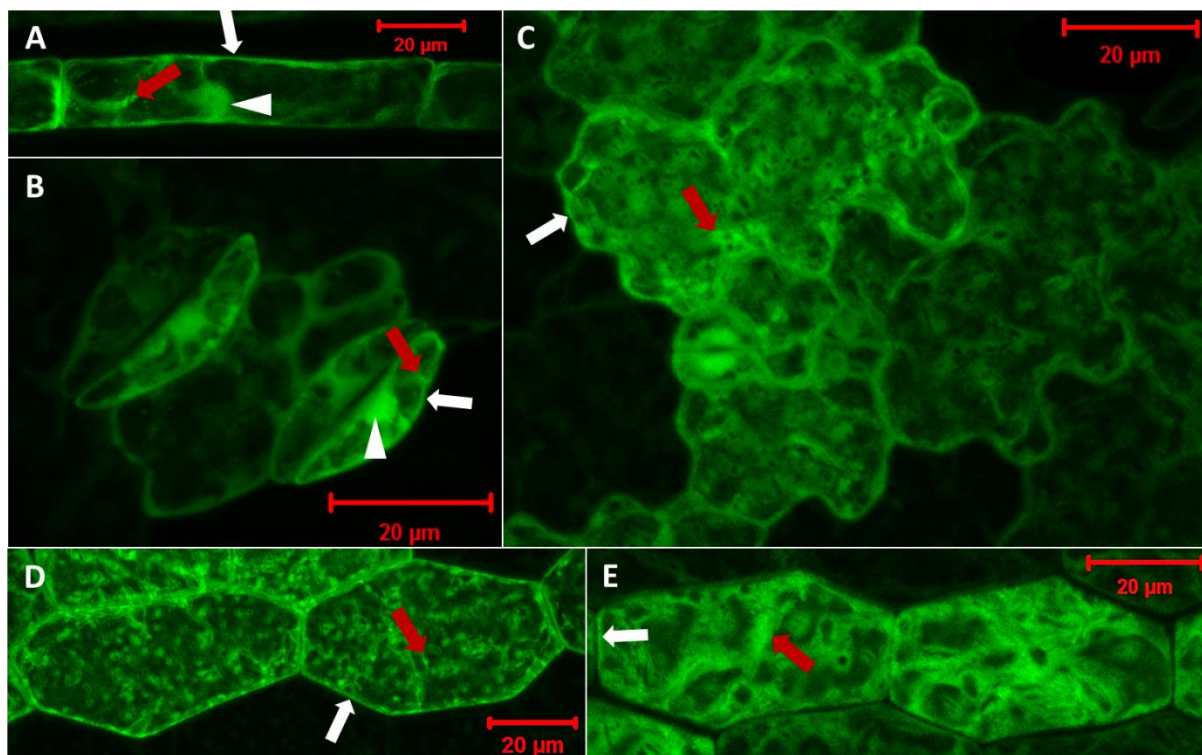


Obr. 12 Vliv oxidativního stresu na vybrané linie *A. thaliana* – Col-0, pMAT-GFP a PRF2-GFP po 21 dnech kultivace na kontrolním médiu (A), médiu s obsahem 0,1 (B) a 0,5 μmol.l⁻¹ PQ (C).

5.2 *In vivo* lokalizace PRF2-GFP v odpovědi na působení inhibitorů cytoskeletu

5.2.1 Lokalizace PRF2-GFP v buňkách *A. thaliana* v kontrolních podmínkách

Při mikroskopii živých buněk semenáčků byl fúzní protein profilinu 2 s GFP (PRF2-GFP) lokalizován v cytoplazmě, na cytoplazmatické membráně a v jaderné membráně (Obr. 13A, B, C, D a E).

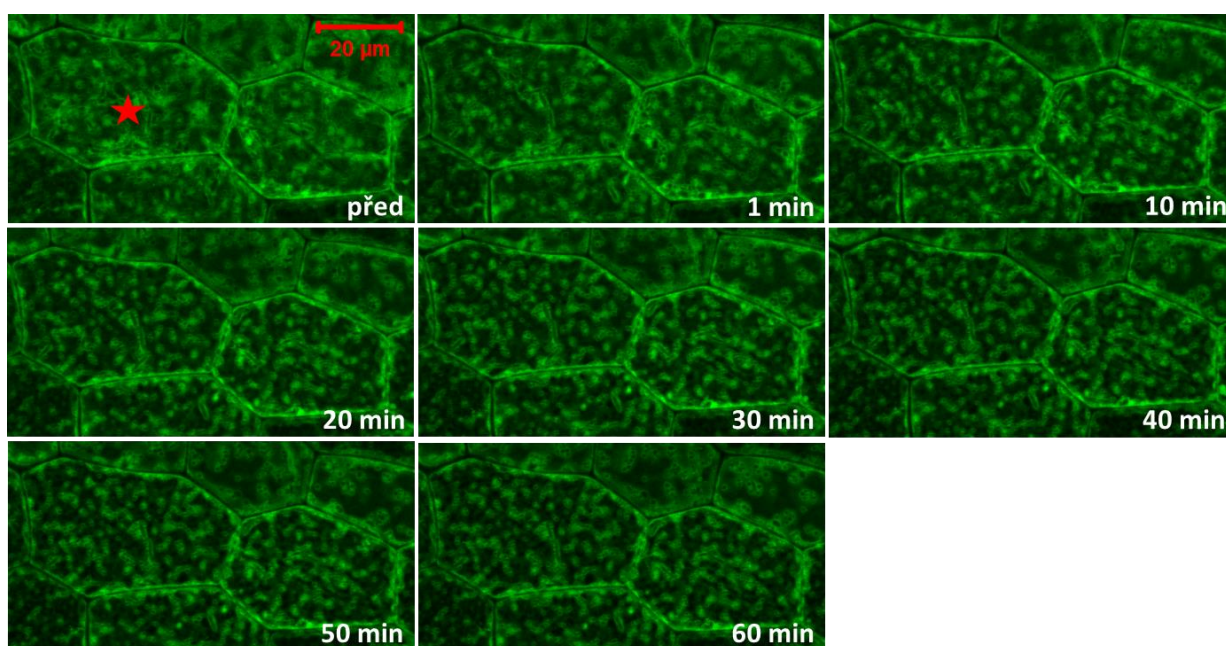


Obr. 13 *In vivo* lokalizace PRF2-GFP v kořenových buňkách (A), svěracích buňkách průduchů (B), buňkách kotyledonů (C) a hypokotylu (D a E) *A. thaliana* v laserovém skenovacím konfokálním mikroskopu LSM 710 při zvětšení 400x. Červené šipky znázorňují lokalizaci profilinu 2 v cytoplazmě, bílé šipky v cytoplazmatické membráně a trojúhelníky v jaderné membráně. Měřítko odpovídá 20 μm .

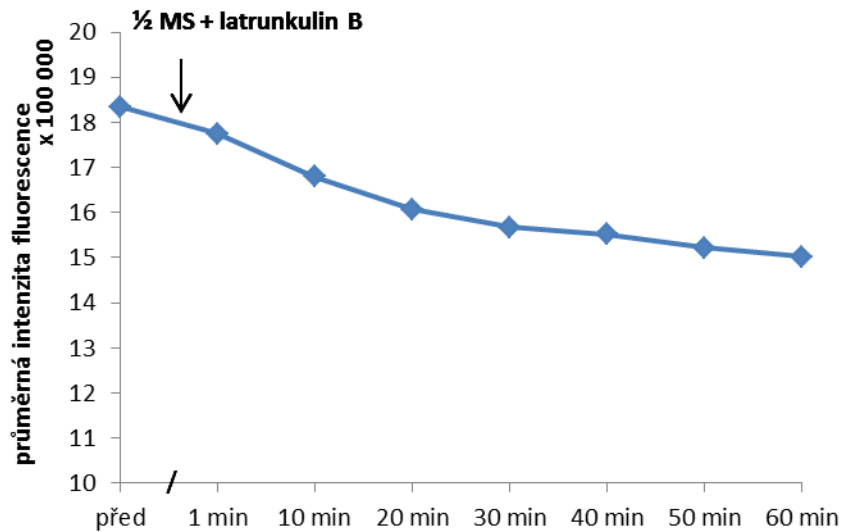
5.2.2 Vliv inhibitorů cytoskeletu na buňky *A. thaliana*

Na studium aktinového cytoskeletu a MT a možných interakcí s profilinem 2 byl použit latrunkulin B o koncentraci 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, způsobující depolymerizaci AF, oryzalin o koncentraci 2 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, způsobující depolymerizaci MT a taxol o koncentraci 1 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, způsobující stabilizaci MT. Tří- až pětidenní semenáčky PRF2-GFP byly vystaveny působení inhibitorů a v průběhu celého experimentu byly snímány stejné buňky před i po aplikaci latrunkulinu B (Obr. 14), oryzalinu (Obr. 18) nebo taxolu (Obr. 22). V případě latrunkulinu B a oryzalinu se buňky snímaly každých 10 min v průběhu 60 min. V případě taxolu se buňky

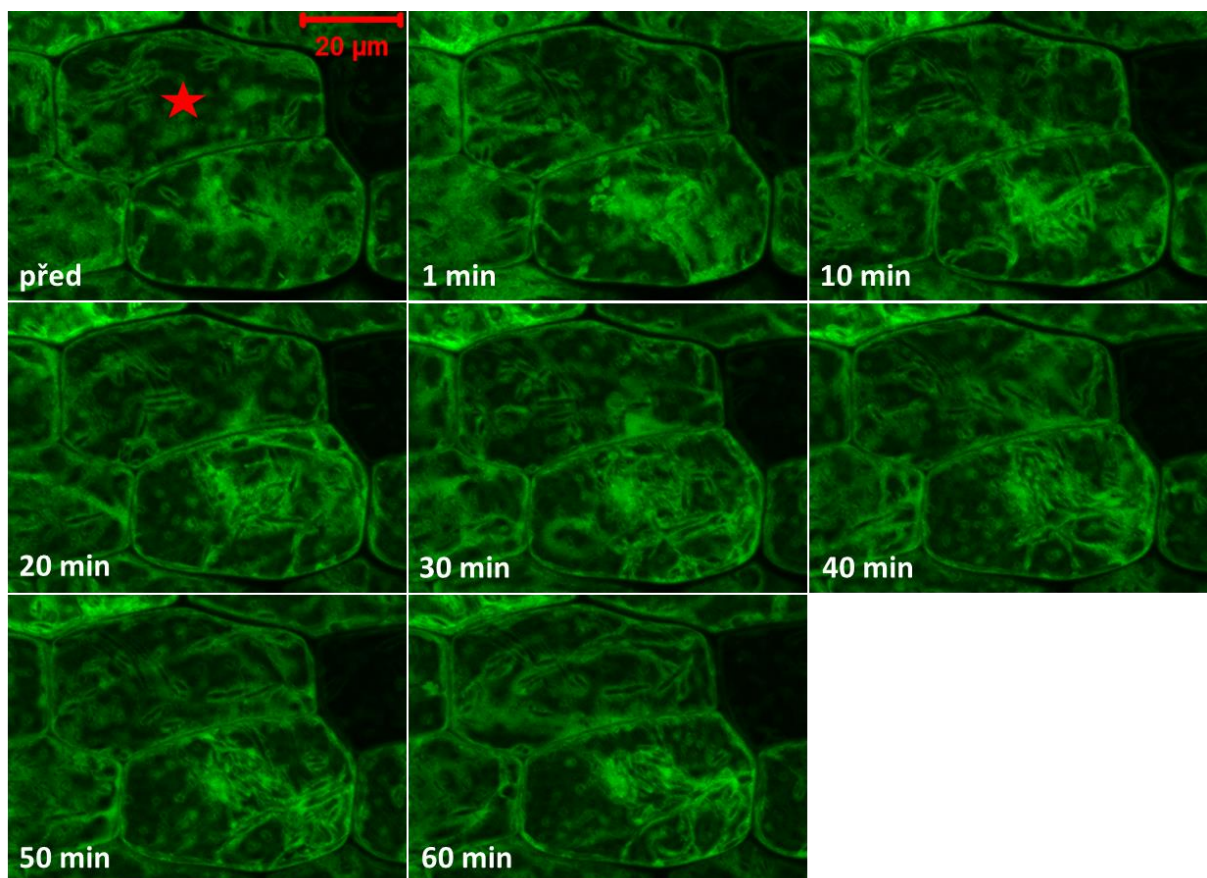
snímaly každých 10 min v průběhu 60 min a následně byl roztok taxolu vymyt tekutým $\frac{1}{2}$ MS médiem pro sledování návratu buněk do původního stavu. Pro každý experiment byla provedena kontrola, a to s použitím tekutého $\frac{1}{2}$ MS média s přidavkem DMSO o patřičném objemu (Obr. 16, 20 a 24). Byly sledovány změny intenzity fluorescence PRF2-GFP v průběhu experimentu. Latrunkulin B a oryzalin způsobily pokles intenzity fluorescence (Obr. 14, 15, 18 a 19). Taxol způsobil naopak nárůst intenzity fluorescence a po vymytí roztoku taxolu došlo přibližně po 40 min k návratu hodnoty fluorescence do původního stavu před aplikací taxolu (Obr. 22 a 23). U kontroly intenzita fluorescence nepatrně kolísala v průběhu experimentu, avšak po 60 min inkubace byla stejná jako na začátku experimentu (Obr. 16, 17, 20, 21 24 a 25).



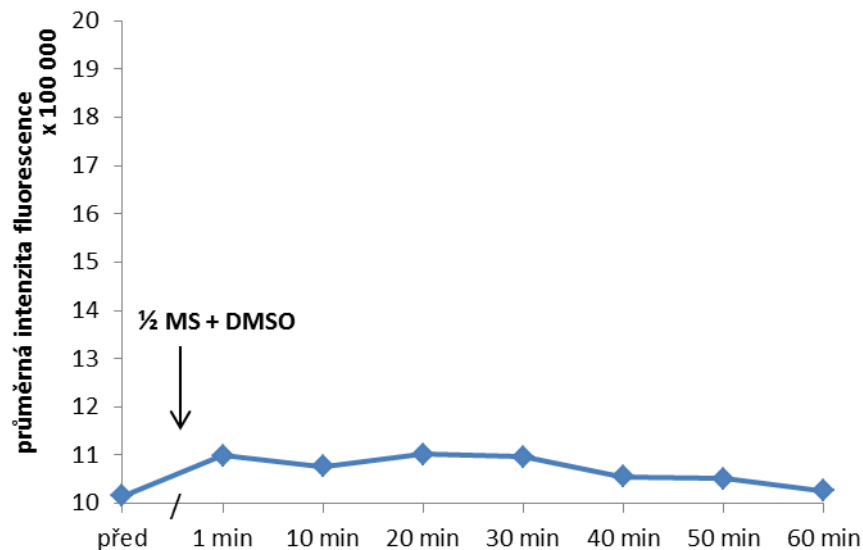
Obr. 14 Vliv latrunkulinu B ($10\mu\text{mol.l}^{-1}$) na změnu fluorescence v hypocotylových buňkách semenáčků transgenní linie PRF2-GFP. Červená hvězda znázorňuje buňku, ve které byla měřena intenzita fluorescence před a v průběhu 60 min inkubace s latrunkulinem B. Měřítko odpovídá $20\mu\text{m}$.



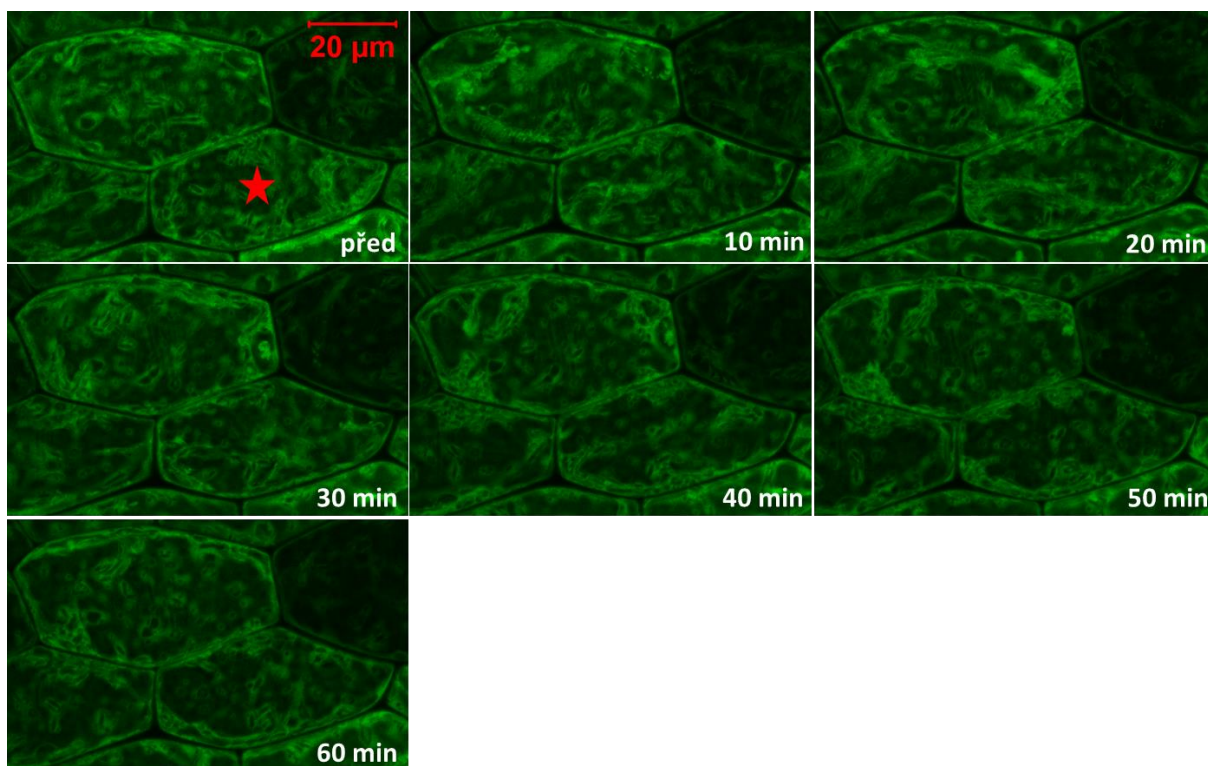
Obr. 15 Průměrná intenzita fluorescence v hypocotylových buňkách semenáčků transgenní linie PRF2-GFP před a v průběhu 60 min inkubace s latrunkulinem B. Intenzita fluorescence byla měřena v programu ImageJ a zpracována v Microsoft Excel.



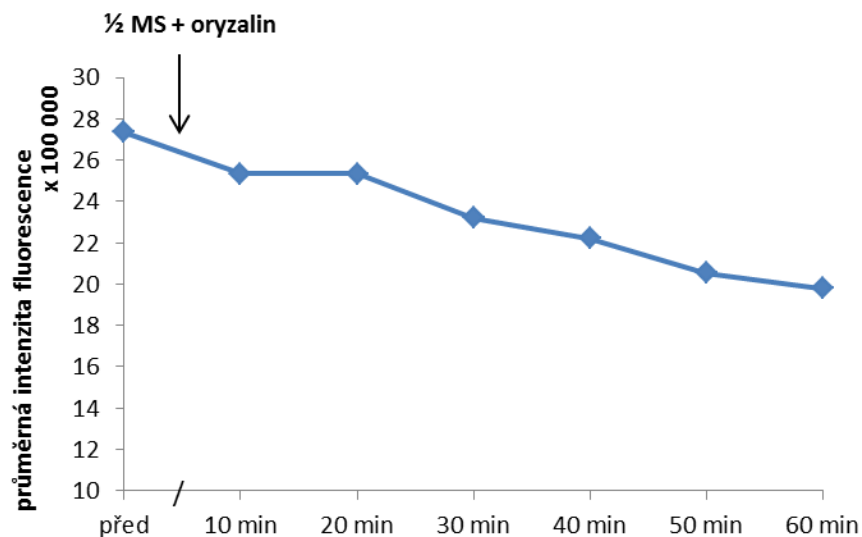
Obr. 16 Vliv DMSO ($10\mu\text{mol.l}^{-1}$) na změnu intenzity fluorescence v hypocotylových buňkách semenáčků transgenní linie PRF2-GFP. Červená hvězda znázorňuje buňku, ve které byla měřena intenzita fluorescence před a v průběhu 60 min inkubace s DMSO. Měřítka odpovídá $20\mu\text{m}$.



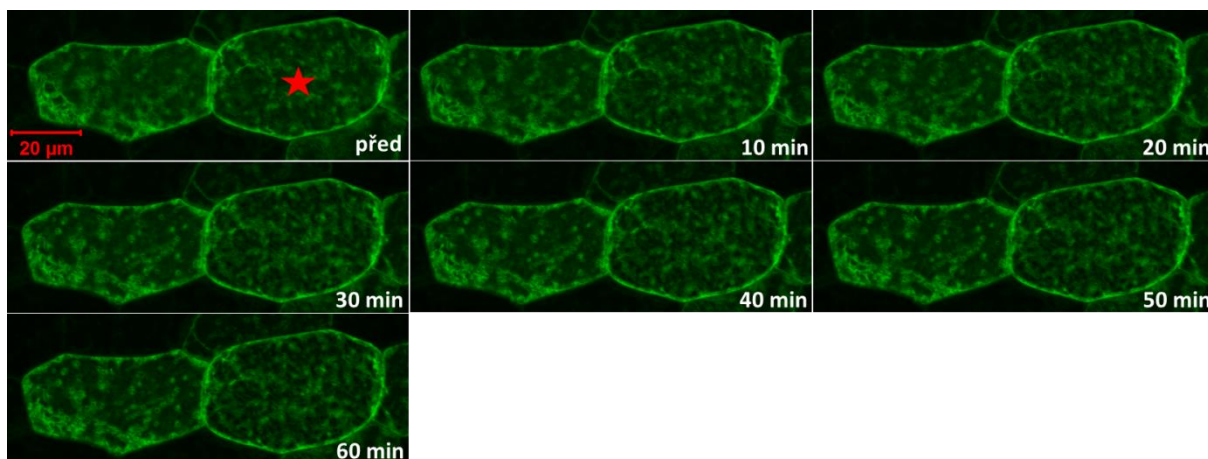
Obr. 17 Průměrná intenzita fluorescence v hypocotylových buňkách semenáčků transgení linie PRF2-GFP před a v průběhu 60 min inkubace s DMSO. Intenzita fluorescence byla měřena v programu ImageJ a zpracována v Microsoft Excel.



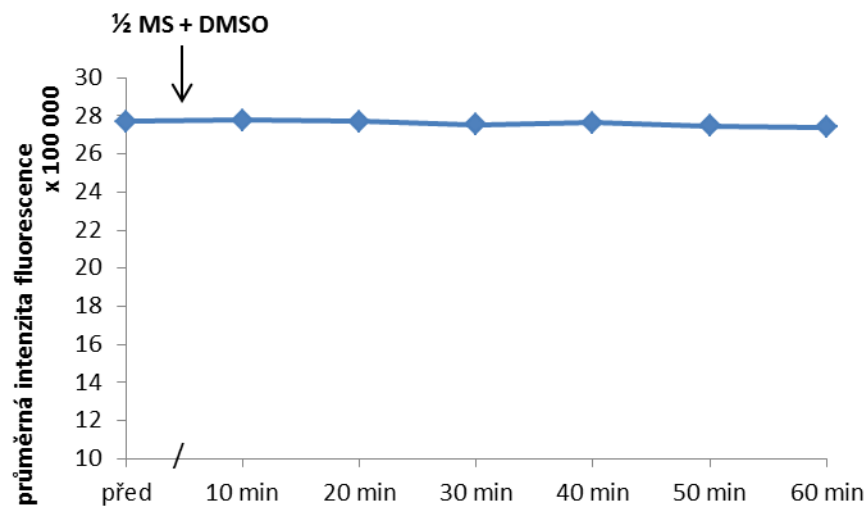
Obr. 18 Vliv oryzalinu ($2\mu\text{mol.l}^{-1}$) na změnu fluorescence v hypocotylových buňkách semenáčků transgení linie PRF2-GFP. Červená hvězda znázorňuje buňku, ve které byla měřena intenzita fluorescence před a v průběhu 60 min inkubace s oryzalinem. Měřítka odpovídá $20\mu\text{m}$.



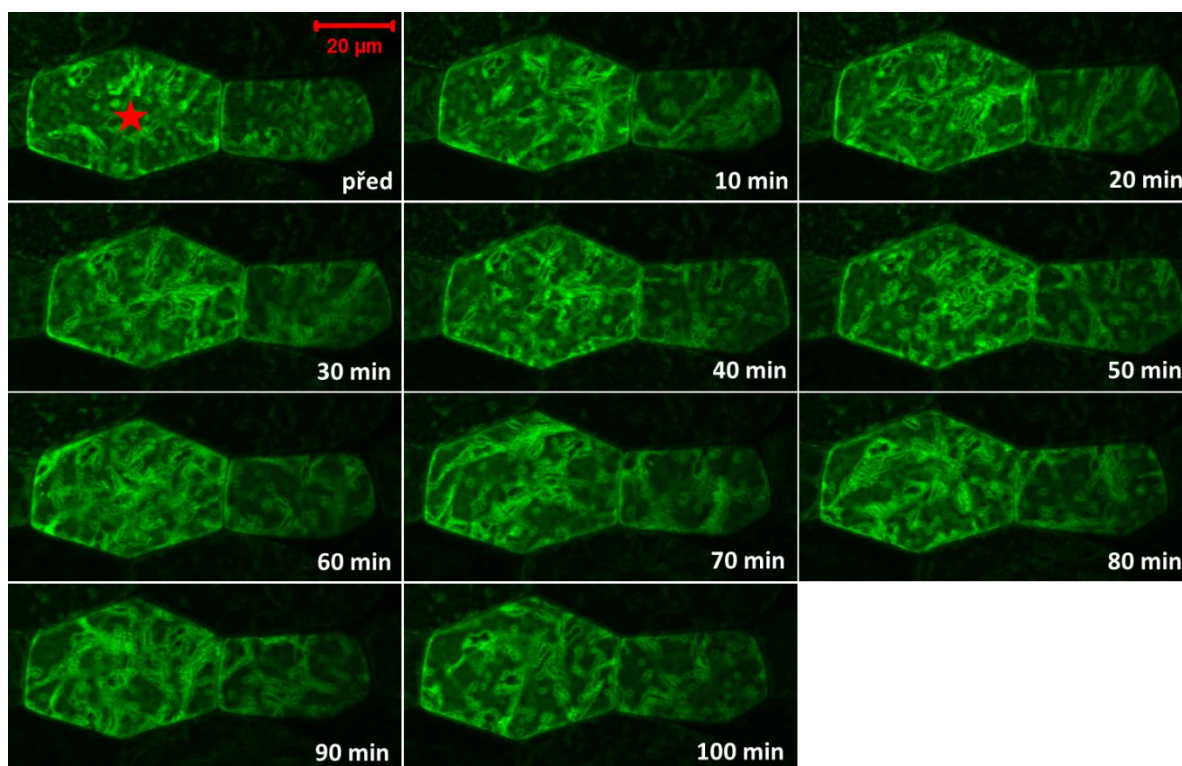
Obr. 19 Průměrná intenzita fluorescence v hypocotylových buňkách semenáčků transgenní linie PRF2-GFP před a v průběhu 60 min inkubace s oryzalinem. Intenzita fluorescence byla měřena v programu ImageJ a zpracována v Microsoft Excel.



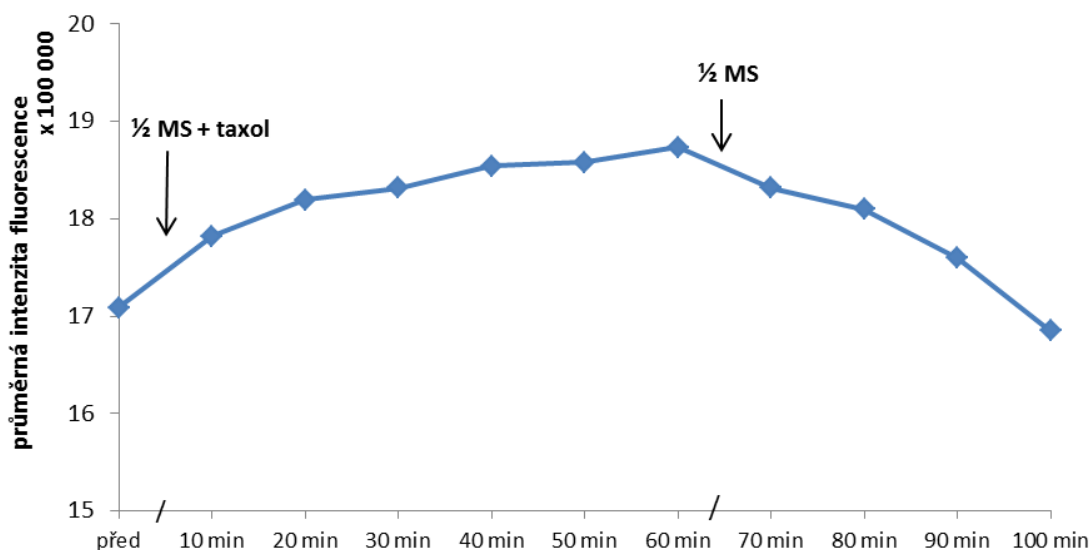
Obr. 20 Vliv DMSO ($2\mu\text{mol.l}^{-1}$) na změnu fluorescence v hypocotylových buňkách semenáčků transgenní linie PRF2-GFP. Červená hvězda znázorňuje buňku, ve které byla měřena intenzita fluorescence před a v průběhu 60 min inkubace s DMSO. Měřítko odpovídá $20\mu\text{m}$.



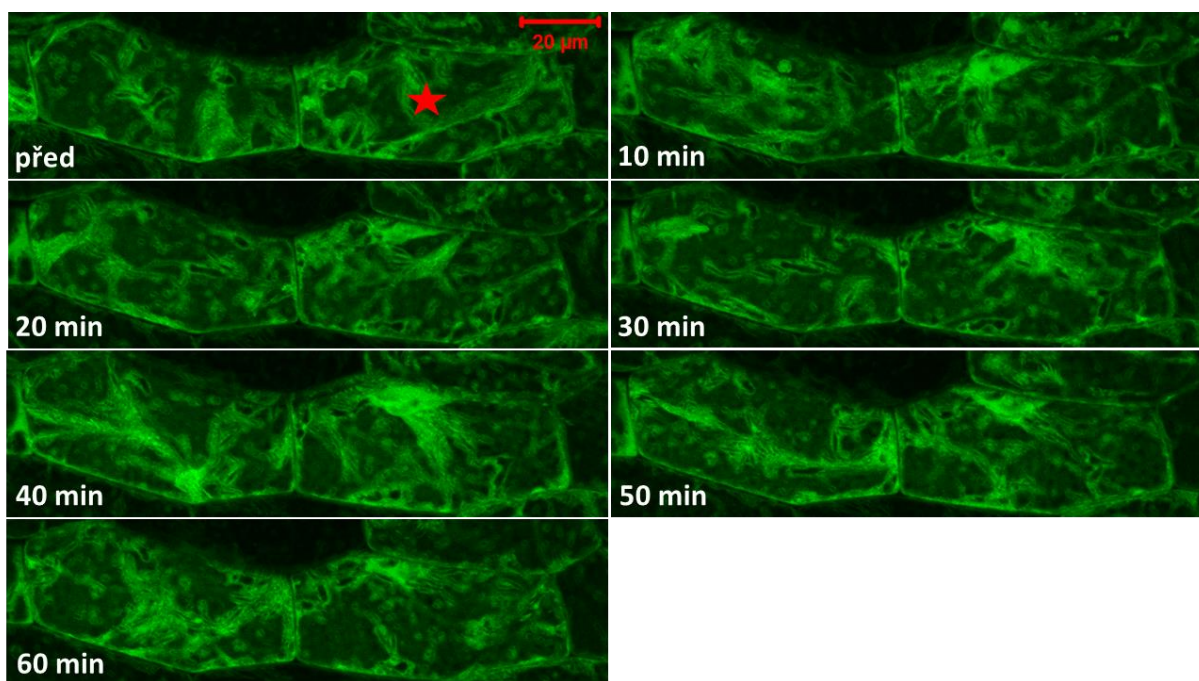
Obr. 21 Průměrná intenzita fluorescence v hypocotylových buňkách semenáčků transgenní linie PRF2-GFP před a v průběhu 60 min inkubace s DMSO. Intenzita fluorescence byla měřena v programu ImageJ a zpracována v Microsoft Excel.



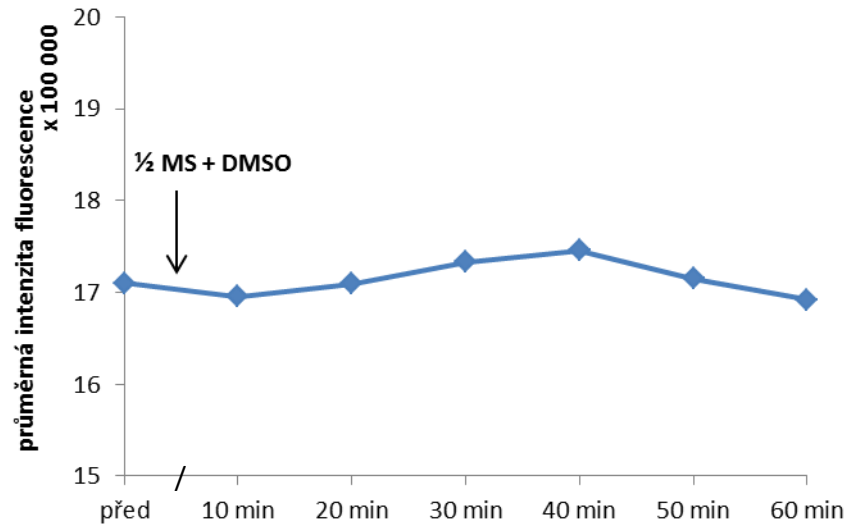
Obr. 22 Vliv taxolu ($1\mu\text{mol.l}^{-1}$) na změnu fluorescence v hypocotylových buňkách semenáčků transgenní linie PRF2-GFP. Červená hvězda znázorňuje buňku, ve které byla měřena intenzita fluorescence před, v průběhu 60 min inkubace s taxolem a následně v průběhu dalších 50 min po vymytí taxolu ½ MS médiem. Měřítka odpovídá 20 µm.



Obr. 23 Průměrná intenzita fluorescence v hypokotylových buňkách semenáčků transgenní linie PRF2-GFP před, v průběhu 60 min inkubace s taxolem a následně v průběhu dalších 40 min po vymytí taxolu ½ MS médiem. Intenzita fluorescence byla měřena v programu ImageJ a zpracována v Microsoft Excel .



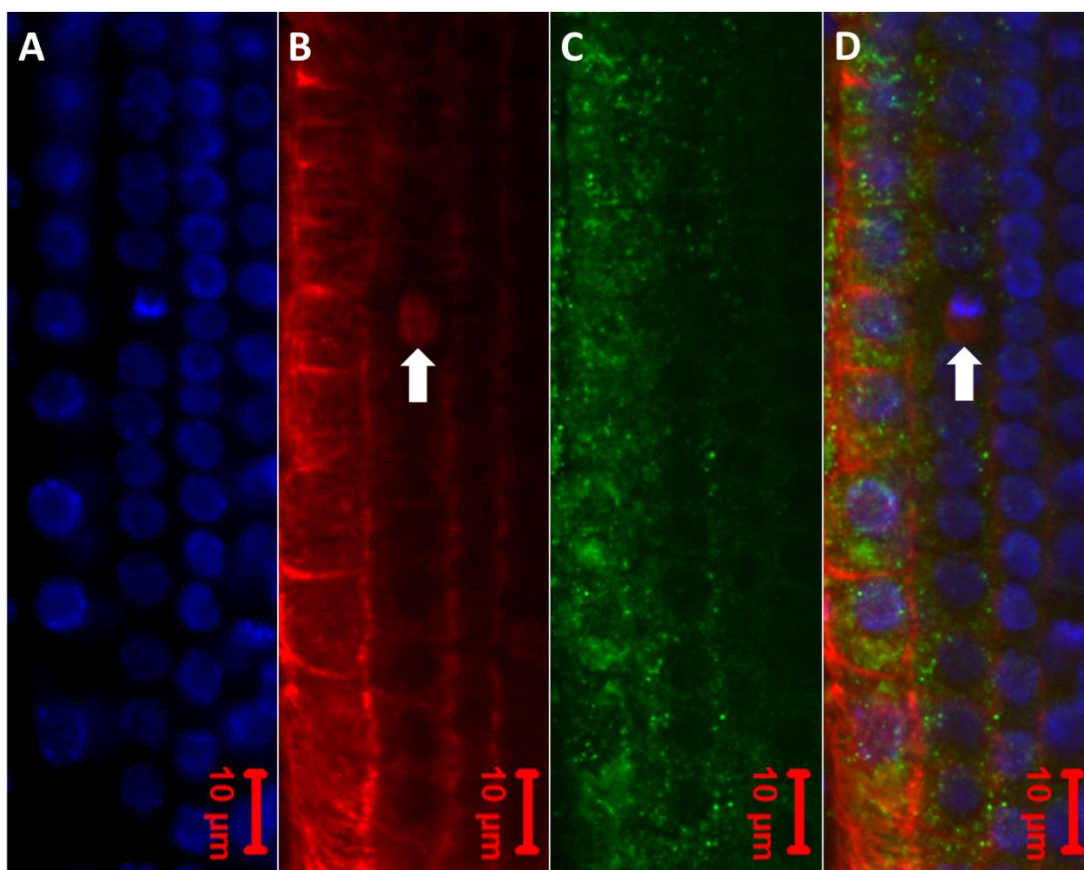
Obr. 24 Vliv DMSO ($1\mu\text{mol.l}^{-1}$) na změnu fluorescence v hypokotylových buňkách semenáčků transgenní linie PRF2-GFP. Červená hvězda znázorňuje buňku, ve které byla měřena intenzita fluorescence před a v průběhu 60 min inkubace s DMSO. Měřítko odpovídá $20\mu\text{m}$.



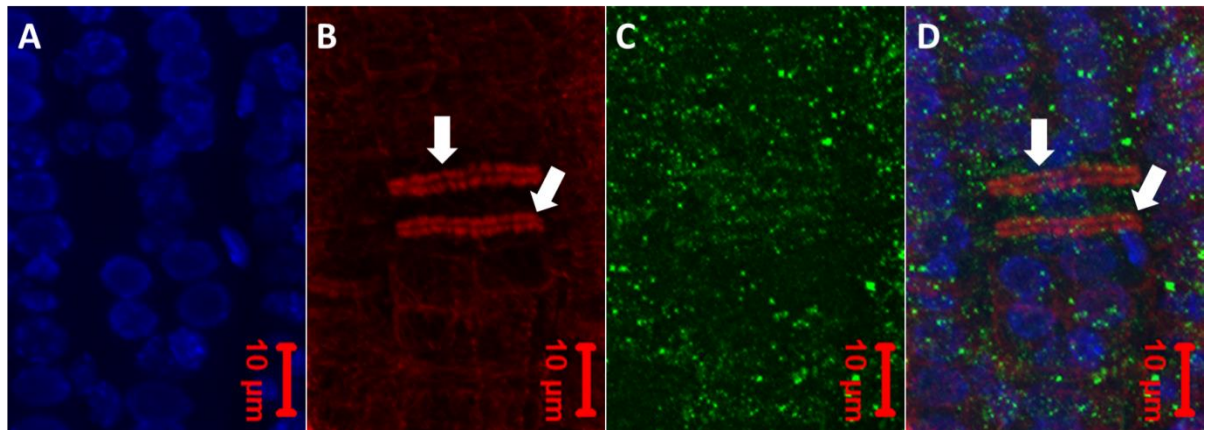
Obr. 25 Průměrná intenzita fluorescence v hypokotylových buňkách semenáčků transgenní linie PRF2-GFP před a v průběhu 60 min inkubace s DMSO. Intenzita fluorescence byla měřena v programu ImageJ a zpracována v Microsoft Excel.

5.3 Imunocytochemické studium cytoskeletu u transgenní linie PRF2-GFP metodou „whole mount“

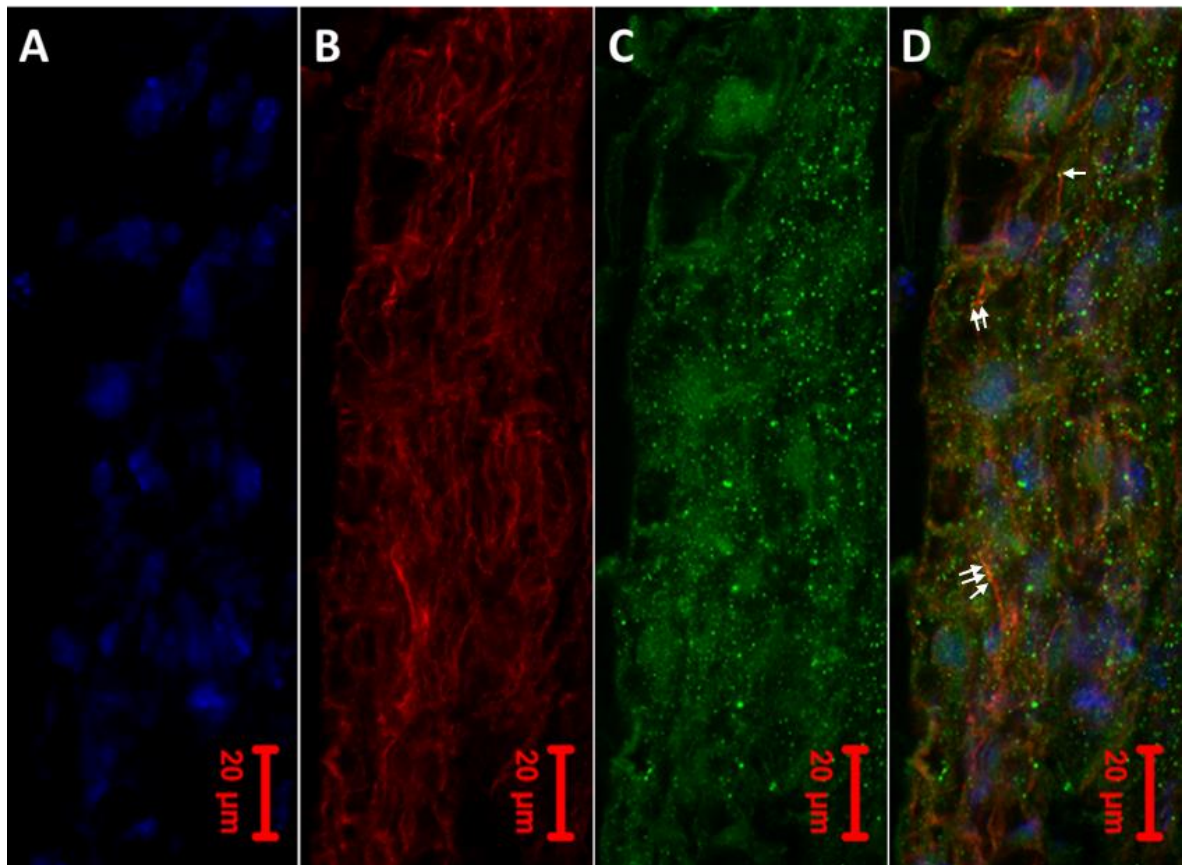
Metoda „whole mount“ byla použita pro imunocytochemické studium organizace MT a AF v epidermálních kořenových buňkách transgenní linie PRF2-GFP. MT byly vizualizovány pomocí primární protilátky proti α -tubulinu, AF byla vizualizována pomocí primární protilátky proti aktinu, PRF2-GFP byl vizualizován pomocí primární protilátky proti GFP a DNA byla vizualizována pomocí DAPI. Některé meristemické buňky byly mitoticky (Obr. 26) nebo cytokineticky (Obr. 27) aktivní. Bylo pozorováno mitotické vřeténko s chromozómy (Obr. 26B a D – šipky) a fragmoplasty (Obr. 27B a D – šipky). Taktéž byla zachycena i AF (Obr. 28) a je viditelná částečná kolokalizace AF s PRF2-GFP (Obr. 28D – šipky).



Obr. 26 Imunolokalizace MT a PRF2-GFP v epidermálních kořenových buňkách semenáčků transgenní linie PRF2-GFP. Lokalizace DNA a jader (A), MT (B), PRF2-GFP (C) a sloučené obrázky (D). Šipky ukazují na mitotické vřeténko (B a D). Meřítka odpovídají 10 μ m.



Obr. 27 Imunolokalizace MT a PRF2-GFP v epidermálních kořenových buňkách semenáčků transgenní linie PRF2-GFP. Lokalizace DNA a jader (A), MT (B), PRF2-GFP (C) a sloučené obrázky (D). Šipky ukazují na fragmoplasty (B a D). Meřítka odpovídají 10 μm .



Obr. 28 Imunolokalizace AF a PRF2-GFP v epidermálních kořenových buňkách semenáčků transgenní linie PRF2-GFP. Lokalizace DNA a jader (A), AF (B), PRF2-GFP (C) a částečná kolokalizace AF s PRF2-GFP ve sloučeném obrázku (D, šipky). Meřítka odpovídají 20 μm .

6 Diskuze

Prvním úkolem bakalářské práce byla fenotypová charakterizace vybraných linií *A. thaliana* vystavených abiotickému stresu. V experimentech byly použity jako kontrola rostliny Col-0 a rostliny transgenní linie pMAT-GFP, exprimující chimérický gen pro cytoplazmatický fúzní protein s GFP, a rostliny transgenní linie PRF2-GFP, exprimující PRF2 pod 35S promotorem. V průběhu experimentů byl sledován vliv solného (NaCl), hyperosmotického (sorbitol) a oxidativního stresu (PQ) na růst a vývoj rostlin všech linií.

NaCl má dva hlavní efekty na rostliny – osmotický stres, který rostlinným buňkám brání přijímat vodu a důležité minerály, a iontový stres, kdy Na^+ a Cl^- toxicky ovlivňují buněčné membrány a metabolismus (Kader *et* Lindberg, 2010). Solný stres způsobuje redukci růstu rostlin, celkové plochy listů a kořenového systému (Chartzoulakis *et* Klapaki, 2000), což je v souladu s našimi pozorováními (Obr. 3,7,8). Média s obsahem 75 a 100mmol.l⁻¹ NaCl nebo 200mmol.l⁻¹ sorbitolu měla srovnatelný vliv na inhibici prodlužovacího růstu primárního kořene rostlin Col-0 i PRF2-GFP (Obr. 2B, C a D). Solný a hyperosmotický stres mají vliv i na klíčivost semen všech testovaných linií. Po třech dnech kultivace na kontrolním médiu semena transgenní linie PRF2-GFP měla procento klíčivosti srovnatelné s ostatními liniemi (Obr. 5). Vlivem 150mmol.l⁻¹ NaCl a 400mmol.l⁻¹ sorbitolu však byla klíčivost semen transgenní linie PRF2-GFP menší než u semen rostlin Col-0 a pMAT-GFP (Obr. 5). Z těchto výsledků lze usuzovat, že transgenní linie PRF2-GFP má vyšší citlivost na klíčení v podmínkách solného a hyperosmotického stresu v porovnání s rostlinami Col-0 a pMAT-GFP. Solný a hyperosmotický stres mají vliv i na změny fenotypů a viabilitu studovaných linií. Rostliny kultivovány dlouhodobě na médiích s přídavkem NaCl a sorbitolu měly v porovnání s kontrolními rostlinami menší listové růžice a méně vyvinutý kořenový systém, případně vůbec nepřežily (Obr. 8, 10). Rostliny na médiích s obsahem 75, 100 i 125mmol.l⁻¹ NaCl měly tendenci ztrácet chlorofyl (Obr. 7 a 8), což je v souladu s literaturou (Agastian *et al.*, 2000). Na médiích s obsahem 75 a 100mmol.l⁻¹ NaCl měly rostliny transgenní linie PRF2-GFP nejvyšší viabilitu ze všech testovaných linií (Obr. 8 B a C). Na médiu s přídavkem 125mmol.l⁻¹ NaCl již nepřežily žádné rostliny (Obr. 8D). Médium s přídavkem 200mmol.l⁻¹ sorbitolu mělo vliv i na barvu nadzemních částí rostlin a u transgenní linie PRF2-GFP se vyskytovalo menší procento rostlin se žlutozelenými listovými růžicemi než u linií Col-0 a pMAT-GFP (Obr. 10B). Rostliny PRF2-GFP měly také větší listové růžice v porovnání s ostatními liniemi (Obr. 10B). Sledování vlivu solného a hyperosmotického stresu na viabilitu a změny fenotypů rostlin ukázalo, že transgenní linie PRF2-GFP je odolnější vůči

působení NaCl a sorbitolu než rostliny Col-0 a pMAT-GFP. Oxidativní stres, vyvolaný PQ, taktéž ovlivňoval viabilitu a změny fenotypů rostlin. Za normálních podmínek buňky produkují ROS, které jsou přirozenou součástí různých buněčných procesů, jako jsou růst buněk, apoptóza a senescence (Finkel, 2003). Nicméně nadprodukce ROS toxicky ovlivňuje buňky a brání rostlinám v normálním růstu a vývoji, což ukázaly i výsledky našich experimentů. Z výsledků vyplývá, že transgenní linie PRF2-GFP je odolnější vůči oxidativnímu stresu než linie Col-0 a pMAT-GFP. Po 21 dnech kultivace na médiích obsahujících 0,1 a 0,5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ PQ měla transgenní linie PRF2-GFP větší procento přežívajících a dobře se vyvíjejících rostlin než linie pMAT-GFP a Col-0 (Obr. 12B a C).

Profilin je malý aktin vázající protein, který má komplexní efekty na dynamiku aktinového cytoskeletu (Fan *et al.*, 2013). Profiliny hrají roli při interakci aktinového cytoskeletu s cytoplazmatickou membránou, při umístění organel a při vezikulárním transportu pomocí aktinového cytoskeletu (Sun *et al.*, 2013). PRF2 patří mezi vegetativní profiliny a je konstitutivně exprimován téměř ve všech tkáních a orgánech *A. thaliana* (Kandasamy *et al.*, 20002b). PRF2 vykazuje subcelulární lokalizaci v cytoplazmě a jaderné membráně buněk *A. thaliana* (Kandasamy *et al.*, 2002b), což potvrzují i naše výsledky z konfokálního laserového mikroskopu (Obr. 13). Součástí práce bylo sledování vlivu inhibitorů cytoskeletu na abundanci PRF2-GFP v buňkách *A. thaliana*. Pro tyto experimenty byly použity inhibitory MT – taxol a oryzalin a inhibitor aktinového cytoskeletu – latrunkulin B. MT inhibitory jsou rozmanité látky, které účinkují již při nízkých koncentracích (Jordan *et al.*, 1992). Latrunkulin B je vysoce specifický toxin, který již při nízkých koncentracích do 60 min způsobuje depolymerizaci AF ve všech typech buněk semenáčků *A. thaliana* (Baluška *et al.*, 2001). Po aplikaci latrunkulinu B došlo k poklesu intenzity fluorescence PRF2-GFP, a tedy i abundance PRF2 (Obr. 14 a 15), čímž byla prokázána interakce PRF2 s aktinovým cytoskeletem. Po aplikaci oryzalinu došlo taktéž k poklesu intenzity fluorescence PRF2-GFP (Obr. 18 a 19), čímž byla dokázána interakce PRF2 s MT. Taxol způsobil naopak nárůst abundance PRF2, a tedy nárůst intenzity fluorescence (Obr. 22 a 23), což je v souladu s výsledky proteomických experimentů (Takáč, 2015, osobní sdělení). Po vymytí roztoku taxolu tekutým ½ MS médiem intenzita fluorescence poklesla do původního stavu (Obr. 22 a 23).

Poslední částí práce byla imunocytochemická analýza MT a aktinového cytoskeletu u transgenní linie PRF2-GFP metodou „whole mount“ (Sauer *et al.*, 2006; Šamajová *et al.*, 2014). Základem metody bylo imunofluorescenční značení α -tubulinu a aktinu pomocí specifických primárních protilátek. V meristematických buňkách kořene byla pozorována

buněčná dělení a mitotické MT struktury – mitotické vřetenko (Obr. 26) a fragmoplasty (Obr. 27). Imunofluorescenční značení AF ukázalo částečnou kolokalizaci AF s PRF2-GFP (Obr. 28D).

7 Závěr

V literárním přehledu byla shrnuta základní charakteristika modelové rostliny *A. thaliana* a její význam pro rostlinný výzkum. Dále byl popsán cytoskelet rostlin – struktura a funkce rostlinných MT a AF. Další část byla orientována na ABPs a důkladně byly popsány profiliny, jejich funkce a vliv na vývoj a růst rostlin. V poslední části byly shrnuty vlivy abiotického stresu na rostliny.

Součástí experimentální části byla fenotypová analýza PRF2-GFP za kontrolních podmínek ($\frac{1}{2}$ MS médium), při působení solného (75, 100, 125 nebo 150mmol.l⁻¹ NaCl), hyperosmotického (200 nebo 400mmol.l⁻¹ sorbitol) a oxidativního stresu (0,1 nebo 0,5μmol.l⁻¹ PQ). Aplikace těchto abiotických stresů měla mnoho vlivů na rostliny, včetně změny délek primárních kořenů, klíčivosti semen, viability a fenotypů rostlin. Tyto změny se paralelně pozorovaly také u transgenní linie pMAT-GFP a divokého typu Col-0. Porovnávání délek primárních kořenů ukázalo, že solný a hyperosmotický stres způsobují redukcii růstu kořenů, rostliny PRF2-GFP a Col-0 však při experimentech vykazovaly podobnou citlivost. Semena transgenní linie PRF2-GFP jsou citlivější na klíčení v prostředí solného a hyperosmotického stresu v porovnání se semeny rostlin Col-0 a pMAT-GFP. NaCl a sorbitol mají vliv i na viabilitu a způsobují změny fenotypů všech studovaných linií, přičemž se ukázalo, že transgenní linie PRF2-GFP je vůči těmto podmínkám odolnější než rostliny Col-0 a pMAT-GFP. Stejný trend ukázal i podobný experiment s použitím PQ, který navozuje oxidativní stres.

V druhé části byla provedena *in vivo* lokalizace PRF2-GFP po působení inhibitorů MT a AF. Latrunkulin B, inhibitor AF, a oryzalin, inhibitor MT, způsobily pokles abundance PRF2-GFP v průběhu 60 min. Taxol, inhibitor MT, naopak způsobil nárůst abundance PRF2-GFP v průběhu 60 min a následně po vymytí roztoku taxolu $\frac{1}{2}$ MS médiem došlo k návratu abundance do původního stavu.

Poslední částí bylo imunocytochemické studium cytoskeletu pomocí metody „whole-mount“ u transgenní linie PRF2-GFP. Imunofluorescenčním značením MT byly vizualizovány mitotické struktury – mitotické vřeténko a fragmoplasty. Imunofluorescenční značení AF ukázalo částečnou kolokalizaci AF s PRF2-GFP.

8 Seznam použité literatury

- Agastian P., Kingsley S. J., Vivekanandan M. (2000) Effect of salinity on photosynthesis and biochemical characteristics in mulberry genotypes. *Photosynthetica*. **38** (2): 287-290
- Atkinson N. J., Urwin P. E. (2012) The interaction of plant biotic and abiotic stresses: From genes to the field. *Journal of Experimental Botany*. **63** (10): 3523-3543
- Baluška F., Salaj J., Mathur J., Braun M., Jasper F., Šamaj J., Chua N. H., Barlow P. W., Volkmann D. (2000) Root hair formation: F-actin-dependent tip growth is initiated by local assembly of profilin-supported F-actin meshworks accumulated within expansin-enriched bulges. *Developmental Biology*. **227** (2): 618-632
- Baluška F., Jasik J., Edelmann H. G., Salajová T., Volkmann D. (2001) Latrunculin B-induced plant dwarfism: Plant cell elongation is F-actin-dependent. *Developmental Biology*. **231** (1): 113-124
- Bennett M. D., Leitch I. J., Price H. J., Johnston J. S. (2003) Comparisons with *Caenorhabditis* (~ 100 Mb) and *Drosophila* (~ 175 Mb) using flow cytometry show genome size in *Arabidopsis* to be ~ 157 Mb and thus ~ 25% larger than the Arabidopsis Genome Initiative estimate of ~ 125 Mb. *Annals of Botany*. **91** (5): 547-557
- Bhatnagar-Mathur P., Vadez V., Sharma K. K. (2008) Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: Retrospect and prospects. *Plant Cell Reports*. **27** (3): 411-424
- Brandizzi F., Snapp E. L., Roberts A. G., Lippincott-Schwartz J., Hawes C. (2002) Membrane protein transport between the endoplasmic reticulum and the Golgi in tobacco leaves is energy dependent but cytoskeleton independent: Evidence from selective photobleaching. *The Plant Cell*. **14** (6): 1293-1309
- Brandizzi F., Wasteneys G. O. (2013) Cytoskeleton-dependent endomembrane organization in plant cells: An emerging role for microtubules. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*. **75** (2): 339-349
- Carillo P., Annunziata M. G., Pontecorvo G., Fuggi A., Woodrow P. (2011) Salinity Stress and Salt Tolerance. In: Shanker A. (Ed.). *Abiotic Stress in Plants - Mechanisms and Adaptations*. 21-38, InTech. ISBN: 978-953-307-394-1, DOI: 10.5772/22331
- Cooper G. M., Hausman R. E. (2007) The Cytoskeleton and cell movement. *The Cell: A Molecular Approach*. 4th ed., 473-528, Sinauer Associates, Inc. ISBN: 978-0-87893-219-4
- Dyachok J., Sparks J. A., Liao F., Wang Y. S., Blancaflor E. B. (2014) Fluorescent protein-based reporters of the actin cytoskeleton in living plant cells: Fluorophore variant, actin binding domain, and promoter considerations. *Cytoskeleton*. **71** (5): 311-327

- dos Remedios C. G., Chhabra D., Kekic M., Dedova I. V., Tsubakihara M., Berry D. A., Nosworthy N. J. (2003) Actin binding proteins: Regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiological Reviews*. **83** (2): 433-473
- Ehrhardt D. W., Shaw S. L. (2006) Microtubule dynamics and organization in the plant cortical array. *Annual Review of Plant Biology*. **57**: 859-875
- Fan T., Zhai H., Shi W., Wang J., Jia H., Xiang Y., An L. (2013) Overexpression of profilin 3 affects cell elongation and F-actin organization in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports*. **32** (1): 149-160
- Field C., Li R., Oegema K. (1999) Cytokinesis in eukaryotes: a mechanistic comparison. *Current Opinion in Cell Biology*. **11** (1): 68-80
- Finkel T., Theriot J. A., Dose K. R., Tomaselli G. F., Goldschmidt-Clermont P. J. (1994) Dynamic actin structures stabilized by profilin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **91** (4): 1510-1514
- Finkel T. (2003) Oxidant signals and oxidative stress. *Current Opinion in Cell Biology*. **15** (2): 247-254
- Fletcher D. A., Mullins R. D. (2010) Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*. **463** (7280): 485-492
- Foyer C. H., Noctor G. (2005) Oxidant and antioxidant signalling in plants: A re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell & Environment*. **28** (8): 1056-1071
- Gibbon B. C., Kovar D. R., Staiger C. J. (1999) Latrunculin B has different effects on pollen germination and tube growth. *The Plant Cell*. **11** (12): 2349-2363
- Hamada T. (2007) Microtubule-associated proteins in higher plants. *Journal of Plant Research*. **120** (1): 79-98
- Hasegawa P. M., Bressan R. A., Zhu J. K., Bohnert H. J. (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. **51**: 463-499
- Henty-Ridilla J. L., Li J., Blanchoin L., Staiger C. J. (2013) Actin dynamics in the cortical array of plant cells. *Current Opinion in Plant Biology*. **16** (6): 678-687
- Herrmann H., Strelkov S. V. (2011) History and phylogeny of intermediate filaments: Now in insects. *BMC Biology*. **9** (16): 1-5
- Huang S., McDowell J. M., Weise M. J., Meagher R. B. (1996) The *Arabidopsis* profilin gene family. Evidence for an ancient split between constitutive and pollen-specific profilin genes. *Plant Physiology*. **111** (1): 115-126

- Huang S., Blanchoin L., Kovar D. R., Staiger C. J. (2003) *Arabidopsis* capping protein (AtCP) is a heterodimer that regulates assembly at the barbed ends of actin filaments. *The Journal of Biological Chemistry*. **278** (45): 44832-44842
- Huber F., Schnauß J., Rönicke S., Rauch P., Müller K., Fütterer C., Käs J. (2013) Emergent complexity of the cytoskeleton: From single filaments to tissue. *Advances in Physics*. **62** (1): 1-112
- Huh G. H., Damsz B., Matsumoto T. K., Reddy M. P., Rus A. M., Ibeas J. I., Narasimhan M. L., Bressan R. A., Hasegawa P. M. (2002) Salt causes ion disequilibrium-induced programmed cell death in yeast and plants. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*. **29** (5): 649-659
- Hunter A. W., Wordeman L. (2000) How motor proteins influence microtubule polymerization dynamics. *Journal of Cell Science*. **113**: 4379-4389
- Hussey P. J., Allwood E. G., Smertenko A. P. (2002) Actin-binding proteins in the *Arabidopsis* genome database: Properties of functionally distinct plant actin-depolymerizing factors/cofilins. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. **357** (1422): 791-798
- Chartzoulakis K., Klapaki G. (2000) Response of two greenhouse pepper hybrids to NaCl salinity during different growth stages. *Scientia Horticulturae*. **86** (3): 247-260
- Chen H., Bernstein B. W., Bamburg J. R. (2000) Regulating actin-filament dynamics *in vivo*. *Trends in Biochemical Sciences*. **25** (1): 19-23
- Jockusch B. M., Murk K., Rothkegel M. (2007) The profile of profilins. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. **159**: 131-149
- 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. *Journal of Cell Science*. **102**: 401-416
- Kader M. A., Lindberg S. (2010) Cytosolic calcium and pH signaling in plants under salinity stress. *Plant Signaling & Behavior*. **5** (3): 233-238
- Kandasamy M. K., McKinney E. C., Meagher R. B. (2002a) Functional nonequivalency of actin isoforms in *Arabidopsis*. *Molecular Biology of the Cell*. **13** (1): 251-261
- Kandasamy M. K., McKinney E. C., Meagher R. B. (2002b) Plant profilin isoforms are distinctly regulated in vegetative and reproductive tissues. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. **52** (1): 22-32
- Kandasamy M. K., Burgos-Rivera B., McKinney E. C., Ruzicka D. R., Meagher R. B. (2007) Class-specific interaction of profilin and ADF isoforms with actin in the regulation of plant development. *The Plant Cell*. **19** (10): 3111-3126

- Kim H., Park M., Kim S. J., Hwang I. (2005) Actin filaments play a critical role in vacuolar trafficking at the Golgi complex in plant cells. *The Plant Cell*. **17** (3): 888-902
- Kojo K. H., Higaki T., Kutsuna N., Yoshida Y., Yasuhara H., Hasezawa S. (2013) Roles of cortical actin microfilament patterning in division plane orientation in plants. *Plant & Cell Physiology*. **54** (9): 1491-1503
- Koornneef M., Meinke D. (2010) The development of *Arabidopsis* as a model plant. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*. **61** (6): 909-921
- Kovar D. R., Staiger C. J., Weaver E. A., McCurdy D. W. (2000a) AtFim1 is an actin filament crosslinking protein from *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*. **24** (5): 625-636
- Kovar D. R., Drøbak B. K., Staiger C. J. (2000b) Maize profilin isoforms are functionally distinct. *The Plant Cell*. **12** (4): 583-598
- Lee Y. R., Liu B. (2004) Cytoskeletal motors in *Arabidopsis*. Sixty-one kinesins and seventeen myosins. *Plant Physiology*. **136** (4): 3877-3883
- Li L. J., Ren F., Gao X. Q., Wei P. C., Wang X. C. (2013) The reorganization of actin filaments is required for vacuolar fusion of guard cells during stomatal opening in *Arabidopsis*. *Plant, Cell & Environment*. **36** (2): 484-497
- Li J., Blanchoin L., Staiger C. J. (2014) Signaling to actin stochastic dynamics. *Annual Review of Plant Biology*. **66**: 415-440
- Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser C. A., Krieger M., Scott M. P., Zipursky S. L., Darnell J. (2003) Microfilaments and intermediate filaments. *Molecular Cell Biology*. 5th ed., 779-815, W. H. Freeman. ISBN: 978-0716743668
- Mano S., Hayashi M., Nishimura M. (1999) Light regulates alternative splicing of hydroxypyruvate reductase in pumpkin. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*. **17** (3): 309-320
- Mazel A., Leshem Y., Tiwari B. S., Levine A. (2004) Induction of salt and osmotic stress tolerance by overexpression of an intracellular vesicle trafficking protein AtRab7 (AtRabG3e). *Plant Physiology*. **134** (1): 118-128
- McKinney E. C., Kandasamy M. K., Meagher R. B. (2001) Small changes in the regulation of one *Arabidopsis* profilin isovariant, PRF1, alter seedling development. *The Plant Cell*. **13** (5): 1179-1191
- Meagher R. B., Kandasamy M. K., King L. (2011) Actin functions in the cytoplasmic and nuclear compartments. In: Liu B. (Ed.). *Plant Cytoskeleton*. 3-32, Springer. ISBN: 978-1-4419-0986-2

- Mitchison T., Kirschner M. (1984) Dynamic instability of microtubule growth. *Nature*. **312** (5991): 237-242
- Murashige T., Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. **15** (3): 473-497
- Müller-Reichert T., Chrétien D., Severin F., Hyman A. A. (1998) Structural changes at microtubule ends accompanying GTP hydrolysis: Information from a slowly hydrolyzable analogue of GTP, guanylyl-(α,β)-methylene-diphosphonate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **95** (7): 3661-3666
- Nogales E., Whittaker M., Milligan R. A., Downing K. H. (1999) High-resolution model of the microtubule. *Cell*. **96** (1): 79-88
- Perl-Treves R., Perl A. (2002) Oxidative stress: An introduction. In: Inzé D., Van Montagu M. (Eds.). *Oxidative Stress in Plants*. 1-32, Taylor & Francis. ISBN: 0-203-34641-6
- Qu X., Zhang H., Xie Y., Wang J., Chen N., Huang S. (2013) *Arabidopsis* villins promote actin turnover at pollen tube tips and facilitate the construction of actin collars. *The Plant Cell*. **25** (5): 1803-1817
- Ramachandran S., Christensen H. E., Ishimaru Y., Dong C. H., Chao-Ming W., Cleary A. L., Chua N. H. (2000) Profilin plays a role in cell elongation, cell shape maintenance, and flowering in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. **124** (4): 1637-1647
- Raynaud-Messina B., Merdes A. (2007) γ -tubulin complexes and microtubule organization. *Current Opinion in Cell Biology*. **19** (1): 24-30
- Rice L. M., Montabana E. A., Agard D. A. (2008) The lattice as allosteric effector: Structural studies of $\alpha\beta$ - and γ -tubulin clarify the role of GTP in microtubule assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **105** (14): 5378-5383
- Rizhsky L., Liang H., Mittler R. (2002) The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant Physiology*. **130** (3): 1143-1151
- Rizhsky L., Liang H., Shuman J., Shulaev V., Davletova S., Mittler R. (2004) When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiology*. **134** (4): 1683-1696
- Sauer M., Paciorek T., Benková E., Friml J. (2006) Immunocytochemical techniques for whole-mount *in situ* protein localization in plants. *Nature Protocols*. **1** (1): 98-103
- Sham A., Moustafa K., Al-Ameri S., Al-Azzawi A., Iratni R., AbuQamar S. (2015) Identification of *Arabidopsis* candidate genes in response to biotic and abiotic stresses using comparative microarrays. *PloS One*. **10** (5): 1-21

- Smékalová V., Doskočilová A., Komis G., Šamaj J. (2014) Crosstalk between secondary messengers, hormones and MAPK modules during abiotic stress signalling in plants. *Biotechnology Advances*. **32** (1): 2-11
- Snowman B. N., Kovar D. R., Shevchenko G., Franklin-Tong V. E., Staiger C. J. (2002) Signal-mediated depolymerization of actin in pollen during the self-incompatibility response. *The Plant Cell*. **14** (10): 2613-2626
- Sparkes I., Runions J., Hawes C., Griffing L. (2009) Movement and remodeling of the endoplasmic reticulum in nondividing cells of tobacco leaves. *The Plant Cell*. **21** (12): 3937-3949
- Sparkes I. (2011) Recent advances in understanding plant myosin function: Life in the fast lane. *Molecular Plant*. **4** (5): 805-812
- Staehein L. A., Hepler P. K. (1996) Cytokinesis in higher plants. *Cell*. **84** (6): 821-824
- Staiger C. J., Yuan M., Valenta R., Shaw P. J., Warn R. M., Lloyd C. W. (1994) Microinjected profilin affects cytoplasmic streaming in plant cells by rapidly depolymerizing actin microfilaments. *Current Biology*. **4** (3): 215-219
- Staiger C. J., Baluška F., Volkmann D., Barlow P. (Eds.) (2000) *Actin: A Dynamic Framework for Multiple Plant Cell Functions*. Springer. ISBN: 978-94-015-9460-8
- Staiger C. J., Blanchoin L. (2006) Actin dynamics: Old friends with new stories. *Current Opinion in Plant Biology*. **9** (6): 554-562
- Staiger C. J., Sheahan M. B., Khurana P., Wang X., McCurdy D. W., Blanchoin L. (2009) Actin filament dynamics are dominated by rapid growth and severing activity in the *Arabidopsis* cortical array. *The Journal of Cell Biology*. **184** (2): 269-280
- Staiger C. J., Poulter N. S., Henty J. L., Franklin-Tong V. E., Blanchoin L. (2010) Regulation of actin dynamics by actin-binding proteins in pollen. *Journal of Experimental Botany*. **61** (7): 1969-1986
- Sun T., Li S., Ren H. (2013) Profilin as a regulator of the membrane-actin cytoskeleton interface in plant cells. *Frontiers in Plant Science*. **4**: 512
- 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. *Biotechnology Advances*. **31** (1): 118-128
- Šamajová O., Komis G., Šamaj J. (2014) Immunofluorescent localization of MAPKs and colocalization with microtubules in *Arabidopsis* seedling whole-mount probes. *Methods in Molecular Biology*. **1171**: 107-115

Takáč T., Pechan T., Richter H., Müller J., Eck C., Böhm N., Obert B., Ren H., Niehaus K., Šamaj J. (2011) Proteomics on brefeldin A-treated *Arabidopsis* roots reveals profilin 2 as a new protein involved in the cross-talk between vesicular trafficking and the actin cytoskeleton. *Journal of Proteome Research*. **10** (2): 488-501

Takáč T. (2015) Osobní sdělení.

The Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*. **408** (6814): 796-815

Valenta R., Dûchene M., Ebner C., Valent P., Sillaber C., DeViller P., Ferreira F., Tejkl M., Edelmann H., Kraft D., Scheiner O. (1992) Profilins constitute a novel family of functional plant pan-allergens. *The Journal of Experimental Medicine*. **175** (2): 377-385

Valenta R., Ferreira F., Grote M., Swoboda I., Vrtala S., Duchêne M., Deviller P., Meagher R. B., McKinney E., Heberle-Bors E., Kraft D., Scheiner O. (1993) Identification of profilin as an actin-binding protein in higher plants. *The Journal of Biological Chemistry*. **268** (30): 22777-22781

Vidali L., Rounds C. M., Hepler P. K., Bezanilla M. (2009) Lifeact-mEGFP reveals a dynamic apical F-actin network in tip growing plant cells. *PloS One*. **4** (5): 1-15

Voigt B., Timmers A. C., Šamaj J., Müller J., Baluška F., Menzel D. (2005) GFP-FABD2 fusion construct allows *in vivo* visualization of the dynamic actin cytoskeleton in all cells of *Arabidopsis* seedlings. *European Journal of Cell Biology*. **84** (6): 595-608

Wade R. H. (2009) On and around microtubules: An overview. *Molecular Biotechnology*. **43** (2): 177-191

Wang F., Jing Y., Wang Z., Mao T., Šamaj J., Yuan M., Ren H. (2009) *Arabidopsis* profilin isoforms, PRF1 and PRF2 show distinctive binding activities and subcellular distributions. *Journal of Integrative Plant Biology*. **51** (2): 113-121

Yoneda A., Akatsuka M., Hoshino H., Kumagai F., Hasezawa S. (2005) Decision of spindle poles and division plane by double preprophase bands in a BY-2 cell line expressing GFP-tubulin. *Plant & Cell Physiology*. **46** (3): 531-538

Zhang H. X., Blumwald E. (2001) Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nature Biotechnology*. **19** (8): 765-768

Zhu J. K. (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology*. **53**: 247-273

9 Seznam použitých zkratek

+TIPs	proteiny vážící se na (+) konec mikrotubulů
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ABP/ABPs	aktin vázající protein/y
ADF	aktin depolymerizující faktory
ADP	adenosindifosfát
AF	aktinová filamenta
ARP 2/3	aktin-asociované proteiny 2/3
AtFH1	formin 1 z <i>Arabidopsis thaliana</i>
AtFH5	formin 5 z <i>Arabidopsis thaliana</i>
AtFH6	formin 6 z <i>Arabidopsis thaliana</i>
AtFH8	formin 8 z <i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	adenosintrifosfát
BFA	brefeldin A
BSA	hovězí sérový albumin
C _c	kritická koncentrace
Col-0	ekotyp Columbia-0 (divoký typ)
CP	krycí proteiny
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMSO	dimethylsulfoxid
EGTA	kyselina ethylenglykol-bis-(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraoctová
ER	endoplazmatické retikulum
EtOH	ethanol
F-aktin	filamentální aktin
G-aktin	globulární aktin
FABD2	druhá aktin vázající doména z <i>A. thaliana</i>
GA	Golgiho aparát
γTuC	γ-tubulinový komplex
γTuRC	kruhový γ-tubulinový komplex
γTuSC	malý γ-tubulinový komplex
GDP	guanosindifosfát
GFP	zelený fluorescenční protein
GTP	guanosintrifosfát
CHUP1	protein vnější membrány chloroplastů

MAPK	mitogen aktivované proteinkinázy
MAP/MAPs	protein/y asociovaný/é s mikrotubuly
MS-médium	Murashige & Skoog médium
MS salts	Murashige & Skoog základní směs solí
MT	mikrotubulus/y/ární
MTOC	mikrotubulární organizační centra
MTSB	mikrotubuly stabilizující pufr
OsFH5	formin 5 z <i>Oryza sativa</i>
PBS	fosfátem tlumený solný roztok
PIP2	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
PIPES	piperazin-N,N'-bis-(ethansulfonová kyselina)
PLP	krátké úseky proteinů bohaté na prolin
pMAT-GFP	trangenní linie stabilně exprimující chimérický gen pro cytoplazmatický fúzní protein s GFP
PQ	paraquat (1,1-dimethyl-4,4-bipyridium dichlorid)
PRF1	profilin 1
PRF2	profilin 2
PRF3	profilin 3
PRF4	profilin 4
PRF5	profilin 5
PRF2-GFP	nadexpresní linie exprimující GFP značený profilin 2 pod kontrolou 35S promotoru
ROS	reaktivní formy kyslíku
SOD	superoxid dismutáza
TAIR	The <i>Arabidopsis</i> Information Resource
TGN	Trans-Golgi systém
WASP	Wiskott–Aldrich syndrome protein