

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Úloha malé Rab GTPasy Ara7 v odpovědi na abiotický stres

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Petra Knotková
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Ing. Tomáš Takáč, Ph.D.
Rok:	2018

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

V Olomouci dne

Poděkování

Děkuji vedoucímu mé diplomové práce Ing. Tomášovi Takáčovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost, ochotu, věnovaný čas a cenné rady a připomínky. Dále děkuji celému Oddělení buněčné biologie CRH za vytvoření příjemného pracovního prostředí a ochotu vždy pomoci a poradit.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Petra Knotková
Název práce	Úloha malé Rab GTPasy Ara7 v odpovědi na abiotický stres
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Centrum regionu Haná pro biotechnologický výzkum, Oddělení buněčné biologie
Vedoucí práce	Ing. Tomáš Takáč, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2018

Abstrakt

Malé GTPasy se podílí na regulaci všech kroků vesikulárního transportu a u mnohých z nich již byla prokázána role v reakci na abiotický stres. Ara7 patří do skupiny Rab5 GTPas, které se podílí na řízení endocytosy a vakuolárního transportu. Malé GTPasy cyklují mezi dvěma stavy: aktivním s navázaným GTP, ve kterém vykonávají své regulační funkce, a inaktivním s navázaným GDP.

V předkládané práci byla analyzována role malé GTPasy Ara7 v reakci na solný stres u rostlin. Provedená fenotypová analýza s liniemi rostlin exprimujícími tamoxifenem indukovatelnou dominantně negativní Ara7 (DN Ara7^{S24N}) tj. v inaktivním stavu nebo konstitutivně aktivní Ara7 (CA Ara7^{Q69L}), prokázala nezbytnost cyklické aktivace a inaktivace Ara7 pro správný růst primárních kořenů, zachování správného počtu a délky postranních kořenů a normální uspořádání kořenových vlásků. Inaktivace Ara7 způsobovala rapidní produkci kořenových vlásků. Byla prokázána důležitost Ara7 pro reakci rostlin na zasolení, protože rostliny s modifikovanou Ara7 (dominantně negativní i konstitutivně aktivní) vykazovaly vyšší senzitivitu na solný stres způsobený jak NaCl, tak KCl. Tato senzitivita byla potvrzena také zvýšenou peroxidací lipidů a sníženým obsahem chlorofylu ve studovaných liniích. Inaktivace Ara7 má za následek také akumulaci H₂O₂ a aktivaci antioxidační obrany.

Naše výsledky ukazují, že přesně řízená kontrola cyklické aktivace a inaktivace Ara7 je nezbytná pro odpověď na solný stres u Arabidopsis.

Klíčová slova	Malé GTPasy, Ara7, solný stres, vesikulární transport, endocytosa, antioxidační enzymy
Počet stran	98
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Petra Knotková
Title	Role of small Rab GTPase Ara7 in response to abiotic stress
Type of thesis	Diploma
Department	Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Department of Cell Biology
Supervisor	Ing. Tomáš Takáč, Ph.D.
The year of presentation	2018

Abstract

Small GTPases are crucial regulators of all steps of vesicular trafficking and many of them show ability to regulate plant responses to abiotic stress. Ara7 is a member of Rab5 GTPase subfamily. Rab5 GTPases are involved in the control of endocytosis and vacuolar trafficking. In general, small GTPases cycle between two states: an active GTP-bound state and an inactive GDP-bound state. Only in GTP-bound state can they perform their functions.

The role of Ara7 in plant response to the salt stress was investigated in this diploma thesis. The phenotypic analysis, performed by using plants expressing tamoxifen-inducible dominant negative Ara7 (DN Ara7^{Q69L}) and plants expressing constitutively active Ara7 (CA Ara7^{Q69L}), showed that ability of Ara7 to cycle between active and inactive state is necessary for maintaining optimal growth of primary roots, number and length of lateral roots and organisation of root hairs. Moreover, inactivation of Ara7 caused rapid production of root hairs. Our results also indicate the importance of Ara7 in salt stress tolerance, because plants with modified Ara7 (dominant negative or constitutive active) showed higher sensitivity to salt stress induced by both NaCl and KCl. This sensitivity was evidenced also by increased lipid peroxidation and decreased chlorophyll level in the studied lines. Finally, inactivation of Ara7 has clear consequences in H₂O₂ accumulation and activation of antioxidant defence.

In conclusion, our results show, that tight control between Ara7 active and inactive state is required for salt stress response in Arabidopsis.

Keywords	Small GTPases, Ara7, salt stress, vesicular trafficking, endocytosis, antioxidant enzymes
Number of pages	98
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

1	ÚVOD	9
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	10
2.1	Malé GTPasy	12
2.1.1	Struktura malých GTPas	14
2.1.2	Rozdělení malých GTPas	15
2.2	GTPasy regulující vesikulární transport	18
2.2.1	Arf/Sar GTPasy	19
2.2.2	Rab GTPasy	20
2.3	Solný stres	31
2.3.1	Reakce rostlin na solný stres	32
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	40
3.1	Materiál	40
3.1.1	Biologický materiál	40
3.1.2	Chemikálie	40
3.1.3	Protilátky použité při imunoblotování	42
3.1.4	Složení roztoků a médií	42
3.1.5	Přístroje	44
3.1.6	Programy a databáze	45
3.2	Metody	45
3.2.1	Sterilizace semen	45
3.2.2	Příprava kultivačního média a sázení semen	45
3.2.3	Evaluace fenotypu rostlin s modifikovanou Ara7 na toleranci vůči NaCl a KCl	46
3.2.4	Test odolnosti linií s modifikovanou Ara7 na různé koncentrace NaCl a KCl....	47
3.2.5	Měření obsahu chlorofylu	47
3.2.6	Měření peroxidace lipidů	48
3.2.7	Měření obsahu peroxidu vodíku	49
3.2.8	Detekce aktivity superoxiddismutasy a katalasy při solném stresu	49
3.2.9	Analýza abundance superoxiddismutasy a katalasy při solném stresu	51
4	VÝSLEDKY	53
4.1	Fenotyp kořenů rostlin s modifikovanou Ara7	53
4.1.1	Zapojení Ara7 v růstu primárních a postranních kořenů	53
4.1.2	Zapojení Ara7 v růstu kořenových vlásků	56
4.2	Vliv Ara7 na odpověď rostlin na solný stres	59
4.2.1	Vliv Ara7 na reakci kořenového systému na solný stres	59
4.2.2	Obsah chlorofylu u Arabidopsis s modifikovanou Ara7 při solném stresu	63

4.2.3	Vliv Ara7 na regulaci obsahu H ₂ O ₂ při solném stresu.....	65
4.2.4	Analýza peroxidace lipidů v liniích s modifikovanou Ara7	67
4.3	Úloha Ara7 v reakci antioxidačních enzymů na solný stres.....	68
4.3.1	Úloha Ara7 v regulaci aktivity a abundance superoxiddismutasy při solném stresu	68
4.3.2	Úloha Ara7 v regulaci aktivity a abundance katalasy při solném stresu	72
5	DISKUZE	75
5.1	Role Ara7 v toleranci k solnému stresu.....	77
5.1.1	Ara7 v regulaci růstu primárních kořenů	78
5.1.2	Ara7 v regulaci růstu postranních kořenů.....	80
5.1.3	Ara7 v regulaci reaktivních forem kyslíku a antioxidačních enzymů	80
6	ZÁVĚR	82
7	LITERATURA	83
8	SEZNAM ZKRATEK	97

CÍLE PRÁCE

Cílem teoretické části diplomové práce je zpracování literární rešerše na téma:

- Malé GTPasy a jejich funkce ve vesikulární transportu.
- Charakterizace Rab GTPas u rostlin s důrazem na skupinu Rab5 (RabF).
- Stres ze zasolení u rostlin.
- Úloha endocytosy a malých GTPas v reakci na solný stres.

Cíle experimentální části:

- Fenotypová analýza transgenních rostlin s modifikovanou Ara7.
- Fyziologické testy transgenních rostlin s modifikovanou Ara7 na toleranci vůči NaCl a KCl.
- Analýza aktivity a abundance vybraných antioxidačních enzymů při solném stresu.

1 ÚVOD

Zasolení je jedním z nejzávažnějších problémů způsobujících degradaci půdy a omezení zemědělské produkce. Asi 20 % zemědělské půdy je v současnosti zasaženo zvýšeným obsahem solí a předpokládá se vzrůst tohoto podílu až na 50 % do roku 2050. Rostliny tvoří základ naší výživy. Světová populace by v roce 2050 měla dosáhnout 9,1 miliard. Aby bylo možno naplnit potřeby populace na dostatek kvalitní potravy a výživy, musí dojít k navýšení produkce potravy až o 70 %, k čemuž je potřeba hledat mechanismy umožňující zajištění zemědělského výnosu, zvýšení vitality a úrody rostlin i na půdách postižených zasolením (FAO, 2009; Ladeiro, 2012; Jing *et al.*, 2018).

Za nejúčinnější mechanismy se tradičně považují modifikace exprese genů pro rezistenci, toleranci nebo regulačních genů (např. transkripčních faktorů), popř. genů kódujících proteiny zapojené v signálních drahách (Parmar *et al.*, 2017). V poslední době je stále větší význam kladen také na procesy důležité pro růst a vývoj, jako je např. regulace cytoskeletu nebo vesikulárního transportu (Baral *et al.*, 2015).

Vesikulární transport hraje důležitou roli při reakci rostlin na abiotický stres. Z mnohých funkcí vesikulárního transportu při regulaci odpovědi na solný stres, lze uvést např. stimulaci endocytosy zajišťující internalizaci některých membránových proteinů zapojených ve zvyšování tolerance (Leshem *et al.*, 2007; Baral *et al.*, 2015). Malé GTPasy představují hlavní regulátory vesikulárního transportu (Zhang a McCormick, 2010). Funkce mnoha z nich již byla prokázána jako nezbytná pro toleranci rostlin na solný stres (Heo *et al.*, 2005; Asaoka *et al.*, 2013). Třída malých GTPas označovaná jako Rab5 se u rostlin podílí na regulaci endocytosy a vakuolárního transportu a obsahuje tři členy: Rha1, Ara6 a Ara7 (Vernoud *et al.*, 2003). Z těchto tří Rab5 GTPas byla již studována role Ara6 v regulaci odpovědi rostlin na solný stres, kdy knock-outované linie Ara6 vykazovaly zvýšenou senzitivitu na tento stres, ale linie se schopností zachovat aktivovanou Ara6 toleranci rostlin naopak zvyšovala (Ebine *et al.*, 2011).

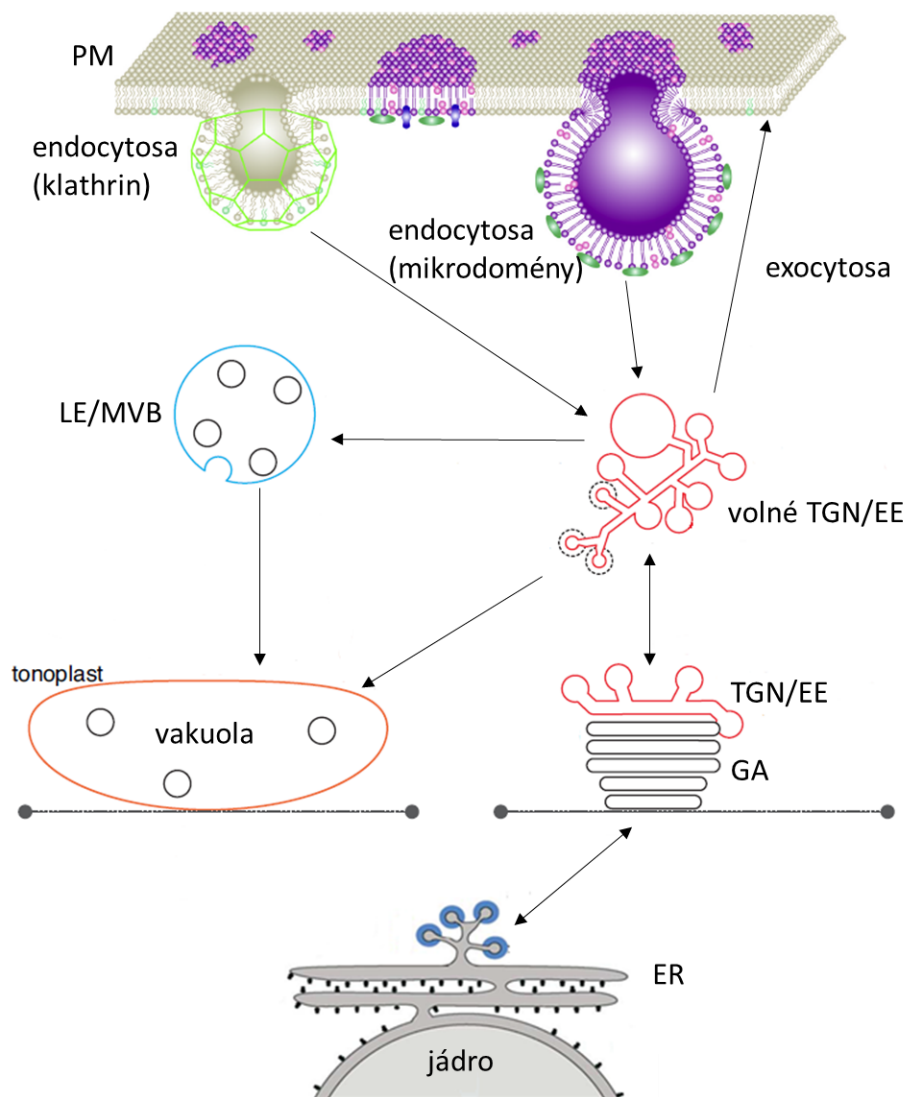
Ara7 představuje dalšího potenciálního kandidáta pro genetickou manipulaci za účelem zvýšení odolnosti rostlin na solný stres.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Pro správné vitální funkce všech eukaryotických buněk musí neustále docházet k přenosu různých látek mezi jednotlivými intracelulárními organelami, a také mezi těmito organelami a vnějším prostředím. Hlavní z cest tohoto přenosu je vesikulární transport, jehož úkolem je přeprava látek v malých, membránou obalených útvarech – vesikulech. Podstata tohoto procesu spočívá v odštěpení vesikulu, obsahujícího transportovaný materiál, z membrány tzv. donorové organely, transport k cílové organelě a splynutí s její membránou za uvolnění nákladu. Vesikulárního transportu se účastní pouze organely tvořené jednou membránou, mezi něž patří: endoplasmatické retikulum (ER), Golgiho aparát (GA), endosomy, lysosomy, vakuoly a plasmatická membrána (PM) (Bonifacino a Glick, 2004; Fan *et al.*, 2015).

Proteiny nově přijaté z vnějšího prostředí nebo proteiny nově syntetizované na ER, procházejí přes řadu membránových organel a vytváří tak dvě hlavní protisměrné dráhy (Obr. 1). První z těchto drah (tzv. dráha endocytosy) umožňuje příjem látek z vnějšího prostředí a jejich transport do vakuoly/lysosomu přes rané a pozdní endosomy (Shoji *et al.*, 2014). Tato cesta začíná příjmem látek z vnějšího prostředí a jejich uzavřením do vesikul internalizovaných z plasmatické membrány v procesu zvaném endocytosa (Murphy *et al.*, 2005). U rostlin rozlišujeme dva mechanismy příjmu látek z vnějšího prostředí: klathrinem zprostředkovanou endocytosu a internalizaci plasmatické membrány z míst nazývaných membránové mikrodomény, odlišující se svým proteinovým a lipidovým složením od okolní plasmatické membrány (jsou obohaceny o protein flotilin, steroly a sfingolipidy). První jmenovaný mechanismus endocytosy tvoří hlavní proud (Chen *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012; Malinsky *et al.*, 2013).

Raný endosom je dynamický útvar s nestálým povrchem, obklopen jednou fosfolipidovou membránou. Slouží jako třídící stanice pro nově internalizované proteiny, z níž se neustále odštěpují vesikuly a vrací se zpět na plasmatickou membránu (Šamaj *et al.*, 2005). Takto je realizována recyklace plasmatické membrány, na jejímž základě může buňka kontrolovat a měnit lipidové složení plasmatické membrány a přítomnost nebo degradaci různých receptorů (Murphy *et al.*, 2005). U rostlin se rané endosomy shodují, alespoň funkčně, s *trans*-Golgiho sítí (TGN). Někdy se z raných endosomů odpojují vesikuly, které nejprve vytvářejí nebo splývají s již existujícím tvarem zvaným recyklační endosom a teprve poté jsou navráceny na membránu (Viotti *et al.*, 2010).



Obr. 1: Schéma znázorňující hlavní dráhy vesikulárního transportu. Dráha endocytosy začíná endocytosou a transportem vzniklých vesikul přes raný endosom/trans-Golgiho síť (TGN) a pozdní endosom/MVB (multivesikulární tělísko) až do vakuoly/lysosomu. Sekreční cestou jsou proteiny a membrány z endoplasmatického retikula (ER) transportovány přes Golgiho aparát (GA) a trans-Golgiho síť (TGN) na plasmatickou membránu (PM) (exocytosou) nebo, pokud jde o lytické enzymy, do pozdního endosomu/MVB a vakuoly/lysosomu. EE, raný endosom; LE, pozdní endosom. Upraveno dle (Fan *et al.*, 2015; Noack a Jaillais, 2017; Singh a Jürgens, 2017).

Rané endosomy následně dozrávají v pozdní. Pozdní endosomy se od raných liší kyselějším pH, díky němuž zde již dochází k aktivaci hydrolytických enzymů a k hydrolytickému štěpení. Jejich membrána může být internalizována za vzniku vesikul uvnitř těchto endosomů, označují se proto také jako multivesikulární tělíska (MVB, multivesicular bodies) nebo prevakuolární oddělení (PVC, prevacuolar compartment) (Otegui *et al.*, 2006; Otegui a Spitzer, 2008). Multivesikulární tělíska obsahují komplex ESCRT (endosomal sorting complexes required for transport), které rozpoznávají poly-ubiquitinilované proteiny

a zprostředkují jejich internalizaci, čímž určují jejich následný osud, kterým je degradace ve vakuole/lysosomu (Korbei a Luschnig, 2013; Cui *et al.*, 2016).

Sekrece a endocytosa jsou vzájemně propojeny. Sekreční drahou jsou proteiny, nově syntetizované v endoplasmatickém retikulu, vedeny do Golgiho aparátu (GA) a poté jako vesikuly pučící z *trans*-sítě GA (TGN, *trans*-Golgi network) jsou transportovány ven z buňky v procesu zvaném exocytosa. Alternativně mohou být dopraveny do pozdních endosomů/MVB a vakuol/lysosomů, kde vykonávají své, většinou hydrolytické, funkce (Obr. 1) (Ding *et al.*, 2014).

Jako retrográdní transport se označuje přenos zpětný vzhledem k cestě endocytosy a sekrece. U rostlin byl prokázán zpětný transport z raných endosomů/TGN na plasmatickou membránu, z recyklačního endosomu na plasmatickou membránu a do GA a transport z GA do ER. Retrográdní transport je nezbytný pro vyrovnání přímého transportu. Návratem membrán a látek z organel, ze kterých byly odštěpeny tak zajišťuje rovnováhu (Viotti *et al.*, 2010; Luo *et al.*, 2015). Rostliny obsahují navíc dráhu transportující materiál, ať už syntetizovaný *de novo* v ER nebo přijatý endocytosou, přes TGN do dělicí přepážky při cytokinezi (Richter *et al.*, 2014).

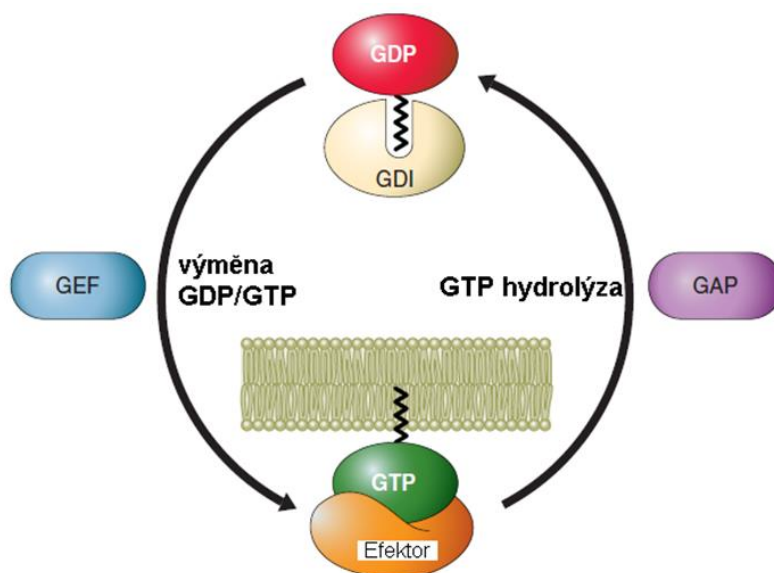
Vesikulární transport a jiné životně důležité procesy, jako je proliferace buněk, buněčná signalizace a procesy spojené s cytoskeletem, probíhající u všech eukaryotických buněk, musí být přísně řízeny. Ve všech těchto funkcích hrají důležitou roli regulační proteiny, z nichž velké množství vykazuje vlastnosti molekulárních přepínačů (molecular switches). Tyto proteiny mohou „přepínat“ - měnit svůj stav z aktivního na inaktivní a naopak, díky čemuž mohou regulovat a kontrolovat výše zmíněné buněčné procesy (Vernoud *et al.*, 2003; Jaffe a Hall, 2005).

Mezi takové regulační proteiny patří GTP-vazebné proteiny se schopností vázat GTP nebo GDP. Existují tři skupiny GTP-vazebných proteinů: velké heterotrimerní označované často jako G proteiny, některé elongační faktory a malé monomerní označované jako malé GTPasy s molekulovou hmotností 21-30 kDa. Hlavními regulátory vesikulárního transportu jsou právě malé GTPasy (Leipe *et al.*, 2002; Yang, 2002).

2.1 MALÉ GTPASY

Každý člen skupiny malých GTPas je, jak již bylo uvedeno, molekulární přepínač regulující rozdílné buněčné procesy. Mechanismus funkce malých GTPas je pozoruhodně univerzální u všech eukaryot. GTPasy se vyskytují ve dvou konformacích: v aktivní s navázaným GTP a v inaktivní s navázaným GDP. Pouze v aktivním stavu může GTPasa

vykonávat své funkce, tj. nejčastěji se vázat na jiné proteiny (tzv. efektory), které dále ovlivňují různé buněčné procesy. V aktivním stavu mají GTP-vazebné proteiny GTPasovou aktivitu a mohou hydrolyzovat navázaný GTP na GDP a samy se tak inaktivovat. Rychlost této hydrolyzy je však velmi nízká, a proto musí být katalyzována třídou proteinů zvaných GAP (GTPasu aktivující protein, GTPase-activating protein). Inaktivovaná GTPasa s navázaným GDP může být znovu aktivována výměnou nukleotidů, k čemuž je potřeba další třída regulačních proteinů GEF (výměnný faktor pro guaninový nukleotid, guanine nucleotide exchange factor), který umožní uvolnění vazby mezi GDP a GTPasou. Na GTPasu se poté váže přednostně GTP, jelikož je jeho koncentrace v cytoplasmě mnohem vyšší než koncentrace GDP (Bourne *et al.*, 1991; Cherfils a Zeghouf, 2013). Celý GTPasový cyklus znázorňuje Obr. 2.

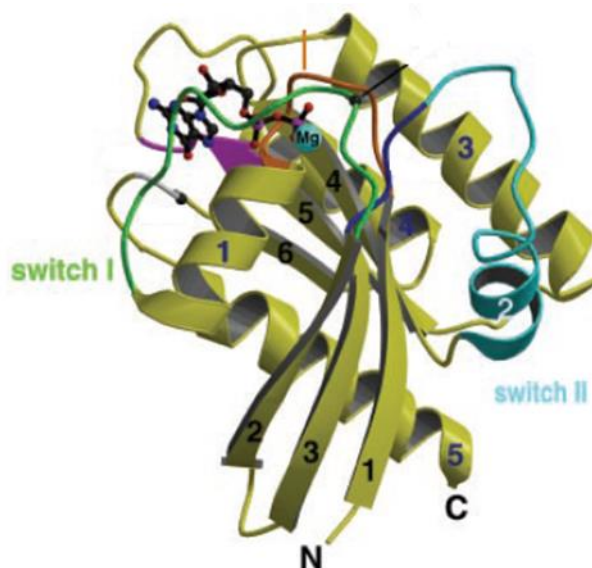


Obr. 2: Mechanismus regulace aktivity malých GTPasy. Některé aktivní GTPasy s navázaným GTP jsou asociovány s membránami a vážou efektorové proteiny, které vykonávají další regulační funkce. Po hydrolyze GTP na GDP pomocí GAP (GTPase-activating protein) dojde k inaktivaci malých GTPas a oddělení od membrány do cytoplasmy, kde se na ně může vázat inhibitor GDI (guanine nucleotide dissociation inhibitor). Opětovná aktivace je umožněna výměnou GDP za GTP pomocí GEF (guanine nucleotide exchange factor). Upraveno dle Cherfils a Zeghouf, 2013.

Některé malé GTPasy, mezi něž patří také Rab GTPasy, jsou ve svém aktivním stavu vázány na membrány, kdežto v inaktivním se nachází v cytoplasmě. Asociaci s membránami jim často zajišťuje hydrofobní isoprenylová skupina, kterou získají v procesu post-translační modifikace. Odpoutání takových malých GTPas z membrány by však bylo energeticky nevýhodné, kdyby se se svou hydrofobní skupinou měly dostat do cytoplasmy, kde převažuje vodné prostředí. Proto je zapotřebí dalších proteinů GDI (inhibitor disociace guaninových nukleotidů, guanine nucleotide dissociation inhibitor), které umožňují lokalizaci inaktivních malých GTPas do cytoplasmy vazbou a „zakrytím“ jejich hydrofobní skupiny. Vazba GDI na inaktivní malé GTPasy také inhibuje odštěpení GDP, proto musí být GDI nejprve oddělen od malé GTPasy, aby ji bylo možno znovu aktivovat výměnou GDP za GTP (Collins, 2003).

2.1.1 Struktura malých GTPas

Stejně jako je univerzální mechanismus funkce malých GTPas, musí být také univerzální jejich základní struktura zodpovědná za vazbu a hydrolyzu nukleotidů. Všechny malé GTPasy mají centrální doménu složenou ze šesti β -skládaných listů obklopených pěti α -helixy (Obr. 3). Na této doméně je přítomno GTP/GDP-vazebné místo (Bourne *et al.*, 1991; Heider *et al.*, 2010).



Obr. 3: Struktura základní centrální části malých GTPas tvořena ze šesti β -skládaných listů a pěti α -helixů. Na místech označených switch I a switch II dochází k hlavním konformačním změnám v závislosti na vazbě GTP/GDP. Upraveno dle Vetter a Wittinghofer, 2001.

Oblasti, které vykazují strukturně největší odlišnosti mezi aktivním a inaktivním stavem, se označují jako switchI a switchII (Obr. 3). Obě tyto oblasti jsou zapojeny ve většině, pokud ne ve všech, interakcích malých GTPas s vazebnými partnery (Lee *et al.*, 2009). Vysoká podobnost centrální části malých GTPas u všech eukaryot poukazuje na jejich důležitost. Ostatní domény, které obklopují tuto základní část, jsou však velmi různorodé, protože regulace pomocí malých GTPas závisí na vazbě specifických efektorů. Malé modifikace sekvence a tím způsobené změny ve struktuře jiných, než centrálních částí GTPas tak umožňují specializaci GTPas na různé efekторы (Rojas *et al.*, 2012).

2.1.2 Rozdělení malých GTPas

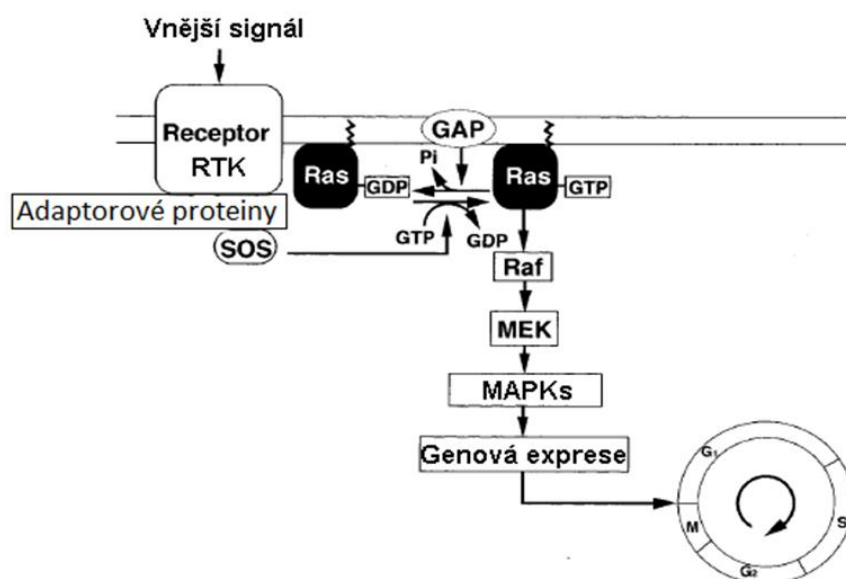
Studium malých GTPas začalo s objevením virového ras onkogenu, který u krys způsoboval zhoubné nádory, sarkomy. Odtud dostal své jméno ras (rat sarcoma). Z tohoto důvodu se někdy pro označení všech malých GTPas používá název Ras GTPasy. Tento název se však používá zvláště také pro jednu konkrétní třídu malých GTP. Malé GTPasy se dělí na základě strukturní a funkční podobnosti do 5 tříd: Ras, Rho (homolog Ras, Ras homologous), Ran (jaderný protein příbuzný Ras, Ras-related nuclear protein), Arf (ADP ribosylační faktor, ADP ribosylation factor) a Rab (protein příbuzný Ras izolován z mozku, Ras-related in brain) (Stenmark a Olkkonen, 2001; Cox a Der, 2010). Genom *Arabidopsis* obsahuje 93 genů pro malé GTPasy. Nachází se zde 57 různých Rab GTPas, 21 Arf, 11 Rho a 4 Ran GTPasy. Žádné Ras GTPasy nebyly u rostlin nalezeny (Vernoud *et al.*, 2003). V následujících kapitolách budou popsány jednotlivé třídy malých GTPas s hlavním zaměřením na Rab GTPasy.

2.1.2.1 Ras GTPasy

Ras GTPasy hrají důležitou roli v kontrole buněčných signálních drah, které ovlivňují transkripci genů a tím i růst, proliferaci, diferenciaci, morfologii a apoptosu buněk (Rojas *et al.*, 2012). Studie provedené u modelových organismů umožnily vytvořit model signální dráhy, jejíž součástí jsou Ras GTPasy, a který znázorňuje Obr. 4 (Takai *et al.*, 2001).

Různé mimobuněčné signály mohou aktivovat Ras GTPasy v této dráze vazbou na receptor v plasmatické membráně. Velké množství mimobuněčných signálů interaguje s tyrosinkinovým receptorem (RTK – receptor tyrosin kinase) a podněcuje jeho dimerizaci a autofosforylaci. Fosfátové skupiny na RTK poté mohou navázat adaptorové

proteiny, které dále umožní vazbu nejznámějšího Ras GEF označovaného SOS (Son of Sevenless). SOS zprostředkuje výměnu GDP za GTP na Ras GTPase a aktivuje ji tak. Ras GTPasy regulují genovou expresi aktivací protein kinasové kaskády, která začíná aktivací Raf GTPasy. Raf GTPasa poté fosforyluje a aktivuje MEK (mitogenem aktivovaná proteinkinasa kinasa, mitogen-activated protein kinase kinase), které aktivují MAPKs (mitogenem aktivované proteinkinasy, mitogen-activated protein kinases). Substráty MAPKs jsou různé cytoplasmatické a jaderné proteiny, což poukazuje na schopnost transportu MAPKs do jádra, kde dojde k fosforylaci a aktivaci různých transkripčních faktorů (Leevers *et al.*, 1994; Takai *et al.*, 2001; Downward, 2003; Mitin *et al.*, 2005). Kromě výše uvedené Raf/MAPKs dráhy, byly popsány i další dráhy, ve kterých vystupují Ras GTPasy v důležité úloze. Pro správnou funkci Ras GTPas je nezbytná jejich vazba na cytoplasmatickou stranu plasmatické membrány, kterou zajišťuje farnesyl připojený k Ras GTPasám v průběhu post-translační modifikace (Downward, 2003).



Obr. 4: Model signální dráhy s Ras GTPasami. Různé vnější signály aktivují receptor (často tyrosinkanasový receptor RTK), jehož následná autofosforylace umožní vazbu adaptorového komplexu, na který se poté naváže SOS (Ras GEF) a umožní výměnu GDP za GTP na Ras GTPase, čímž ji aktivuje. Opačný účinek (stimulaci GTPasové aktivity a následnou hydrolýzu GTP vedoucí k inaktivaci Ras GTPasy) má GAP. Aktivní Ras GTPasa dále spouští kaskádu, kde každý následující člen dráhy je aktivován fosforylací od předchozího člena. Jsou tak aktivovány Raf, MEK, MAPKs a nakonec transkripční faktory, které regulují genovou expresi. Upraveno dle Takai *et al.*, 2001; Knickelbein a Zhang, 2015.

Vzhledem k regulačním vlastnostem Ras GTPas není překvapující, že porucha jejich funkce vede k tvorbě rakovinových nádorů. Děje se tak mutací v Ras GTPasových genech, které vedou k selhání GTPasové aktivity, Ras GTPasy se tak vyskytují stále v aktivní formě (Downward, 2003; Fernández-Medarde a Santos, 2011).

Jak již bylo uvedeno, u rostlin se Ras GTPasy nevyskytují (Vernoud *et al.*, 2003).

2.1.2.2 Rho GTPasy

Tato třída malých GTPas je přítomna u všech eukaryot, kde plní důležitou úlohu v mnoha buněčných procesech (jako je buněčné dělení, morfogeneze a polarizace buňky), z nichž má velké množství souvislost s aktinovým cytoskeletem a vesikulárním transportem (Hall, 1998; Fritz a Pertz, 2016).

U obratlovců a bezobratlých se Rho GTPasy dělí na tři podtřídy podle funkce a sekvenční homologie: Cdc42, Rac a Rho. U jiných eukaryot však mohou některé z těchto tříd chybět. Rostliny mají pouze jednu unikátní třídu Rho GTPas, která u jiných eukaryot nebyla nalezena, označuje se proto jako Rop (Rho of Plants) (Li *et al.*, 1998; Takai *et al.*, 2001). Vzhledem k nepřítomnosti Ras GTPas a ostatních tříd Rho GTPas u rostlin, existuje hypotéza, že Rop GTPasy mohou zde nahrazovat tyto GTPasy v signálních drahách (Yang, 2002).

Analýza genomu *Arabidopsis* odhalila přítomnost 11 Rop GTPas, které jsou zapojeny v regulaci organizace a dynamiky aktinového a mikrotubulového cytoskeletu, v endocytose a exocytose, tvorbě sekundární buněčné stěny a v odpovědi na bakteriální a houbové patogeny. Změnou dynamiky a organizace cytoskeletu a vesikulárního transportu ovlivňují Rop GTPasy polaritu a tvar buněk, tvorbu a prodlužování kořenových vlásků a pylové láčky (Baxter-Burrell *et al.*, 2002; Vernoud *et al.*, 2003; Craddock *et al.*, 2012; Chen a Friml, 2014).

Pro vykonávání svých funkcí musí být Rop GTPasy navázány na membránu, kde přenáší signál z membránových receptorů. To je umožněno připojením lipidové složky v průběhu post-translační modifikace dvěma způsoby: isoprenylací (kovalentní ireversibilní vazbou farnesyly nebo geranylgeranylu) nebo S-acylací (kovalentní reversibilní vazbou zbytků kyseliny palmitové nebo stearové) (Sorek *et al.*, 2009).

Rop GTPasy jsou zapojeny i v signalizaci v auxinových a ABA dráhách (Miyawaki a Yang, 2014).

2.1.2.3 Ran GTPasy

Hlavní rolí Ran GTPas je řízení transportu přes jadernou membránu v interfázi buněčného cyklu. Jako všechny GTPasy se i Ran vyskytují ve dvou stavech: v aktivním s navázaným GTP nebo inaktivním s GDP. Ran-GDP se vyskytuje v cytoplasmě, protože je zde Ran-GAP, který umožňuje hydrolýzu GTP na GDP. Naopak Ran-GEF se nachází v jádře, a proto je aktivní forma Ran GTPas lokalizována v jádře. Toto rozložení je nezbytné pro zajištění správného směru transportu přes jaderné póry (Matunis *et al.*, 1996). Při jaderném transportu vážou náklad z jádra speciální proteiny (exportiny), které prochází přes jaderné póry do cytoplasmy, pouze pokud se na nich v jádře naváže aktivní Ran GTPasa. V cytoplasmě je tato Ran GTPasa inaktivována hydrolýzou GTP, čímž se zde uvolní i náklad a exportin se vrací do jádra. Podobný mechanismus platí i pro opačný směr transportu, který je zprostředkován jadernými importiny a transport přes jaderné póry směrem do jádra v tomto případě probíhá bez vazby Ran GTPasy na importiny. Vazba aktivní Ran GTPasy v jádře je poté však nezbytná pro uvolnění tohoto nákladu a transportu importinu zpět do cytoplasmy (Takai *et al.*, 2001; Ullman *et al.*, 1997).

V průběhu mitosis, kdy dochází k rozpadu jaderné membrány je Ran-GEF lokalizován na chromatinu, díky tomu vzniká gradient aktivních Ran GTPas v buňce, což pravděpodobně podněcuje tvorbu dělicího vřeténka (Hetzer *et al.*, 2002).

Na rozdíl od ostatních GTPas nejsou Ran post-translačně modifikovány přidáním lipidové složky a nenapojují se na membrány (Rush *et al.*, 1996).

U *Arabidopsis* jsou přítomny 4 Ran GTPasy, z nichž některé jsou důležité při reakci na abiotický stres (solný, chladový a sucho). Tak např. bylo zjištěno, že zvýšená tvorba RAN1 u *Arabidopsis* zvyšuje odolnost vůči nízkým teplotám. Tyto funkce nejspíše souvisí s jejich schopností regulace průběhu buněčného cyklu a jaderného transportu (Vernoud *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2016).

2.2 GTPASY REGULUJÍCÍ VESIKULÁRNÍ TRANSPORT

Vesikulární transport podléhá regulaci tří malých GTPas: Arf/Sar, Rab a Rho (Molendijk *et al.*, 2004). Arf/Sar GTPasy řídí prvotní kroky procesu, konkrétně shlukování speciálních proteinů, zvaných adaptorové a obalové proteiny, na membráně donorové organely. Tyto proteiny zprostředkují výběr nákladu určeného k transportu a počáteční zformování (tzv. pučení) vesikul (Pucadyil a Schmid, 2009). Bylo potvrzeno, že Rab GTPasy jsou zapojeny v regulaci všech kroků vesikulárního transportu (zformování

vesikul, odštěpení vesikul z membrán, jejich transport cytoplasmou a splynutí se správnou cílovou membránou konkrétní organely, do níž má být obsah vesikulu transportován) (Zerial a McBride, 2001; Stenmark, 2009). U *Arabidopsis* tyto dvě třídy tvoří dohromady asi 84 % všech malých GTPas.

Jak již bylo uvedeno, ve vesikulárním transportu hrají úlohu také Rho GTPasy. Ty jej však regulují nepřímo řízením organizace aktinového cytoskeletu, po němž jsou vesikuly s nákladem transportovány. Důležitost Rho GTPas ve vesikulárním transportu byla popsána zejména u buněk s polarizovaným růstem, kde tyto GTPasy vytvářejí a zachovávají podélné uspořádání aktinových filament, a tím určují směr transportu vesikul směrem k rostoucímu konci buňky (Fu *et al.*, 2001).

2.2.1 Arf/Sar GTPasy

Arf (ADP-ribosylation factor) a příbuzné Sar (se sekrecí asociovaná Ras rodina, secretion-associated Ras superfamily), malé GTPasy přítomné u všech eukaryot, se účastní tvorby proteinových obalů, které obklopují transportní vesikuly (Pucadyil a Schmid, 2009). Proteinový obal má dvě funkce. Pomáhá k membráně shromažďovat proteiny určené k transportu a napomáhá tvorbě vesikul tvarováním membrány, z níž se vesikuly odštěpí. Obal tvoří dvě vrstvy proteinů, vnitřní, tvořená adaptorovými proteiny a vnější (v kontaktu s cytoplasmou), kterou tvoří obalové proteiny. Existují tři dobře charakterizované proteinové obaly: klathrinové (tvořené proteinem klathrinem), COPI (komplex obalového proteinu I, coat protein complex I) a COPII (coat protein complex II). Arf se podílí na tvorbě COPI obalů u vesikul účastnících se retrográdního transportu z Golgiho aparátu do endoplasmatického retikula a klathrinových vesikul transportovaných z *trans*-Golgiho sítě. Reguluje také endocytosu a transport vesikul pro tvorbu buněčné přepážky při cytokinezi (Naramoto *et al.*, 2010; Richter *et al.*, 2014). Sar se účastní tvorby COPII vesikul nesoucích náklad z ER do GA (Wieland a Harter, 1999; Brandizzi a Barlowe, 2013). Geldner *et al.* (2003) ve své studii také popsali zapojení Arf GEF označovaného jako GNOM v recyklaci vesikul z endosomů na PM a v transportu auxinu (Geldner *et al.*, 2003).

Sar1 se v inaktivní formě s GDP nachází v cytoplasmě. Na membráně ER je jeho GEF zvaný Sec12, který oddělí GDP od Sar1. Po vazbě GTP na Sar1 dojde ke konformačním změnám, uvolní se amfifilní α -helix a pronikne do jedné vrstvy membrány ER (Lee *et al.*, 2005; Miller a Barlowe, 2010). Na takto ukotvený Sar1 v membráně ER se poté vážou obalové proteiny a ukotvení současně také snižuje rigiditu membrány, takže snáze dojde

k jejímu zakřivování při formování vesikul. Rozpad obalu již odštěpeného vesikulu následuje po hydrolýze GTP na GDP, přičemž se uvolní α -helix z membrány vesikulu. Vesikul tak může následně splynout s membránou GA (Settles *et al.*, 2010). U Arf GTPas byl popsán podobný mechanismus funkce (Cevher-Keskin, 2013).

2.2.2 Rab GTPasy

Nejpočetnější třída malých GTPas, Rab GTPasy, hraje nezastupitelnou úlohu v regulaci vesikulárního transportu. Skrze přímou či nepřímou interakci Rab GTPas s efektorovými proteiny řídí tyto GTPasy téměř veškeré procesy spojené s vesikulárním transportem (Stenmark, 2009).

2.2.2.1 Rozdělení Rab GTPas

V genomu *Arabidopsis* bylo nalezeno 57 různých Rab GTPas, označovaných jako AtRab GTPasy (*Arabidopsis thaliana*), které mohou být rozděleny do 8 tříd na základě sekvenční podobnosti. Tyto třídy se označují písmeny A-H (AtRabA-AtRabH). Názvy a zastoupení Rab GTPas v jednotlivých třídách popisuje Tabulka 1 (Pereira-Leal a Seabra, 2001; Vernoud *et al.*, 2003). V odborné literatuře se vyskytuje i číselné označení, které se používá pro savčí Rab GTPasy. Třídám A-H u *Arabidopsis* tak odpovídá 11, 2, 18, 1, 8, 5, 7 a 6 u savců. Pro srovnání, v genomu kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* je obsaženo 11 Rab GTPa a u člověka je to přibližně 70 (Pereira-Leal a Seabra, 2001).

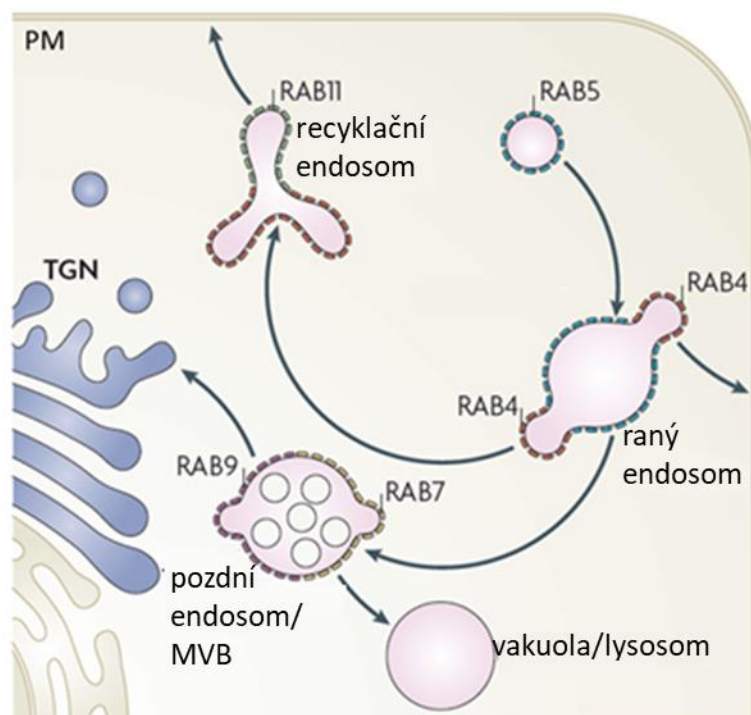
Jednotliví členové třídy Rab GTPas se lokalizují do různých intracelulárních oddělení, kde regulují události vesikulárního transportu. Vernoud *et al.* (2003) předpověděli jejich funkci a umístění na membránách zapojených ve vesikulárním transportu u rostlin, na základě podobnosti jejich sekvencí s kvasinkovými a živočišnými Rab GTPasami, které jsou lépe prozkoumané. Bylo totiž zjištěno, že pokud Rab GTPasy vykazují sekvenční homologii genů u různých druhů organismů (kvasinka, člověk, *Arabidopsis*), tak tyto konkrétní Rab GTPasy vykonávají ve všech druzích stejnou funkci a jsou lokalizovány na stejné membráně stejné organely. Takto předpovězené funkce většiny rostlinných Rab GTPas však ještě nebyly experimentálně potvrzeny (Vernoud *et al.*, 2003). Rozložení jednotlivých Rab GTPas na různých membránách organel vesikulárního transportu znázorňuje Tabulka 1.

Tab. 1: Rozdělení Rab GTPas u *Arabidopsis*, jejich označení a lokalizace na membránách nebo funkce. TGN *trans*-Golgiho síť, ER endoplasmatické retikulum, GA Golgiho aparát. Vytvořeno dle Vernoud *et al.*, 2003.

Název třídy Rab GTPas	Počet Rab GTPas ve třídě	Označení jednotlivých Rab GTPas	Lokalizace na membránách/funkce
A	26	AtRabA1a-i, AtRabA2a-d, AtRabA3, AtRabA4a-e, AtRabA5a-e, AtRabA6a, AtRabA6b	TGN a vesikuly z něj odštěpené, transport GA-PM, polarizovaný růst (kořenové vlásky), recyklace komponentů buněčné stěny
B	3	AtRabB1a-c	GA, transport mezi GA cisternami
C	3	AtRabC1, AtRabC2a, AtRabC2b	Polarizovaný růst buněk
D	4	AtRabD1, AtRabD2a-c	ER-GA transport
E	5	AtRabE1a-e	Polarizovaná sekrece
F	3	AtRabF1, AtRabF2a, AtRabF2b	Endosomy
G	8	AtRabG1, AtRabG2, AtRabG3a-f	Lysosomy/vakuoly
H	5	AtRabH1a-e	ER-GA retrogradní transport

2.2.2.2 Rab domény

Významným a mimořádně důležitým znakem Rab GTPas je rozdílná lokalizace na různých membránách. Je zřejmé, že vesikuly při cestě cytoplasmou narazí na množství membrán, se kterými by mohly splynout. Rab GTPasy slouží jako markery označující povrch membrán a zajišťují tak specifitu vesikulárního transportu. Každá Rab GTPasa se váže na jednu nebo více membránových organel a každá membránová organela obsahuje jeden nebo více Rab proteinů (Sönnichsen *et al.*, 2000; Barr, 2013). Způsob, kterým je zajištěn přesný mechanismus této funkce, není zcela znám, ale usuzuje se na roli GDFs (GDI přemísťující faktory, GDI displacement factors), které, přítomné na membránách, specificky rozpoznávají Rab-GDI komplexy, umožňují uvolnění GDI a tím asociaci konkrétní Rab GTPasy s membránou. Různé Rab GTPasy lokalizované na stejné organele vytvářejí Rab domény (Obr. 5) (Sönnichsen *et al.*, 2000; Sivars *et al.*, 2003, Barr, 2013). Rozložení jednotlivých Rab GTPas na membránách organel ukazuje tabulka výše (Tab. 1).



Obr. 5: Znárodnění Rab domén na jednotlivých organelách u živočichů. Každá z organel vesikulárního transportu obsahuje na své membráně místa obohacena o konkrétní Rab GTPasu a tato místa se označují jako Rab domény. Rab5 zde regulují endocytosu a splývání z ní vzniklých vesikul s ranými endosomy. Rab4 regulují recyklační krok z raných endosomů zpět na plasmatickou membránu (PM) nebo do recyklačního endosomu. Rab11 regulují tentýž krok, ale v pozdější fázi z recyklačních endosomů. Přijatý náklad určený pro degradaci je v raném endosomu roztríděn transportován do pozdního endosomu pod kontrolou Rab7. Recyklace receptorů do *trans*-Golgiho sítě (TGN) se děje na pozdním endosomu/multivesikulárním tělísku (MVB) pod regulací Rab9. Upraveno dle Stenmark *et al.*, 2009.

Rané a recyklační endosomy u živočichů obsahují kombinaci Rab4, Rab5 a Rab11. Byly zde pozorovány tři domény: pouze Rab5, kombinace Rab5 a Rab4 a kombinace Rab4 a Rab11. Tyto domény jsou dynamické, ale nedochází k jejich promíchávání (Sönnichsen *et al.*, 2000). Je zřejmé, že musí existovat nějaký mechanismus, který vytváří tyto domény. Jeden z mechanismů může být zprostředkován efektorovými proteiny, např. lokální aktivací GEF proteinů. Uplatňuje se zde poté pozitivní zpětná vazba: Rab GTPasy aktivované GEF proteiny přitahují další GEF proteiny na membránu a tím je umožněna aktivace dalších Rab GTPas. Bylo zjištěno, že velké množství Rab efektorů obsahuje vazebná místa pro dvě a více různých Rab GTPas, což může mít funkci v udržování různých domén na jedné membráně (Stenmark, 2009).

Funkci domén mohou ozřejmit následující příklady. Rané endosomy obsahují Rab5 a Rab4 domény zapojené ve splývání vesikul a jejich recyklaci. Vesikul vzniklý endocytosou obsahuje Rab5, které splývají s Rab5 doménami na raném endosomu.

Z Rab4 domén na endosomu probíhá recyklace (do recyklačního endosomu nebo na PM), přičemž recyklační endosom přijímá tyto vesikuly také do domén obohacených o Rab4. Recyklační endosom obsahuje domény Rab4 a Rab11. Doména Rab11 posílá vesikuly na plasmatickou membránu. Pozdní endosomy obsahují domény Rab7 a Rab9. Rab7 přijímá vesikuly z Rab5 domény raného endosomu a posílá je do lysosomů/vakuol. Rab9 domény umožňují komunikaci mezi pozdním endosomem a TGN (Obr. 5) (Stenmark, 2009).

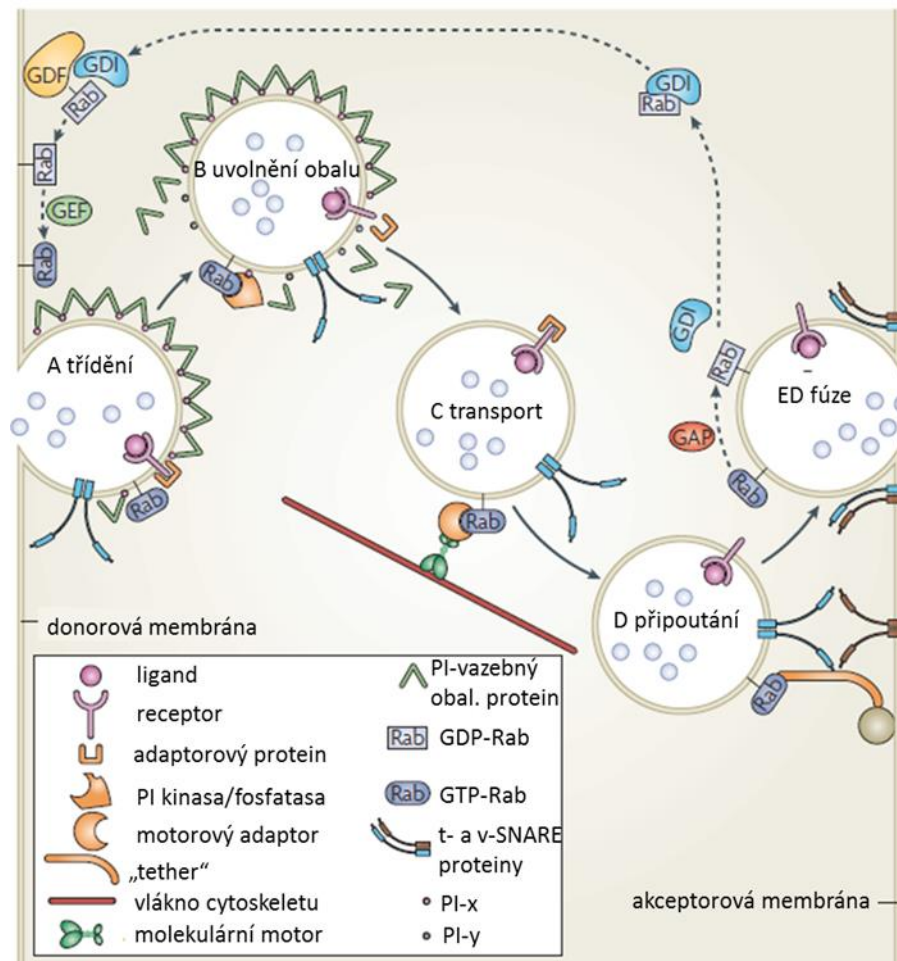
Rab GTPasy zajišťují identitu membrán také tím, že kontrolují lokální přítomnost fosfatidylinositolů (PI) na membráně. Fosfatidylinositoly, společně s Rab GTPasami, regulují vesikulární transport na základě své fosforylace nebo defosforylace pomocí fosfatidylinositol kinas a fosfatas. PI slouží také k přitahování specifických proteinových komplexů na membránu a tím spolupracují s Rab na vytvoření membránové identity, slouží tedy jako markery membrán. Bylo potvrzeno, že Rab mohou být schopné kontrolovat fosfatidylinositolové složení membrány (Fukuda *et al.*, 2008; Jean a Kiger, 2012; Noack a Jaillais, 2017). Např. Rab5 zprostředkuje aktivaci fosfatidylinositol-3-kinasy (PI3K), která produkuje fosfatidylinositol-3-fosfát (PI(3)P) na membráně endosomů (Christoforidis *et al.*, 1999). Zajímavé je, že Rab5 efektor (EEA1 (antigen raného endosomu 1, early endosome antigen 1) a rabenosyn 5 obsahují PI(3)P-vazebnou doménu a jsou pravděpodobně připojovány na membránu na základě přítomnosti jak Rab5, tak PI(3)P. Rab5 zde mají tedy duální roli, což zajišťuje větší specifitu vesikulárního transportu (Simonsen *et al.*, 1998; Nielsen *et al.*, 2000). Rab5 kontrolují i další enzymy zahrnuté v PI metabolismu, např. PI3K, která produkuje na PM fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát (PI(3,4,5)P₃), a také fosfatidylinositol-4-fosfát fosfatasu a fosfatidylinositol-5-fosfát fosfatasu (Shin *et al.*, 2005). Rab5 tak mohou kontrolovat PI složení svých domén na membránách (Stenmark, 2009).

Koordinace jednotlivých Rab GTPas může být umožněna čtyřmi způsoby: (1) pozitivní zpětná vazba: aktivní Rab GTPasa zprostředkuje vazbu efektoru, který obsahuje GEF pro stejnou Rab GTPasu, (2) sdílení efektorů: efektor jedné Rab GTPasy obsahuje vazebné místo i pro jinou Rab GTPasu, čímž je zajištěno přibližování membrán nebo souhra mezi více Rab doménami na jedné membráně, (3) spojená aktivace: efektor jedné Rab GTPasy slouží jako GEF pro jinou Rab GTPasu, (4) negativní zpětná vazba: efektor jedné Rab GTPasy se uplatňuje jako GEF pro jinou Rab GTPasu, jejíž efektor slouží jako GAP pro první Rab GTPasu, takto může docházet k úplné přeměně určité domény na jinou. Poslední případ se uplatňuje např. v procesu zrání raných endosomů na pozdní,

kdy se mění zastoupení Rab5 na raném endosomu na Rab7 pozdního endosomu (Del Conte-Zerial *et al.*, 2008; Stenmark, 2009).

2.2.2.3 Mechanismus regulace vesikulárního transportu pomocí Rab GTPas

Rab GTPasy se mohou účastnit regulace všech kroků vesikulárního transportu, jak bude podrobněji popsáno v následujících podkapitolách, a jak znázorňuje Obrázek 6.



Obr. 6: Znázornění funkce Rab GTPas ve vesikulárním transportu. A) Aktivní GTP-Rab GTPasy stimulují adaptorové proteiny k třídění a výběru nákladu určeného k transportu. B) Rab GTPasy přitahují fosfatidylinositol (PI) kinyasy nebo fosfatasy, které mění fosfatidylinositolové složení membrány vesikulu (z PI-x na PI-y), čímž dojde k odpoutání PI-vazebných obalových proteinů a uvolnění obalu. C) Rab GTPasy zprostředkují transport vesikul po aktinových nebo mikrotubulových vláknech vazbou na adaptory molekulárních motorů nebo přímo na molekulární motory. D) Rab GTPasy aktivují proteiny zajišťující připoutání na akceptorovou membránu tzv. tethering proteiny, které interagují s proteiny na akceptorové membráně. Mohou také aktivovat SNARE proteiny, které zajistí fúzi membrán. E) Po dokončení fúze dojde k inaktivaci Rab GTPas pomocí GAP, odpoutáním Rab GTPas z membrány a asociace s GDI. Návrat Rab GTPasy k donorové membráně je zprostředkovaný pomocí GDI. Upraveno dle Stenmark, 2009.

Úloha Rab GTPas v selekci proteinů a tvorbě vesikul

Selekce neboli třídění nákladu (angl. sorting) do specifického transportního vesikulu je základním procesem vesikulárního transportu. Třídění je realizováno asociací transmembránových proteinů, představujících buď samotný náklad, nebo receptory pro náklad, s obalovými komplexy. Proteinový obal představuje seskupení adaptorových a obalových proteinů normálně lokalizovaných v cytoplasmě. Různé obalové komplexy rozpoznávají specifické struktury na různých nákladech. Sestavení proteinového obalu se tak stává specifickým procesem určeným povahou transportovaného nákladu. Kromě nákladu zajišťují specifické sestavení obalu na konkrétní membráně také Rab GTPasy (Stenmark, 2009).

Příkladem poukazujícím na mechanismus může být zapojení živočišných Rab9 GTPas v sestavení proteinového obalu na pozdním endosomu, kde dochází k recyklaci mannososa-6-fosfátového receptoru do TGN. Adaptorový protein zajišťující výběr nákladu, který se váže na cytoplasmatickou část mannososa-6-fosfátového receptoru, je efektoem Rab9 GTPasy přítomné na membráně pozdního endosomu. Interakce s Rab9 dále zvyšuje afinitu adaptorového proteinu pro mannososa-6-fosfátový receptor, a také vede k přitahování dalších adaptorových proteinů na tuto membránu, čímž je zprostředkován výběr mannososa-6-fosfátových receptorů do nově vznikajících vesikul (Carroll *et al.*, 2001).

Úloha Rab GTPas ve ztrátě proteinového obalu

Po odštěpení vesikulu z membrány donorové organely následuje velmi rychlá ztráta proteinového obalu, který splnil svou úlohu v selekci nákladu a formování vesikul. Při splynutí vesikulu s membránou cílové organely by proteinové obaly interferovaly, musí být proto před tímto krokem odhozeny. I zde hrají důležitou roli Rab GTPasy. Např. interakce adaptorového komplexu AP2 (adaptor-related protein complex 2), který je součástí klathrinových obalů a účastní se tvorby endocytických vesikul z plasmatické membrány, s membránou, je stabilizována fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátem (PI(4,5)P₂) a zintenzivněna přítomností AP2-asociované kinasy AAK1, která fosforyluje podjednotku AP2. Rab5 GTPasa přítomná na těchto endocytických vesikulech umožňuje odstranění proteinového obalu defosforylací podjednotky AP2 a zprostředkováním vazby fosfatidylinositol fosfatasy nebo fosfatidylinositol-3 kinasy (PI3K), které přemění PI(4,5)P₂ na jiné fosfatidylinositoly. Tímto způsobem oslabení vazby AP2 na membránu

vesikulu vyvolá rozpad celého proteinového obalu (Cremona *et al.*, 1999; Semerdjieva *et al.*, 2008).

Úloha Rab GTPas v transportu vesikul

Transport k cílové organelle je zprostředkován aktinovým a mikrotubulovým cytoskeletem a odpovídajícími molekulárními motory vedoucími vesikul po cytoskeletálních vláknech (Stenmark, 2009). Připojení molekulárních motorů, myosinů, transportujících náklad po aktinových vláknech, k transportovanému vesikulu zajišťují Rab GTPasy přítomné v membráně tohoto vesikulu. Ty se na myosiny mohou připojit buďto přímo nebo prostřednictvím svých efektorových proteinů (Lindsay *et al.*, 2015). Kinesiny a dyneiny, molekulární motory transportující náklad po mikrotubulových vláknech, jsou také regulovány Rab GTPasami. Mohou být přímými efektory Rab GTPas, ale je zde možná i nepřímá interakce přes jiné efektorové proteiny. (Horgan *et al.*, 2010; Delevoye a Goud, 2015)

Rab GTPasy a SNARE proteiny: úloha ve fúzi membrán

Aby mohlo dojít ke splynutí dvou membrán, musí být překonána vzdálenost mezi nimi a dojít k přímému kontaktu. Rab GTPasy mohou být přítomné na některé ze dvou membrán (nebo na obou) a umožnit jejich přiblížení vazbou další třídy efektorových proteinů zvaných angl. tethering proteiny (poutající proteiny). Tyto proteiny získaly svůj název díky schopnosti připojit vesikul k cílové membráně, resp. připojit k sobě dvě membrány, které mají splynout (Guo *et al.*, 1999). Dělí se do dvou skupin: dlouhé fibrilární proteiny a velké multiproteinové komplexy (Kümmel a Heinemann, 2008). Jedna část takového proteinu obsahuje vazebné místo pro Rab GTPasu přítomnou na jedné membráně a protilehlá část proteinu má vazebné místo pro protein navázaný na cílové membráně (může jít také o Rab GTPasu nebo jiný protein). Tak je zajištěno přiblížení těchto dvou membrán (Saito a Ueda, 2009). Příklad ukazující mechanismus najdeme opět ve studii živočišných Rab GTPas. Tak např. Rab5, která řídí homotypickou fúzi raných endosomů a vesikul s ranými endosomy, má dva dobře prozkoumané tethering (poutající) proteiny: rabenosyn 5 a early endosomal antigen1 (EEA1). N-konec i C-konec EEA1 obsahují místa pro vazbu Rab5, takže EEA1 může zprostředkovat přibližování dvou vesikul obsahujících v membráně Rab GTPasu a může se tedy uplatňovat např. v homotypickém splývání endocytických vesikul mezi sebou (Simonsen *et al.*, 1998; Nielsen *et al.*, 2000; Rubino *et al.*, 2000).

K samotnému splynutí dvou membrán je však zapotřebí ještě další třídy proteinů označovaných jako SNARE (soluble NSF (N-ethylmaleimide-Sensitive Factor)-association protein) (Han *et al.*, 2017). SNARE jsou relativně malé proteiny (asi 200-400 AMK) charakteristické přítomností helikální SNARE domény. Tato doména je tvořena 60-70 AMK, které se opakují po sedmi. Většina SNARE proteinů je asociována s membránami přes C-koncovou transmembránovou doménu (Jahn a Scheller, 2006; Lipka *et al.*, 2007; Han *et al.*, 2017).

Dříve byly SNARE děleny na t-SNARE asociované s cílovou membránou (target) a v-SNARE asociované s membránou vesikulu. Avšak toto rozdělení nemůže být aplikováno na homotypické vesikuly a splývání, které se vyskytuje mezi endosomy a vakuolami. Alternativně se proto používá označení na základě aminokyselinové sekvence ve SNARE doméně. Pokud je zde konzervován glutamin (Q), jedná se o Q-SNARE, které odpovídají t-SNARE. Pokud je konzervován arginin, označují se jako R-SNARE a odpovídají v-SNARE (Hong, 2005).

v-SNAREs mají jeden polypeptidový řetězec, t-SNAREs mají 2-3 polypeptidové řetězce. Jeden helix z t-SNARE je vždy připojen na transmembránový protein, ostatní dva mohou nebo nemusí být také součástí transmembránového proteinu. Helikální doména z v-SNAREs se ovine okolo tří helikálních domén z t-SNAREs a vytvoří se čtyř helixový balík, tomuto uspořádání se říká *trans*-SNARE komplex. Energie uvolněná při vytvoření *trans*-SNARE komplexu je využita pro překonání odporu mezi dvěma membránami a k jejich splynutí (Hanson *et al.*, 1997; Min, 2013).

Po dokončení fúze se *trans*-SNARE komplex přemění na *cis*-SNARE komplex, který je přítomen na zfúzované membráně a dochází k recyklaci SNARE proteinů pomocí komplexu NSF (N-ethylmaleimide-Sensitive Factor), který je členem AAA rodiny (ATPases associated with diverse cellular activities). Jedná se o skupinu enzymů, která katalyzuje přestavbu proteinových komplexů. NSF se nachází v cytoplasmě a k membráně je poután pomocí proteinu alfa-SNAP (soluble NSF-association protein). Jak již bylo uvedeno, SNARE proteiny jsou receptory alfa-SNAP proteinu (Söllner *et al.*, 1993; Lupas a Martin, 2002). K *cis*-SNARE komplexu se naváže SNAP, přitáhne NSF a ATP hydrolyza pomocí NFS umožní disociaci *cis*-SNARE komplexu. SNAREs vykonávají dvojí funkci: sestavení *trans*-SNARE komplexu nezbytné pro splynutí dvou membrán a zajištění specifity fúze membrán, jelikož každá membrána obsahuje jiné SNARE proteiny (Cipriano *et al.*, 2013; Ryu *et al.*, 2015).

2.2.2.4 Rab5 GTPasy v endocytose, endosomálním a vakuolárním transportu u rostlin

U rostlinných buněk existují dva mechanismy, kterými mohou být látky z vnějšího prostředí internalizovány. Jedním z nich je klathrinem zprostředkovaná endocytosa, kterou regulují Rab5 GTPasy. Druhou cestu představuje endocytosa z membránových mikrodomén (Vernoud *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2012; Malinsky *et al.*, 2013).

Tři členové třídy AtRabF GTPas u rostlin vykazují vysokou podobnost se savčí třídou Rab5 GTPas. Jedná se o AtRabF1 (někdy označovanou také jako Ara6), AtRabF2a (Rha1) a RabF2b (Ara7) (Vernoud *et al.*, 2003). Tyto tři Rab5 GTPasy je možno rozdělit do dvou skupin: a) na konvenční, mezi něž patří Ara7 a Rha1, b) netradiční Ara6 GTPasa (Ueda *et al.*, 2001).

2.2.2.5 Lokalizace Rab5 u rostlin

Všechny tři rostlinné Rab5 GTPasy jsou přítomny na endosomech, kde však dochází k překryvům jejich výskytu (Ueda *et al.*, 2001). Studie provedené s cílem určit přesnou lokalizaci Rab5 GTPas u rostlin dávají nekonzistentní výsledky.

Ueda *et al.* (2001) potvrdili zapojení Ara6 a Ara7 v cestě endocytosy na základě pozorování kolokalizace těchto dvou Rab5 GTPas s barvivem FM4-64, známým markerem pro cestu endocytosy (Ueda *et al.*, 2001). Další studie odhalila přítomnost Ara6 na raných endosomech (Grebe *et al.*, 2003) a její zapojení v recyklaci vesikul z raných endosomů na plasmatickou membránu (Ebine *et al.*, 2011). Naproti tomu Bottanelli *et al.* (2012) ve své studii pozorovali Ara6 v MVB a předpověděli její funkci v transportu vesikul z tohoto oddělení do vakuoly (Bottanelli *et al.*, 2012). Také v jiné studii byla pozorována kolokalizace Ara6 se SYP1 a SYP2, markery MVB (Ueda *et al.*, 2004). Stejně rozporuplné výsledky je možné najít také u Rha1 a Ara7, kde kromě výskytu na raných endosomech (Ueda *et al.*, 2004), byly tyto dvě Rab5 GTPasy pozorovány na MVB a pravděpodobně zde regulují transport vesikul do vakuoly (Sohn *et al.*, 2003; Kotzer *et al.*, 2004).

Ueda *et al.* (2004) na základě mikroskopického pozorování odhalili existenci pouze malého počtu vesikul obsahujících výhradně jednu Rab5 GTPasu. Většinou se lokalizace Ara6, Rha1 i Ara6 na vesikulech v různé míře překrývaly. Tato skutečnost společně s možným funkčním překryvem raných endosomů a MVB u rostlin může vysvětlovat nekonzistentní výsledky v lokalizacích Rab5 (Ueda *et al.*, 2004).

Vzhledem k zapojení Rab5 GTPas v transportu vesikul do vakuoly vyvstává otázka, jakou funkci u rostlin vykazují homologa živočišné Rab7 třídy účastníci se právě transportu vesikul z MVB do lysosomu. U rostlin byla přítomnost Rab7 potvrzena na tonoplastu (Bottanelli *et al.*, 2012). Změna zastoupení Rab5 na Rab7 u živočichů doprovází zrání raných endosomů v pozdní endosomy/MVB, v nichž jsou poté Rab7 GTPasy přítomny (Rink *et al.*, 2005; Vonderheit a Helenius, 2005). Přesný molekulární mechanismus regulace vakuolárního transportu u rostlin je z velké části neznámý (Ebine *et al.*, 2014). Obě třídy Rab5 a Rab7 kontrolují u rostlin vakuolární transport, ale jejich přesná úloha v této kontrole nebyla dosud zcela objasněna (Bottanelli *et al.*, 2012). Byla předpovězena možná existence nezávislých cest vakuolárního transportu, které jsou pod kontrolou jak Rab5 s Rab7 dohromady, tak pouze Rab5 nebo Rab7 (Ebine *et al.*, 2014).

2.2.2.6 Studium Rab5 GTPas pomocí mutantů

Pro studium funkce malých GTPas je možno použít více postupů. Např. záměnu konkrétních aminokyselin, která vede ke specifickým defektům ve vazbě a hydrolýze GTP. Pokud mutace způsobuje neschopnost záměny GDP za GTP a GTPasa má tak stále navázaný GDP, a navíc takto změněná GTPasa inhibuje funkci současně tvořené stejné normální, geneticky nemodifikované GTPasy, označuje se jako dominantně negativní (DN) mutace. Opačná mutace znemožňující hydrolýzu GTP je označována jako konstitutivně aktivní (CA). Mnoho funkcí Rab GTPas bylo zjištěno s použitím těchto mutací. Další informace můžeme získat zásahem do genů proteinů, které regulují cyklus GTPas (např. GEF a GAP). Nebo také u genových knock-outů efektorů GTPas, které se váží na aktivní GTPasy. Další možností studia malých GTPas je připojení fluorescenčních proteinů (Nielsen *et al.*, 2008). Výsledky různých studií, v nichž bylo použito také těchto metod při studiu Rab5 GTPas budou shrnuty v následujícím textu.

Ara6 (AtRabF1 GTPasy)

Ztráta funkce Ara6 nevede k odchylkám ve fenotypu v porovnání s divým typem *Arabidopsis* při růstu v normálních podmínkách (Ebine *et al.*, 2012). Konstitutivně aktivní Ara6 (CA Ara6) je lokalizována na raných endosomech a plasmatické membráně (Ebine *et al.*, 2012). Analýzy provedené s použitím nadexprese dominantně negativních mutantů (DN) daly různé výsledky (Sohn *et al.*, 2003; Bolte *et al.*, 2004; Ebine *et al.*, 2012).

Ara6 je specifická pouze pro rostliny, u jiných organismů nebyla nalezena její homologa. Liší se od klasických Rab GTPas v několika znacích. Předně jí schází hypervariabilní doména na C-konci a doména bohatá na cystein (tzv. cys motiv) lokalizovaná za hypervariabilní doménou. Na Cys motivu dochází k isoprenylaci v průběhu post-translační modifikace, která je nezbytná pro připojení GTPas na membránu. Hypervariabilní doména je nezbytná pro správnou subcelulární lokalizaci (Araki *et al.*, 1991; Chavrier *et al.*, 1991; Novick a Brennwald, 1993; Ueda *et al.*, 2001).

Také aminokyselinová sekvence efektorové domény na Ara6, která specifikuje funkci, zde neodpovídá doménám u jiných Rab GTPas (Dunn *et al.*, 1993; Ueda *et al.*, 2001).

Připojení Ara6 na membránu je namísto isoprenylace na Cys motivu zajištěno N-koncovou acylací zbytkem mastné kyseliny (kyseliny myristové nebo palmitové) (Ueda *et al.*, 2001). Bylo také zjištěno, že nepřítomnost Cys motivu dovoluje odpoutání Ara6 od membrány bez přítomnosti GDI, u ostatních členů Rab5 (Rha1 a Ara7) je však GDI zapotřebí (Ueda *et al.*, 2001).

Skutečnost, že rostliny používají zcela novou Rab GTPasu může poukazovat na nezávislý vývoj endocytosy a vakuolárního transportu, anebo odráží specializaci tohoto transportu na život rostlin. Transport zprostředkovaný Ara6 je totiž nezbytný pro odpověď rostlin na solný stres, o čemž bude detailněji pojednáno v dalších kapitolách (Ebine *et al.*, 2012).

Ara6 byla nalezena u všech rostlin, ale také u mechů a plavuní. Její přítomnost však nebyla potvrzena u jednobuněčných zelených řas. Tvoří se konstitutivně ve všech rostlinných orgánech (Ueda *et al.*, 2001; Matsuzaki *et al.*, 2004; Ebine *et al.*, 2012).

Rha1 (AtRabF2a GTPasy)

Mutace v GTP vazebném motivu mění lokalizaci Rha1: dominantně negativní Rha1 se nachází v cytosolu a konstitutivně aktivní Rha1 na tonoplastu vakuoly. Také mutace v efektorové doméně a v místě pro isoprenylaci zabraňují asociaci Rha1 s membránami a lokalizuje ji difuzně do cytosolu (Stenmark *et al.*, 1994; Li a Liang, 2001). To naznačuje, že jak GTP vazebný motiv, tak efektorová doména jsou nezbytné pro lokalizaci Rha1 na MVB (Lee *et al.*, 2004).

Akumulace CA Rha1 na tonoplastu je nejspíš způsobena znemožněním jejího uvolnění z této membrány, k odpojení je pravděpodobně zapotřebí právě její inaktivace. Tonoplast může představovat akceptorovou membránu pro vesikuly označené Rha1, což naznačuje

možnou cestu Rha1 z MVB na tonoplast. Rha1 však obvykle není detekována v tonoplastu, a to nespíš v důsledku toho, že se zde lokalizuje pouze přechodně (Lee *et al.*, 2004). U DN Rha1 mutantů jsou rozpustné vakuolární proteiny akumulovány v MVB a jejich transport do vakuoly je znemožněn (Sohn *et al.*, 2003). DN Rha1 způsobuje také sekreci části vakuolárních proteinů do média (Lee *et al.*, 2004).

Exprese Rha1 byla pozorována v podpurných buňkách průduchů mladých listů, v květech, kalózním pletivu, kořenových špičkách, v rostoucích semenáčcích a ve stonku u *Arabidopsis* (Terry *et al.*, 1993).

Ara7 (AtRabF2b GTPasy)

Ztráta funkce Ara7 se neprojevuje změnou fenotypu v normálních podmínkách (Ebine *et al.*, 2012). Dominantně negativní (DN) Ara7 je přítomna v cytoplasmě a na strukturách, které reprezentují Golgiho aparát. Konstitutivně aktivní (CA) Ara7 se nachází na tonoplastu (Kotzer *et al.*, 2004; Dhonukshe *et al.*, 2006).

Kotzer *et al.* (2004) zdůvodnili lokalizaci CA Ara7 na tonoplastu inhibicí jejího uvolnění z membrány MVB, přičemž tato inhibice souvisí s neschopností hydrolyzovat GTP. Možný cyklický pohyb Ara7 z GA do MVB byl také předpovězen na základě její lokalizace na GA. Přestože se Ara7 nachází na GA v inaktivní formě a Rab GTPasy se většinou v této formě nachází v cytosolu, je možné, že se váže na GDI nebo na efektorovou molekulu nacházející se v membráně GA (Kotzer *et al.*, 2004). Mutací způsobená beznukleotidová forma Ara7 se sníženou afinitou jak ke GTP, tak k GDP, stejně jako formy s mutací snižující schopnost isoprenylace, se lokalizují výhradně v cytoplasmě (Kotzer *et al.*, 2004).

Dominantně negativní Ara7 se vyvolala u některých proteinů určených pro transport do vakuoly, sekreci do apoplastu (Kotzer *et al.*, 2004). Konstitutivně aktivní (CA) Ara7 také způsobuje tvorbu zvětšených MVB, vyvolanou nejspíš homotypickým splýváním MVB (Jia *et al.*, 2013).

Nedávná studie prokázala také zapojení Ara7 v imunitní reakci rostlin. Defekt aktivace Ara7 vedl ke imunitě při infekci houbovým patogenem (Nielsen *et al.*, 2017).

2.3 SOLNÝ STRES

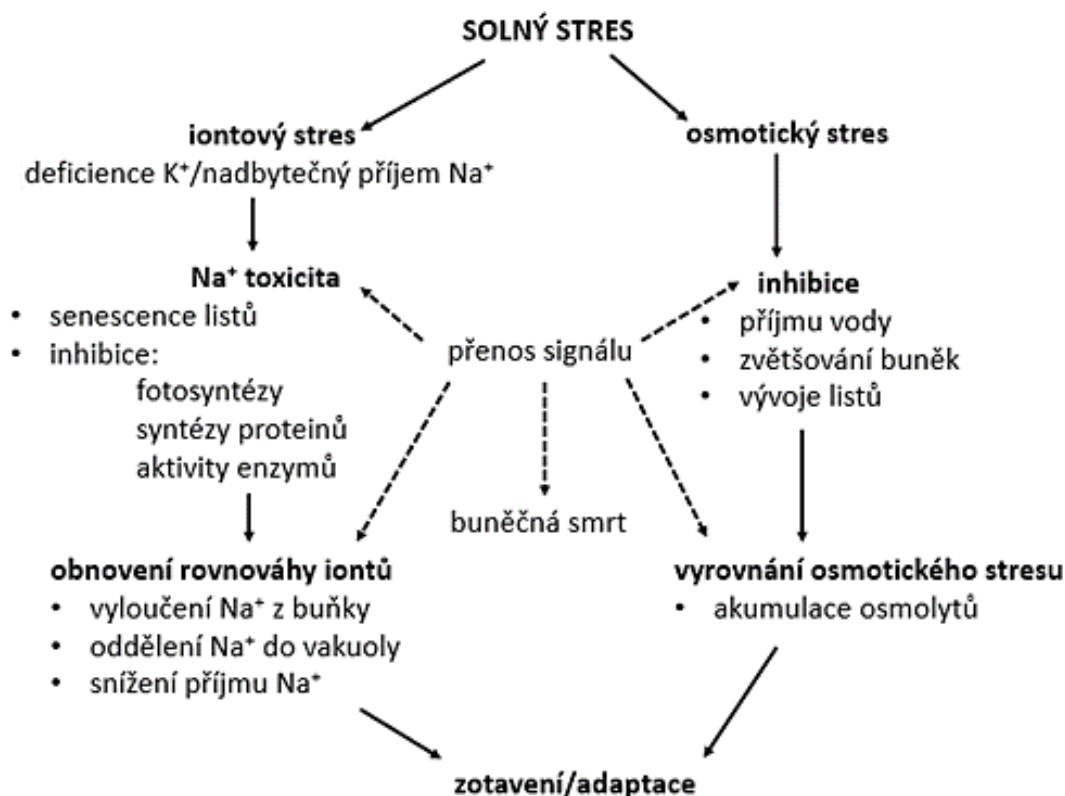
Zasolení půd je rostoucí problém po celém světě a představuje hlavní omezení zemědělské produkce. Odhaduje se, že více než 20 % zemědělské půdy je zasaženo solným stresem a tento podíl stále roste. V roce 2050 by solný stres měl postihovat

až 50 % zemědělské půdy. Závažnost tohoto problému je zřejmá vzhledem k rostoucí lidské populaci a s ní související potřebou zvýšení zemědělského výnosu (FAO, 2009; Ladeiro, 2012; Jing *et al.*, 2018).

Rostliny mohou být klasifikovány do dvou kategorií podle tolerance solného stresu: 1) halofilní rostliny neboli halofyty, které prosperují na zasolených půdách a 2) glykofyty citlivé na solný stres. Většina potravinářských plodin však patří do druhé kategorie (Flowers, 2004; Munns a Tester, 2008). Halofyty tvoří asi 1 % světové flóry a jedná se o rostliny, které přežívají a rozmnožují se v oblastech, kde koncentrace NaCl v půdě je přibližně $200 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ nebo větší. Pouze některé z nich však vykazují optimum růstu v solných podmínkách (Flowers a Colmer, 2008).

2.3.1 Reakce rostlin na solný stres

Solný stres působí na rostliny dvěma svými složkami: osmotickým a iontovým stresem (Obr. 7). V průběhu počátečních fází solného stresu dojde ke ztrátě vody. To je jednak způsobeno snížením absorpční kapacity kořenového systému pro vodu, a jednak zrychleným výparem z listů v důsledku zvýšené akumulace soli v půdě a v rostlině. Solný stres je tak považován zároveň za hyperosmotický stres. Za normálních podmínek je koncentrace rozpuštěných látek uvnitř buněk kořene vyšší než ve vnějším prostředí, čímž je umožněn příjem vody do těchto buněk v procesu osmosy. Při solném stresu je však tato rovnováha porušena, voda uniká z buněk do vnějšího prostředí a dochází ke zmenšení jejich objemu, což se projevuje také celkovým ochabnutím rostliny (Munns, 2005; Shavrukov, 2013).



Obr. 7: Znázornění vlivu jednotlivých složek solného stresu na buněčné procesy a mechanismy, které buňka využívá v reakci na tento stres pro zotavení nebo adaptaci. Upraveno dle de Oliveira *et al.*, 2013.

Iontový stres je způsobený akumulací Na⁺ v rostlinných orgánech. Vzhledem k chemické podobnosti Na⁺ s K⁺, spočívá část jeho toxicity v určité interferenci s transportem a cytoplasmatickými funkcemi K⁺ (Carden *et al.*, 2003; Gollmack *et al.*, 2003; Peng *et al.*, 2004). Draselný iont je esenciální prvek nezbytný pro mnohé rostlinné procesy, z nich může být jmenováno např. dělení buněk, aktivace enzymů, transport látek floémem, deficience K⁺ také snižuje aktivitu fotosyntetického aparátu (Deeken *et al.*, 2002; Volkov a Amtmann, 2006; Maathuis, 2009).

Vysoká koncentrace Na⁺ v půdě inhibuje příjem K⁺ z vnějšího prostředí do cytoplasmy a zvyšuje jeho výdej. Vysoký poměr K⁺ k Na⁺ v cytoplasmě je určující determinantou tolerance rostlin na solný stres. Mechanismy tolerance rostlin na solný stres směřují právě k ustanovení tohoto vysokého poměru (Davenport a Tester, 2000; Shabala, 2000; Chen *et al.*, 2007).

Mnohá poškození buněčných struktur při solném stresu jsou způsobena následným oxidativním stresem vyvolaným účinkem reaktivních forem kyslíku (ROS, reactive

oxygen species) produkovaných v buňkách právě v reakci na solný stres (Krishnamurthy a Rathinasabapathi, 2013).

Obranné mechanismy rostliny proti iontovému stresu zahrnují strategie vedoucí ke snížení obsahu Na^+ v cytoplasmě. Osmotickému stresu je zabráněno produkcí osmoticky aktivních látek (osmolytů) a ROS jsou odstraňovány pomocí antioxidantních enzymů (Gupta a Huang, 2014).

2.3.1.1 Obrana proti iontovému stresu a SOS signální dráha

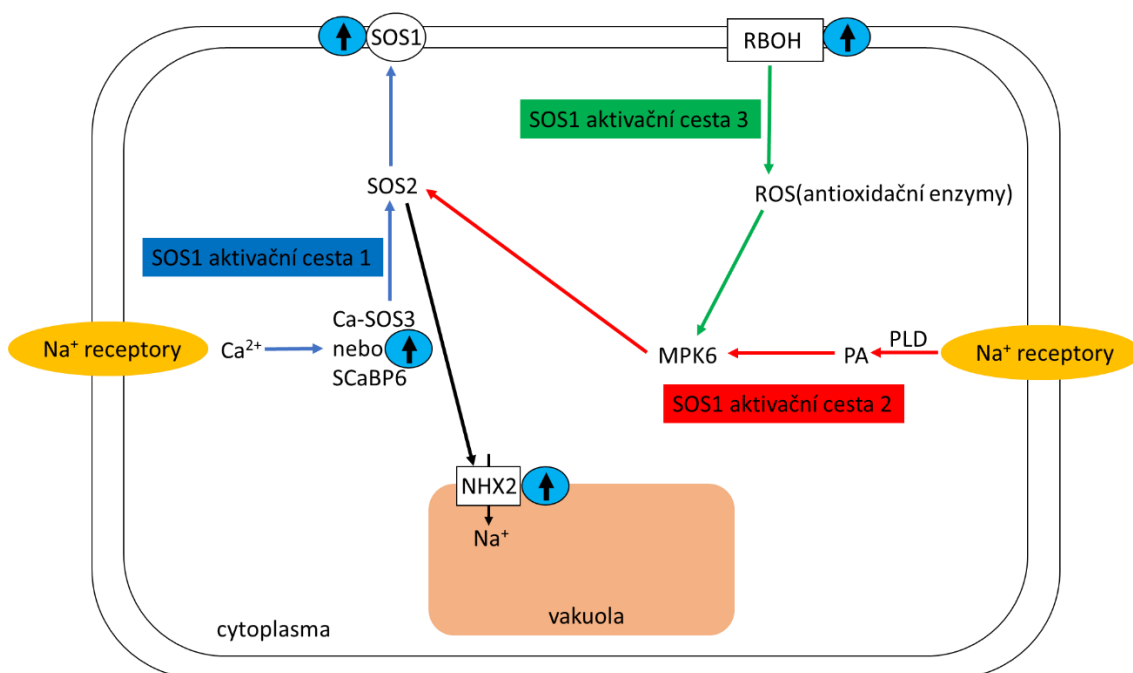
Za podmínek normální koncentrace Na^+ v půdě je tento iont přijímán do buňky mnoha nezávislými Na^+ transportery z HKT rodiny (vysoce afinitní draslíkový transporter, high-affinity potassium transporter), které se dělí na dvě třídy, z nichž jedna zajišťuje uniport Na^+ , zatímco druhá Na^+/K^+ symport (Horie *et al.*, 2009; Yao *et al.*, 2010). Při zvýšené koncentraci proniká Na^+ do buněk pomocí neselektivního kationtového kanálu (NSCC, non-selective cation channel) lokalizovaného na plasmatické membráně (Davenport a Tester, 2000; Demidchik a Tester, 2002).

Mechanismus příjmu K^+ závisí na jeho koncentraci v půdě. Při nízké koncentraci využívá buňka vysoce afinitní aktivní příjem zprostředkovaný transportery z HKT rodiny (Schachtman a Schroeder, 1994). V případě vysokých koncentrací K^+ je jeho příjem do buňky nízkoafinitní a pasivní pomocí PKB transporterů (protein kinasa B) (Lagarde *et al.*, 1996). Při solném stresu tak soutěží Na^+ s K^+ o transporter (Sairam a Tyagi, 2004; Munns a Tester, 2008).

Existují tři mechanismy sloužící k ochraně buňky před vysokou cytoplasmatickou koncentrací Na^+ : omezení příjmu Na^+ do buněk, oddělení Na^+ do vakuoly a zvýšení výdeje Na^+ z buňky do okolního prostředí. V posledních dvou jmenovaných mechanismech je zapojena SOS (salt overly sensitive) signální dráha, k jejíž aktivaci dojde při zvýšení intracelulární hladiny Ca^{2+} po percepci zvýšeného obsahu Na^+ (Obr. 8) (Guo *et al.*, 2004; Chinnusamy *et al.*, 2005). Zvýšení cytoplasmatické koncentrace Ca^{2+} je registrováno jedním ze tří členů SOS signální dráhy – Ca^{2+} vazebným proteinem s myristoylovou skupinou, označovaným jako SOS3. Tento protein po vazbě Ca^{2+} aktivuje SOS2, což je serin/threonin protein kinasa (Halfter *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2000). SOS3 aktivuje SOS2 především v kořenech. V nadzemní části rostliny je SOS2 aktivován proteinem zvaným SCaBP8 (SOS2-like calcium binding protein 8) (Quan *et al.*, 2007). Interakce SOS3-SOS2 nebo SCaBP8-SOS2 vede k asociaci SOS2 s plasmatickou membránou, následkem čehož dojde k fosforylaci a aktivaci SOS1 lokalizovaného na této

membráně, který funguje jako Na^+/K^+ -antiporter a vylučuje Na^+ z cytoplasmy (Huertas *et al.*, 2012).

Alternativně byla popsána schopnost komplexu SCaBP8-SOS2 aktivovat Na^+/H^+ -antiportery označované jako NHX (Na^+/H^+ exchanger) na tonoplastu. Tyto zajišťují transport Na^+ z cytoplasmy do vakuoly (Quintero *et al.*, 2011; Quan *et al.*, 2007; Huertas *et al.*, 2012). Elektrochemický gradient pro NHX je generován vakuolárními H^+ -ATPasami a H^+ -PPasami (protony pumpujícími pyrofosfatasami). Rodinu NHX tvoří u *Arabidopsis* šest členů, které lze rozdělit na dvě třídy: NHX1-4 (lokalizované na tonoplastu) a NHX5-6 (na membráně endosomů). Transkripce těchto transporterů je zvýšena při akumulaci kyseliny abscisové (ABA) nebo osmotickém stresu (Blumwald, 2000; Yokoi *et al.*, 2002). Solný stres může zvýšit akumulaci ABA (Park *et al.*, 2008). Exprese vakuolární H^+ -ATPasy je také zvýšena při solném stresu, čímž je zajištěn dostatečný protonový gradient pro transport Na^+ do vakuoly (Dietz *et al.*, 2001).



Obr. 8: Model znázorňující tři možné cesty aktivace SOS1 (Na^+/H^+ -antiporteru, klíčového pro vyloučení přebytečného Na^+ z buňky při solném stresu). První cesta (znázorněna modrými šipkami) je založena na percepci nadbytečného Na^+ v půdě, zvýšení obsahu cytoplasmatického Ca^{2+} , aktivaci SOS3 nebo SCaBP6 vazbou Ca^{2+} , aktivaci SOS2 pomocí SOS3/SCaBP6 a aktivaci SOS1 fosforylací komplexem SOS3-SOS2 nebo komplexem SCaBP8-SOS2. Komplex SCaBP8-SOS2 alternativně aktivuje NHX na tonoplastu. Druhá cesta aktivace SOS1 (znázorněna červenými šipkami) vede přes fosfolipasu D, která aktivuje MPK6, což vede k aktivaci SOS2 a následně SOS1. Třetí cesta (znázorněna zelenými šipkami) ukazuje aktivaci SOS1 přes membránovou NADPH oxidasu RBOH. Černé šipky, zvýšená exprese genu při solném stresu; RBOH, respiratory burst oxidase homologs; SOS, salt overly sensitive; SCaBP8, SOS3-like calcium binding protein8; MPK6, mitogen-activated protein kinase 6; PA, kyselina fosfatidová; PLD, fosfolipasa D. Upraveno dle Shah *et al.*, 2017 a Ji *et al.*, 2013.

SOS1 je schopen vylučovat Na^+ z cytoplasmy do okolního prostředí nebo z parenchymatických buněk do cévních tkání a zachovává tak nízké hladiny Na^+ v cytoplasmě (Shi *et al.*, 2002a). Zdá se však, že aktivita SOS1 nezávisí zcela na aktivaci pomocí SOS2 (Shabala *et al.*, 2005). SOS1 je totiž také cílem fosfolipasy D (PLD) (Yu *et al.*, 2010). Solný stres aktivuje PLD α 1, což vede k rapidní akumulaci produktu její hydrolyzy a sekundárního poslu, kyseliny fosfatidové (PA). PA aktivuje MPK6 (mitogen-activated protein kinase 6) a ta přímo fosforyluje SOS1 (Obr. 8) (Yu *et al.*, 2010). NADPH oxidasa RBOH (respiratory burst oxidase homolog) na plasmatické membráně, jejíž funkcí je produkce ROS, má také schopnost aktivovat SOS1 (Kurusu *et al.*, 2015).

SOS signální dráha je zapojena také v několika dalších procesech spojených s tolerancí k solnému stresu. Tak například SOS3 mění architekturu kořenového systému, což se projevuje snížením počtu kořenových vlásků, postranních kořenů a poruchou elongace primárního kořene (Wang a Li, 2008; Wang *et al.*, 2009; Zolla *et al.*, 2010). SOS3 dále v reakci na solný stres zvyšuje biosyntézu auxinu a způsobuje reorganizaci aktinového cytoskeletu (Zhao *et al.*, 2011; Ye *et al.*, 2013).

2.3.1.2 Obrana proti osmotickému stresu produkcí osmolytů

Osmolyty jsou různorodé organické látky, nenabitě, polární, rozpustné a neinterferující s buněčným metabolismem ani za vysokých koncentrací v cytoplasmě. Patří mezi ně např. prolin, glycin betain, cukry a polyoly. Akumulací v cytosolu při solném stresu snižují osmotický potenciál a zachovávají příjem vody z prostředí zasolení půdy (Zhu *et al.*, 1997; Hasegawa *et al.*, 2000). Ve vnímání a přenosu signálu o osmotickém stresu, stejně jako v následné produkci osmolytů, je zapojena MAPK signální dráha (de Nadal *et al.*, 2002).

2.3.1.3 Úloha ROS a antioxidačních enzymů v solném stresu

Za normálních podmínek je hladina reaktivních forem kyslíku (ROS) v buňkách nízká. Avšak při solném nebo jiném abiotickém stresu, dochází k jejímu rapidnímu zvýšení, a to především díky aktivitě různých oxidas přítomných na plasmatické membráně, z nichž je nejvíce prostudovaná NADPH oxidasa známá také pod názvem RBOH (Apel a Hirt, 2004; Xie *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2012). Mezi reaktivní formy kyslíku patří jak volné radikály (superoxidový O_2^- , hydroxylový $\text{OH}\cdot$, perhydroxylový $\text{HO}_2\cdot$, alkoxylový $\text{RO}\cdot$), tak neradikálové molekuly (H_2O_2 a O_2). Rostliny obsahují mnoho enzymů,

např. superoxid-dismutasa (SOD, superoxid:superoxid oxidoreduktasa, EC 1.15.1.1), katalasa (KAT, peroxid vodíku:peroxid vodíku oxidoreduktasa, EC 1.11.1.6), askorbátperoxidasa (APX, L-askorbát:peroxid vodíku oxidoreduktasa EC 1.11.1.11), glutathionperoxidasa (GPX, glutathion:peroxid vodíku oxidoreduktasa, EC 1.11.1.9), glutathionreduktasa (GR, NADPH:glutathion reduktasa, EC 1.8.1.7) a neenzymatických molekul (askorbát, glutathion, fenolické látky, alkaloidy, tokoferol, neproteinogenní aminokyseliny), s jejichž pomocí odstraňují ROS. K oxidativnímu stresu dochází v okamžiku porušení schopnosti antioxidačních látek odstraňovat příliš velké množství ROS, které se pak stávají toxické pro proteiny, lipidy a nukleové kyseliny (Gill a Tuteja, 2010). Na druhou stranu zvýšené množství ROS při abiotickém stresu slouží jako signál pro aktivaci odpovědi buňky na stresové podmínky (Baxter *et al.*, 2014). Přesný mechanismus percepce a transdukce signálu ROS v buňce však není zcela znám (You a Chan, 2015).

První linii obrany proti ROS představují superoxid-dismutasy katalyzující rozpad superoxidu na O_2 a H_2O_2 (Alscher *et al.*, 2002). Tyto enzymy, přítomné u všech aerobních organismů, jsou považovány za nejefektivnější antioxidační enzymy (Gill a Tuteja, 2010). Podle kovového kofaktoru, mohou být SOD rozděleny do tří kategorií: FeSOD (lokalizována v chloroplastech), MnSOD (v mitochondriích a peroxisomech) a Cu/ZnSOD (v chloroplastech, cytoplasmě a pravděpodobně v extracelulárním prostoru) (Kanematsu a Asada, 1990; Smith a Doolittle, 1992).

Další z antioxidačních enzymů, katalasa, katalyzuje přeměnu H_2O_2 na H_2O a O_2 . Nachází se téměř ve všech živých organismech a u *Arabidopsis* byly objeveny tři isoenzymy: KAT1, KAT2, KAT3 (Frugoli *et al.*, 1996; Garg s Manchanda, 2009).

2.3.1.4 Úloha endocytosy a Rab GTPas v solném stresu

Z důležitosti endocytosy pro mnohé buněčné funkce lze usuzovat také na její zapojení v reakci na stresové podmínky. Solný stres u kořenů *Arabidopsis* stimuluje endocytosu (Leshem *et al.*, 2007). Tato stimulace může sloužit mnoha funkcím. Předně díky ní dochází k internalizaci některých membránových proteinů zapojených ve zvyšování tolerance a v signalizaci solného stresu. Internalizace sodného transporteru z plasmatické membrány a jeho následná degradace ve vakuole, tak může sloužit ke snížení příjmu Na^+ z půdy (Baral *et al.*, 2015). Také při zmenšení povrchu plasmatické membrány při plazmolýze v hypertonickém prostředí mohou buňky uplatňovat mechanismus endocytosy. V tomto případě vzniklé vesikuly pravděpodobně zůstávají v cytoplasmě

a při deplazmolýze naopak dochází k jejich exocytose (Oparka *et al.*, 1990; Assani *et al.*, 2009; Baral *et al.*, 2015). Zvýšená endocytosa aquaporinů v reakci na solný stres může hrát roli při prevenci ztrátě vody (Luu *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013). Další z mechanismů zahrnuje rychlou endocytosu NADPH oxidasy z plasmatické membrány sloužící k tvorbě signálních molekul ROS ve vzniklých vesikulech, čímž je zajištěna intracelulární tvorba ROS důležitá pro signalizaci solného stresu (Hao *et al.*, 2014).

První Rab GTPasa, u níž bylo prokázáno zapojení v toleranci na solný stres, byla RabG3e (homolog savčí Rab7 třídy). RabG3e se nachází na MVB a řídí transport do vakuoly. Zvýšená hladina RabG3e urychluje endocytosu, a navíc vede k větší toleranci na stres (Mazel *et al.*, 2004). Také u jiných druhů rostlin, např. u rýže a halofytu *Prosopis juliflora*, souvisí zvýšená hladina Rab7 se zvýšenou odolností na solný stres (George a Parida, 2011; Peng *et al.*, 2014).

Dominantně negativní RabA1, řídící transport z TGN na plasmatickou membránu, vykazuje extrémně zvýšenou citlivost na solný stres, což naznačuje, že biosyntetická cesta, transport z TGN na plasmatickou membránu hraje také roli v toleranci na solný stres. Za normálních podmínek dominantně negativní DN RabA1 nevykazuje žádné defekty v endocytose (Asaoka *et al.*, 2013).

Rab11, člen třídy Rab-A1 a paralog RabA, je u rýže zapojen v transportu z TGN na plasmatickou membránu nebo do vakuoly a po tomto transportu následuje jeho hydrolýza pomocí GAP1 (Heo *et al.*, 2005). Rab11 reguluje vesikulární transport H⁺-ATPasy s názvem VHA-a1 na MVB při solném stresu. H⁺-ATPasy udržují nízké pH ve vakuolách a endosomech (Hurtado-Lorenzo *et al.*, 2006). Při solném stresu byly pozorovány změny aktivity H⁺-ATPas (Tsiantis *et al.*, 1996; Dietz *et al.*, 2001). U *Arabidopsis* H⁺-ATPasy VHA-B1 a B2 interagují přímo se SOS2, což naznačuje, že jsou zapojeny v reakci na solný stres (Batelli *et al.*, 2007). Dominantně negativní Rab11 linie u rýže vykazují extrémní citlivost na NaCl. Rab11 zde hraje důležitou roli v toleranci na solný stres, zajištěním transportu VHA-a1 na MVB nebo do vakuoly. Gradient H⁺ generovaný těmito ATPasami pak může být využit pro tonoplastový Na⁺/H⁺-antiporter z rodiny NHX transportující nadbytečné Na⁺ do vakuoly (Asaoka *et al.*, 2013).

Další Rab GTPasa studovaná v souvislosti se solným stresem je Ara6. Knock-outované linie Ara6 vykazují lehce zvýšenou senzitivitu na solný stres, ale konstitutivně aktivní Ara6 jsou naopak tolerantnější oproti divému typu. Zvýšená koncentrace soli způsobuje relokizaci konstitutivně aktivní Ara6 na plasmatickou membránu, což

poukazuje na funkci tohoto proteinu v solném stresu (Ebine *et al.*, 2011). Při solném stresu dochází ke zvětšení membránových oddělení, která obsahují Ara6 (Zwiewka *et al.*, 2015). Rostliny s funkčně poškozeným GEF pro Rab5 (VPS9a) vykazují extrémně zvýšenou senzitivitu na solný stres (Baral *et al.*, 2015). U *Mesembryanthemum crystallinum* byl nalezen Ara6 homolog, jehož gen byl identifikován jako responsivní na vysokou koncentraci soli (Bolte *et al.*, 2000). U rýže vedl solný stres k sekreci Ara6 do apoplastu (Zhang *et al.*, 2009). Bylo také zjištěno, že konstitutivně aktivní Ara6 zvyšuje odolnost na vysokou hladinu sorbitolu, což naznačuje úlohu Ara6 nejenom v odpovědi na solný stres, ale na abiotický stres obecně (Ebine *et al.*, 2012).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 MATERIÁL

3.1.1 Biologický materiál

- Rostliny *Arabidopsis thaliana* ekotyp Columbia (Col-0).
- Stabilně transformované rostliny *Arabidopsis thaliana* exprimující dominantně negativní Ara7 (DN Ara7^{S24N})-GFP pod kontrolou tamoxifenem indukovatelného promotoru RPS5A, připraveny záměnou aminokyseliny serinu (S) za asparagin (N) v pozici 24 od N-konce (Dhonukshe *et al.*, 2006). V dalším textu bude tato linie označována jako linie DN Ara7^{S24N}.
- Rostliny *Arabidopsis thaliana* s expresí konstitutivně aktivní Ara7 (CA Ara7^{Q69L}), připraveny záměnou aminokyseliny glutaminu (Q) za leucin (L) v pozici 69 od N-konce (Goh *et al.*, 2007). V dalším textu bude tato linie označována jako linie CA Ara7^{Q69L}.

3.1.2 Chemikálie

- 2-propanol, Sigma-Aldrich (USA)
- 30% Acrylamide/Bis Solution, 37.5:1, Bio-Rad (USA)
- 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazin ethansulfonová kyselina (HEPES), Duchefa Biochemie (Nizozemí)
- 4x Laemmli Sample Buffer, Bio-Rad (USA)
- aceton, Sigma-Aldrich (USA)
- akrylamid, Sigma-Aldrich (USA)
- Bis-Tris, Sigma-Aldrich (USA)
- Complete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche (Švýcarsko)
- činidlo Bradford, Sigma-Aldrich (USA)
- dithiothreitol (DTT), Sigma-Aldrich (USA)
- dodecylsírán sodný (SDS), Sigma-Aldrich (USA)
- ECL Clarity Western Substrate, Bio-Rad (USA)
- ethanol 96%, lihovar Kojetín (Česká republika)
- ethylenglykoltetraoctová kyselina (EGTA), Sigma-Aldrich (USA)
- fluorid sodný (NaF), Sigma-Aldrich (USA)

- glycerol, Sigma-Aldrich (USA)
- glycin, Sigma-Aldrich (USA)
- heptahydrát síranu železnatého ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), Sigma-Aldrich (USA)
- hexakynoželezitan draselný ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), Sigma-Aldrich (USA)
- hovězí sérový albumin, Sigma-Aldrich (USA)
- chlorid draselný (KCl), Sigma-Aldrich (USA)
- chlorid hořečnatý (MgCl_2), Sigma-Aldrich (USA)
- chlorid sodný (NaCl), Sigma-Aldrich (USA)
- chlorid železitý FeCl_3 , Sigma-Aldrich (USA)
- kyselina askorbová, Sigma-Aldrich (USA)
- kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA), Sigma-Aldrich (USA)
- kyselina chlorovodíková (HCl), Sigma-Aldrich (USA)
- kyselina sírová (H_2SO_4), Sigma-Aldrich (USA)
- kyselina thiobarbiturová (TBA), Sigma-Aldrich (USA)
- kyselina trichloroctová (TCA), Sigma-Aldrich (USA)
- methanol, Sigma-Aldrich (USA)
- mořský písek
- MS (Murashige a Skoog) médium, Duchefa Biochemie (Nizozemí)
- nitroblue tetrazolium chlorid (NBT), Sigma-Aldrich (USA)
- odtučněné mléko, Laktino (Česká republika)
- persíran amonný ($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, APS), Sigma-Aldrich, (USA)
- phytigel, Sigma-Aldrich (USA)
- Ponceau S, Sigma-Aldrich (USA)
- Precision Plus Protein Dual Color Standards, Bio-Rad (USA)
- riboflavin, Applichem (USA)
- sacharosa, Sigma-Aldrich (USA)
- síran amonný ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), Sigma-Aldrich (USA)
- sorbitol, Duchefa Biochemie (Nizozemí)
- tamoxifen, Sigma-Aldrich (USA)
- tekutý dusík
- tetramethylethylendiamin (TEMED), Sigma-Aldrich (USA)
- TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Solutions, Bio-Rad (USA)
- Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethan), Sigma-Aldrich (USA)
- Tris-HCl (tris(hydroxymethyl)aminomethan hydrochlorid), Sigma-Aldrich (USA)

- Tween 20, Sigma-Aldrich (USA)
- xylénová oranž, Sigma-Aldrich (USA)
- β -merkaptóethanol, Sigma-Aldrich (USA)

3.1.3 Protilátky použité při imunoblotování

- primární polyklonální protilátka rabbit anti-FeSOD, Agrisera (Švédsko)
 - ředění 1:3000
- primární polyklonální protilátka rabbit anti-katalasa, Agrisera (Švédsko)
 - ředění 1:2000
- sekundární protilátka konjugovaná s křenovou peroxidasou goat anti-rabbit IgG-HPR, ThermoFisher Scientific (USA)
 - ředění 1:5000

3.1.4 Složení roztoků a médií

½ MS médium (Murashige a Skoog, 1962)

- sacharosa (10,01 g·l⁻¹)
- MS (2,15 g·l⁻¹)
- phytigel (8 g·l⁻¹)
- pH = 5,8 (úprava pomocí KOH)

12% dělicí gel (pro SDS PAGE), celkové množství 5 ml

- 2,175 ml destilované vody
- 1,25 ml Tris-HCl (1,5 mol·l⁻¹, pH = 8,8)
- 1,5 ml 40% Acrylamide/Bis Solution 37.5:1 (Bio-Rad)
- 50 μ l 10% SDS
- 2,5 μ l TEMED
- 25 μ l 10% APS

4% zaostřovací gel (pro SDS PAGE), celkové množství 2,5 ml

- 1,59 ml destilované vody
- 0,63 ml Tris-HCl (0,5 mol·l⁻¹, pH = 6,8)
- 0,25 ml 40% Acrylamide/Bis Solution 37.5:1 (Bio-Rad)
- 15 μ l 10% SDS
- 2,5 μ l TEMED
- 12,5 μ l 10% APS

12% dělicí gel (pro nativní elektroforezu), celkové množství 5 ml

- 2,173 ml destilované vody
- 1,25 ml Bis-Tris-HCl ($1,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, pH = 8,8)
- 1,5 ml 40% Acrylamide/Bis Solution 37.5:1 (Bio-Rad)
- 2,5 μl TEMED
- 25 μl 10% APS

4% dělicí gel (pro nativní elektroforezu), celkové množství 2,5 ml

- 793 μl destilované vody
- 312,5 μl Bis-Tris-HCl ($0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, pH = 6,8)
- 125 μl 40% Acrylamide/Bis Solution 37.5:1 (Bio-Rad)
- 1,25 μl TEMED
- 6,25 μl 10% APS

Extrakční pufr

- HEPES ($50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), pH = 7,5 (úprava pomocí HCl)
- NaCl ($75 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$)
- EGTA ($1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$)
- glycerol (10% v/v)
- MgCl_2 ($1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$)
- NaF ($1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$)

Na-fosfátový pufr, pH = 7,8; $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$)

- pH 0,2 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (70ml) bylo upraveno na pH 7,8 pomocí 0,2 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, a objem byl doplněn na 100 ml destilovanou vodou, pufr byl naředěn na koncentraci $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (1:3)

Tris-glycin-SDS pufr (elektroforetický pufr)

- 0,1% SDS (w/v)
- 0,3% Tris (w/v)
- 1,44% glycin (w/v)

TBS-T pufr

- 0,242% Tris (w/v)
- 0,878% NaCl (w/v)
- 0,001% Tween (v/v)
- pH = 7,4

Tris-glycin pufr (přenosový pufr)

- 0,3% Tris (w/v)
- 1,44% glycin (w/v)
- 10% methanol (v/v)

Ponceau S

- 0,1% (w/v) Ponceau S v 5% (v/v) kyselině octové

Blokovací roztok

- 5% (w/v) BSA v TBS-T
- 5% (w/v) sušené odtučněné mléko v TBS-T

3.1.5 Přístroje

- analytické váhy XA110/2X, Radwag (Polsko)
- binokulární mikroskop M165FC, LEICA (Německo)
- centrifuga Allegra 64R, Beckman Coulter (USA)
- digestoř, Merci (Česká republika)
- dokumentační zařízení pro dokumentaci gelů a blotů Chemidoc, Bio-Rad (USA)
- fotoaparát, Nikon (Japonsko)
- fytotron, WEISS Gallenkamp (Německo)
- laboratorní předvážky, BEL (Itálie)
- laminární box, Biohazard (Itálie)
- míchačka elektromagnetická, Boeco (Německo)
- mikrocentrifuga s vortexem, Biosan (Lotyšsko)
- mikrovlnná trouba, Hitachi (Japonsko)
- pH metr, Eutech Instruments (Singapur)
- skener Image Scanner III, GE Healthcare (Švédsko)
- spektrofotometr, Beckman Coulter (USA)
- termoblok, Bioer Technology (Čína)
- třepačka výkyvná, Biosan (Lotyšsko)
- třepačka, Hofer Scientific Instruments (San Francisco)
- vortex, Genie (Nizozemí)
- zdroj napětí, Bio-Rad (USA)

3.1.6 Programy a databáze

- ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>)
- ImageLab (Bio-Rad)
- MS Excel
- MS Powerpoint
- NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)
- TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>)

3.2 METODY

3.2.1 Sterilizace semen

Sterilizace semen probíhala v laminárním boxu. Semena v mikrozkuhavce byla nejprve protřepávána v 1 ml 70% ethanolu po dobu 5 minut. Po usazení semen na dně mikrozkuhavky a odebrání 70% ethanolu byl k semenům přidán 1 ml 96% ethanolu a následovalo protřepávání po dobu 3 minut. Po usazení semen na dně mikrozkuhavky byl 96% ethanol nahrazen 1 ml destilované vody a protřepávání semen bylo takto provedeno 5x (vždy s novým podílem destilované vody) po dobu 1 minuty. Při posledním kroku byla semena i s 1 ml destilované vody nabrána do špičky pipety a přenesena na sterilní filtrační papír, kde byla ponechána k vysušení.

3.2.2 Příprava kultivačního média a sázení semen

Jako kultivační médium bylo používáno ½ MS médium (Murashige a Skoog médium v poloviční koncentraci) (Murashige a Skoog, 1962). Po rozpuštění 10,01 g sacharosy a 2,15 g MS v destilované vodě bylo upraveno pH na hodnotu 5,8 pomocí KOH. Roztok byl poté doplněn na objem 1 litru a rozlit do lahví po 250 ml. Ke každým 250 ml roztoku byly přidány 2 g phytagelu, který zajišťuje ztuhnutí média. Následovala sterilizace média autoklávováním.

V laminárním boxu byla sterilní média rozlévána do Petriho misek. Sázení bylo uskutečněno přenosem sterilních semen pomocí sterilního párátko na povrch ztuhlého média. Následovalo umístění Petriho misek s vysázenými semeny na 4°C po dobu 1-2 dnů pro zajištění stratifikace a poté jejich vyložení do fytotronu.

Způsoby kultivace semen ve fytostronu se liší pro jednotlivé experimenty a budou popsány v následujícím textu. Podmínky ve fytostronu byly pro všechny experimenty totožné: 22 °C, 71% vlhkost vzduchu, osvětlení 16 h a tma 8 h.

3.2.3 **Evaluace fenotypu kořenů rostlin s modifikovanou Ara7 na toleranci vůči NaCl a KCl**

Pro zkoumání role Ara7 v odolnosti na solný stres byla semena rostlin *Arabidopsis thaliana* Col-0, linie DN Ara7^{S24N} a linie CA Ara7^{Q69L} vysázena na ½ MS médium v Petriho misce. Po inkubaci vysázených semen při 4 °C byla tato semena umístěna na 5 dnů do fytostronu, Petriho misky se semeny byly vyloženy do vertikální polohy.

Pátý den po vyložení semen byly rostliny přeneseny na nová média. Přenos probíhal sterilně v laminárním boxu za použití sterilní pinzety. Rostliny *Arabidopsis* linie DN Ara7^{S24N} byly přeneseny na ½ MS média obsahující tamoxifen v 0,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ nebo odpovídající množství 96% ethanolu. Ethanol byl použit jako kontrola, roztok tamoxifenu aplikovaný do ½ MS média byl připraven rozpuštěním tamoxifenu v 96% ethanolu. Rostliny vystavené ethanolu budou v práci dále označovány jako ethanolová kontrola. Roztoky tamoxifenu i ethanolu byly sterilizovány filtrací přes injekční sterilizační filtr a přidány do rozehřátého sterilního ½ MS média před jeho rozlitím do Petriho misek.

Rostliny *Arabidopsis* Col-0 a rostliny *Arabidopsis* linie CA Ara7^{Q69L} byly přeneseny na nové ½ MS médium pro zajištění odpovídajícího mechanického stresu při přenášení jako v případě rostlin *Arabidopsis* DN Ara7^{S24N}. Přenesené rostliny byly následně znovu umístěny do fytostronu na dva dny ve vertikální poloze, poté skenovány a pozorovány pod stereomikroskopem, obrázky byly použity pro analýzu fenotypu kořenů rostlin s modifikovanou Ara7 s využitím programu ImageJ.

Naskenované obrázky sloužily ke stanovení délek primárních kořenů (měřeno 15 rostlin *Arabidopsis* Col-0, 15 rostlin *Arabidopsis* linie CA Ara7^{Q69L}, 30 rostlin linie DN Ara7^{S24N} po indukci tamoxifenem a 30 rostlin linie DN Ara7^{S24N} ethanolové kontroly) a počtu a délek postranních kořenů (měřeno 10 rostlin ode všech čtyř uvedených kombinací). Snímky ze stereomikroskopu byly použity pro stanovení počtu a délek kořenových vlásků (měřeno 10 rostlin ode všech čtyř uvedených kombinací), vždy v úseku kořene o délce 5 mm od kořenové špičky.

Následně byly rostliny přeneseny na ½ MS médium, které obsahovalo následující koncentrace NaCl a KCl: 50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl, 100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl, 150 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl,

50 mmol·l⁻¹ KCl, 100 mmol·l⁻¹ KCl, 150 mmol·l⁻¹ KCl nebo na ½ MS médium neobsahující žádnou sůl. Na každou Petriho misku s jinou koncentrací soli v médiu bylo přeneseno po 10 rostlinách Arabidopsis linie DN Ara7^{S24N} (po indukci tamoxifenem a ethanolové kontroly) a 5 rostlinách Arabidopsis Col-0 a Arabidopsis linie CA Ara7^{Q69L}. Rostliny byly znovu umístěny do fytotronu ve vertikální poloze a skenovány po dobu 5 dnů od přenesení. Délky primárních a postranních kořenů byly měřeny v programu ImageJ. K vyhodnocení naměřených dat sloužil program Excel. Data byla statisticky vyhodnocena pomocí One way Anova testu na hladině významnosti $p \leq 0,05$. Tento experiment byl proveden ve třech biologických replikách.

3.2.4 Test odolnosti linií s modifikovanou Ara7 na různé koncentrace NaCl a KCl

Pro studium obsahu chlorofylu, jako markeru odolnosti na solný stres, u rostlin s modifikovanou Ara7, byla vysázena semena Arabidopsis Col-0 a semena transgenních linií Arabidopsis tvořících dominantně negativní DN Ara7^{S24N} a konstitutivně aktivní CA Ara7^{Q69L} na ½ MS médium v Petriho misce. Další manipulace s rostlinami probíhala způsobem popsaným v předchozí kapitole, lišil se až poslední přenos na solná média.

Rostliny byly přenášeny na solná média o následujících koncentracích NaCl a KCl: 50 mmol·l⁻¹ NaCl, 100 mmol·l⁻¹ NaCl, 150 mmol·l⁻¹ NaCl, 50 mmol·l⁻¹ KCl, 100 mmol·l⁻¹ KCl a 150 mmol·l⁻¹ KCl. Na média obsahující uvedené koncentrace solí v jednotlivých Petriho miskách bylo vždy umístěno 30 rostlin Arabidopsis Col-0, 30 rostlin Arabidopsis linie DN Ara7^{S24N} (po indukci tamoxifenem a ethanolové kontroly) a 30 rostlin Arabidopsis linie CA Ara7^{Q69L}. Pro kontrolu bylo 30 rostlin Arabidopsis Col-0 společně se 30 rostlinami CA Ara7^{Q69L} nebo DN Ara7^{S24N} přeneseno také na ½ MS médium neobsahující žádnou sůl. Rostliny byly poté umístěny do fytotronu a kultivovány ve vertikální poloze. Po 5 a 8 dnech proběhlo fotografování rostlin. Experiment byl proveden ve dvou biologických replikách.

3.2.5 Měření obsahu chlorofylu

Rostliny Arabidopsis Col-0, Arabidopsis linie Ara7 DN Ara7^{S24N} a rostliny Arabidopsis linie CA Ara7^{Q69L} 15denního stáří, jejichž podmínky kultivace byly popsány v předchozí kapitole, byly následně použity na měření obsahu chlorofylu. Nadzemní část těchto rostlin byla odřezána, zvážena a poté homogenizována ve třetí misce

se 2 ml 100% acetonu a za přítomnosti mořského písku. Homogenát byl centrifugován (1500 g, 3 min, 4 °C). Po odebrání supernatantu byla měřena jeho absorbance na spektrofotometru současně při dvou vlnových délkách: 665 nm a 649 nm. Pokud absorbance převyšovala hodnotu 1, byly extrakty naředěny 80% acetonem. Obsah chlorofylu *a* a *b* byl vypočítán dle následujících vzorců:

$$\text{chlorofyl } a = 11,63 \cdot ABS_{665} - 2,69 \cdot ABS_{649} [mg]$$

$$\text{chlorofyl } b = 20,11 \cdot ABS_{649} - 5,18 \cdot ABS_{665} [mg]$$

Experiment byl proveden ve dvou biologických replikách. Pro rostliny linie DN Ara7^{S24N} pouze v jedné replice.

3.2.6 Měření peroxidace lipidů

Solný stres vede k tvorbě ROS způsobujících oxidativní poškození buňky, mezi které patří poškození membránových lipidů, tzv. peroxidace lipidů, jejímž produktem je malondialdehyd (MDA). Ten slouží jako marker pro stanovení oxidativního poškození membrán. Malondialdehyd v této metodě tvoří červený komplex s kyselinou thiobarbiturovou (TBA), jehož absorpční maximum je při vlnové délce 532 nm. Vzhledem k faktu, že TBA nereaguje pouze s malondialdehydem, ale i s jinými produkty peroxidace lipidů (z nichž malonaldehyd však tvoří 90 %), označuje se tato metoda jako měření TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) (Larkindale a Knight, 2002).

Manipulace s rostlinami probíhala výše popsány mi způsoby, až do přenosu na solná média, která obsahovala: 100 mmol·l⁻¹ NaCl a 100 mmol·l⁻¹ KCl nebo na média bez soli v případě kontrol. Po dalších 7 dnech kultivace (rostliny byly celkového stáří 14 dnů) následovalo odvážení celých rostlin a jejich homogenizace ve třecí misce s použitím tekutého dusíku. K homogenátu bylo přidáno 0,5 ml 0,5% kyseliny thiobarbiturové (TBA), 0,5 ml 20% kyseliny trichloroctové (TCA) a 0,5 ml pufru (50 mmol·l⁻¹ Tris-HCl, 175 mmol·l⁻¹ NaCl, pH = 8,0). Následovalo zahřívání při 95 °C po dobu 25 minut, centrifugace (13000 g, 10 min) a měření absorbance supernatantu při vlnové délce 532 nm s korekcí při 600 nm. Obsah TBARS byl spočítán podle následujícího vzorce:

$$TBARS = [(ABS_{532} - ABS_{600})/15500] \cdot 10^6 [nmol \cdot ml^{-1}]$$

Experiment byl proveden ve dvou biologických replikách.

3.2.7 Měření obsahu peroxidu vodíku

Obsah H_2O_2 byl měřen metodou tzv. xylenol orange assay, jejíž princip spočívá ve schopnosti H_2O_2 oxidovat železnatý kationt Fe^{2+} na železitý kationt Fe^{3+} , který poté vytváří komplex s xylenolovou oranží, jehož absorpční maximum je při vlnové délce 560 nm (Jiang *et al.*, 1992).

Postup sázení a přenášení rostlin byl totožný s postupem uvedeným v kapitole 3.1.3, s výjimkou toho, že byly použity pouze tyto koncentrace soli: $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl a $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl nebo média bez soli v případě kontrol. Homogenizace probíhala ve třecí misce s 1 ml destilované vody. Homogenát byl přenesen do mikrozkušavky a centrifugován (12000 g , 5 minut). Následně byla připravena reakční směs přidáváním komponentů v následujícím pořadí ve výsledných koncentracích v reakční směsi: 1) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ($250 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), 2) sorbitol ($100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), 3) ethanol (1% v/v), 4) xylenolová oranž ve $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ H_2SO_4 ($100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), 5) vzorek (16, 67% v/v), 6) $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($250 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$).

Po inkubaci reakční směsi 30 minut při $25 \text{ }^\circ\text{C}$, byla měřena absorbance při 595 nm. Od naměřené absorbance byla poté odečtena absorbance pozadí získaná paralelním měřením bez přídavku $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ do reakční směsi. Koncentrace H_2O_2 ve vzorcích byla odečtena z kalibrační křivky zhotovené měřením vzorků se známými koncentracemi H_2O_2 . Experiment byl proveden ve dvou biologických replikách.

3.2.8 Detekce aktivity superoxiddismutasy a katalasy při solném stresu

Aktivity enzymů superoxiddismutasy (SOD) a katalasy (KAT) byly stanovovány u rostlin *Arabidopsis* linie DN Ara7^{S24N}. Semena byla sázena a rostliny přenášeny způsobem uvedeným v kapitole 3.1.3. Solná média obsahovala: $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl a $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl nebo žádnou sůl. Rostliny celkového stáří 14 dnů byly dále zpracovány. Experimenty byly provedeny ve dvou biologických replikách.

Extrakce proteinů

Ve třecí misce byly homogenizovány kořeny rostlin pomocí tekutého dusíku. K homogenátu byl poté přidán $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Na-fosfátový pufr (pH = 7,8) obsahující 10% glycerol a kyselinu askorbovou v koncentraci $2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Extrakt byl po zvortexování centrifugován (13000 g , 15 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$). Obsah proteinů v supernatantu byl měřen metodou podle Bradforda (Bradford, 1976).

Nativní elektroforeza

Nativní elektroforeza bez denaturujících činidel byla provedena pro zachování aktivity studovaných enzymů. Byl použit 10% dělicí gel a 4% zaostřovací gel. Pro stanovení aktivity SOD bylo dávkováno 20 μg proteinů na jamku pro všechny vzorky, v případě stanovení aktivity katalasy to bylo 3,5 μg proteinů na jamku pro všechny vzorky. Elektroforeza probíhala v nativních podmínkách při konstantních 10 mA/gel, při 4 °C v Tris-glycinovém pufru s použitím aparatury Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad).

Detekce aktivity superoxiddismutasy

Po skončení elektroforezy byly gely inkubovány v 50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Na-fosfátovém pufru (pH = 7,8) po dobu 15 minut na třepačce. Následovala inkubace gelů v 50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Na-fosfátovém pufru (pH = 7,8) s obsahem NBT (nitroblue tetrazolium) v koncentraci 0,6 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (po dobu 20 minut ve tmě na třepačce). Následně byly gely inkubovány v 50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Na-fosfátovém pufru (pH = 7,8) obsahujícím riboflavin v koncentraci 0,06 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 0,25% TEMED a 5 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA (15 minut ve tmě na třepačce). Riboflavin byl před aplikací rozpuštěn v 96% ethanolu. Poté byly gely umístěny na 30 minut pod lampu a následně dokumentovány na dokumentačním zařízení ChemiDoc. Intenzity bandů byly vyhodnoceny v programu ImageLab.

Princip detekce aktivity SOD pomocí systému NTB/riboflavin spočívá ve tvorbě superoxidových radikálů po ozáření světlo-senzitivního riboflavinu. Superoxidové radikály redukují žlutý NBT na modrý produkt formazan, přítomnost SOD však zabraňuje této redukci, neboť převádí superoxidový radikál do H_2O_2 . Gel je po této reakci zbarven do modra s bezbarvými bandy odpovídajícími SOD (Beauchamp a Fridovich, 1971).

Detekce aktivity katalasy

Po skončení elektroforezy byly gely promývány 3x po dobu 5 minut v destilované vodě. Poté byly inkubovány v 0,006% (v/v) roztoku H_2O_2 v destilované vodě po dobu 10 minut. Poté byly gely promývány v roztoku 1% (w/v) hexakynoželozitanu draselného $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ a 1% (w/v) ferichloridu FeCl_3 v destilované vodě. Po opláchnutí gelů v destilované vodě, byly vyvolávány na dokumentačním zařízení ChemiDoc. Intenzity bandů byly vyhodnoceny v programu ImageLab.

Metoda je založena na redukci hexakynoželozitanu draselného peroxidem vodíku na hexakynoželozitan draselný, který vytváří se železitou solí berlínskou modř. Gel je

po této reakci tmavě zbarven s bezbarvými bandy odpovídajícími katalase, která odstraňuje peroxid vodíku (Aebi, 1984).

3.2.9 Analýza abundance superoxididismutasy a katalasy při solném stresu

Abundance antioxidantních enzymů superoxididismutasy a katalasy byla analyzována metodou imunoblotování u rostlin *Arabidopsis* exprimujících dominantně negativní Ara7-GFP (linie DN Ara7^{S24N}), stáří 14 dnů. Sazení semen a kultivace rostlin probíhala způsobem popsaným v předchozí kapitole. Experimenty byly provedeny ve třech biologických replikách.

Extrakce proteinů

Rostliny byly homogenizovány ve třecí misce pomocí tekutého dusíku. Pro extrakci proteinů byl k homogenátu v mikrozkuhavce přidán extrakční pufr (viz kapitola 3.1.4 Složení roztoků a médií) s DTT (1 mmol·l⁻¹) a inhibitorem proteas (Complete EDTA free protease tablets; 20 µl na 1 ml), následovala inkubace na ledě (po dobu 15 minut) za občasného vortexování, a centrifugace (13 000 g, 4 °C, 15 minut). Obsah proteinů v supernatantu byl měřen metodou podle Bradforda (Bradford, 1976).

Denaturující polakrylamidová elektroforeza

Pro separaci proteinů při denaturující polyakrylamidové elektroforeze s dodecylsíránem sodným (SDS-PAGE) byl připraven 12% dělicí gel a 4% zaostřovací gel. Pro každý vzorek bylo dávkováno 15 µg proteinů. Do první dráhy gelu bylo aplikováno 3 µl proteinového standardu (Precision Plus Protein Dual Color Standards). Vzorky určené pro dávkování byly připraveny přidáním 4x pufru Laemmlí Sample Buffer (výsledná koncentrace 25% v/v) a β-merkapt ethanolu (výsledná koncentrace 5% v/v) k extraktu proteinů. Vzorky byly před dávkováním zahřívány (95 °C, 5 minut). Elektroforeza probíhala v Tris-glycin-SDS elektroforetickém pufru při konstantním napětí 180 V asi 60 minut s použitím aparatury Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad).

Imunoblotování

V prvním kroku byly proteiny přeneseny z gelů na PVDF membrány. PVDF membrány (6x9 cm) se nejprve aktivovaly v methanolu asi 20 sekund a byly inkubovány společně

s gely v přenosovém pufru (Tris-glycinový pufr s 10% methanolem (v/v)) po dobu 10 minut. Po sestavení aparatury (Mini Trans Blot, Bio-Rad) probíhal přenos při konstantním napětí 24 V (přes noc, při 4 °C) v Tris-glycinovém pufru s 10% methanolem (v/v).

Po přenosu byly membrány promyty v destilované vodě a obarveny barvivem Ponceau S, pro kontrolu úspěšnosti přenosu. Poté byly opláchnuty destilované vodě, promývány v TBS-T pufru (3x 10 min) a následně inkubovány v blokovacím roztoku (přes noc, při 4 °C) pro zablokování nespecifických míst na membránách. Následovalo opláchnutí membrány v TBS-T pufru a inkubace s primárními protilátkami (přes noc, při 4 °C, na třepačce). Primární protilátky byly přidány do roztoku TBS-T s 3% mlékem a ředění bylo následující:

- primární protilátka rabbit anti-katalasa (1:2000)
- primární protilátka rabbit anti-FeSOD (1:3000)

Dále byly membrány promývány 5x 10 minut v TBS-T pufru a následně na ně byla aplikována sekundární protilátka, která byla naředěna do roztoku 1% BSA v TBS-T pufru (ředění sekundární protilátky bylo 1:5000). Inkubace trvala 1,5 hodiny při pokojové teplotě na třepačce. Po dalším promývání membrány (5x 10 minut v TBS-T pufru) byl na membránu aplikován roztok ECL (Clarity™ Western ECL substrate, Bio-Rad) a následovalo její vyvolávání na dokumentačním systému ChemiDoc. Intenzity bandů byly vyhodnoceny v programu ImageLab.

Denaturující polyakrylamidová elektroforeza na stain-free gelech

Pro kontroly množství nanesených proteinů byly připraveny polyakrylamidové denaturující gely pomocí kitu TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Kit (Bio-Rad). Tzv. stain free gely umožňují vizualizaci proteinů na gelu přímo po elektroforeze pomocí detekce UV signálu na dokumentačním zařízení bez nutnosti barvení gelu. Elektroforeza probíhala v Tris-glycin-SDS elektroforetickém pufru při konstantním napětí 180 V asi 60 minut s použitím aparatury Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad). Ihned poté byly gely dokumentovány na dokumentačním zařízení ChemiDoc.

4 VÝSLEDKY

4.1 FENOTYP KOŘENŮ ROSTLIN S MODIFIKOVANOU ARA7

Hojně využívanou možností studia funkce proteinu v organismu je pozorování fenotypu mutantních organismů majících gen tohoto proteinu vyřazen z činnosti nebo jehož činnost je modifikována některou z metod molekulární biologie. Fenotyp takovýchto organismů je poté porovnáván s fenotypem divých typů organismů a z pozorovaných změn je možno usuzovat na roli studovaného proteinu (Housden *et al.*, 2017). V předkládané práci byla studována úloha malé GTPasy Ara7 v reakci rostlin na solný stres. Tomu však předcházela analýza fenotypu kořenů rostlin s modifikovanou Ara7: exprimujících dominantně negativní Ara7-GFP po indukci tamoxifenem (linie DN Ara7^{S24N}) a rostlin s expresí konstitutivně aktivní Ara7 (linie CA Ara7^{Q69L}). Byly porovnávány následující parametry: délka primárního kořene, počet a délky postranních kořenů a počet a délky kořenových vlásků.

4.1.1 Zapojení Ara7 v růstu primárních a postranních kořenů

Výsledky této analýzy, provedené s cílem zjistit, zda malá GTPasa Ara7 hraje roli v růstu primárních a postranních kořenů, shrnují obrázky 9, 10 a 11. Realizaci experimentu popisují první tři odstavce kapitoly 3.2.3.

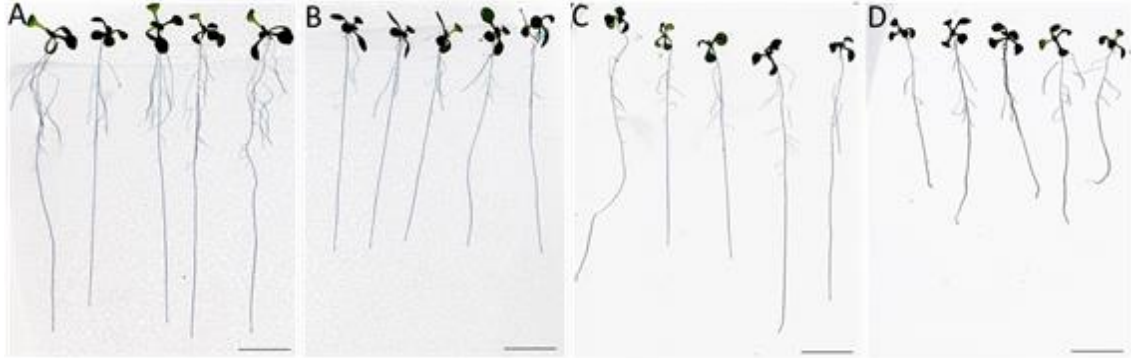
Úloha Ara7 v růstu primárních kořenů

Studium délky primárních kořenů (Obr. 9) ukázalo odlišnosti mezi divým typem rostlin *Arabidopsis Col-0*, rostlinami CA Ara7^{Q69L} a rostlinami DN Ara7^{S24N} (po indukci tamoxifenem). U obou transgenních rostlin došlo ke snížení průměrné délky primárního kořene.

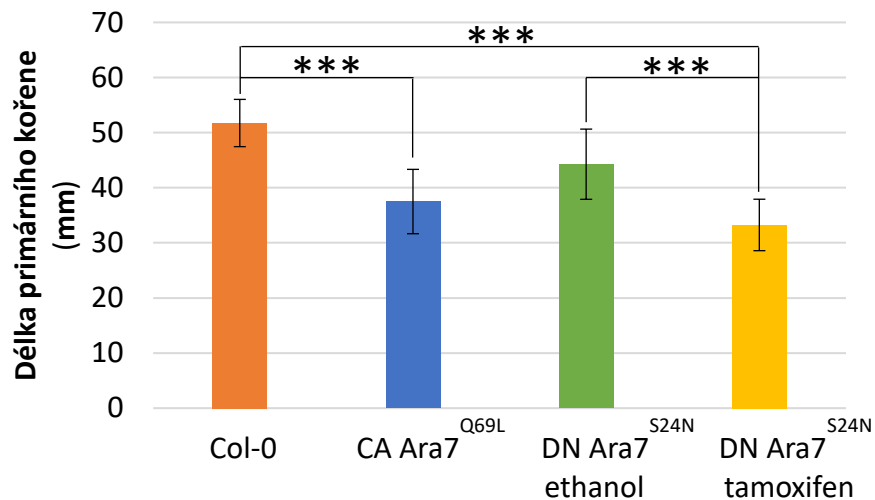
Průměrný rozdíl délek mezi primárními kořeny rostlin Col-0 a rostlin CA Ara7^{Q69L} činil přibližně 14,25 mm a byl tak méně výrazný než rozdíl mezi rostlinami Col-0 a DN Ara7^{S24N} (po indukci tamoxifenem) dosahující průměrné hodnoty přibližně 18,50 mm. Oba rozdíly lze považovat za statisticky signifikantní na hladině významnosti $p \leq 0,001$ v testu ANOVA (Obr. 9, 10).

Výše uvedené poukazuje na odlišnost mezi délkami primárních kořenů u rostlin CA Ara7^{Q69L} a rostlin DN Ara7^{S24N} (po indukci tamoxifenem), který byl taktéž statisticky signifikantní (Obr. 10). Délka primárních kořenů rostlin DN Ara7^{S24N} (ethanolová

kontrola), u nichž nedochází k indukci exprese inaktivní Ara7, se podobala délce těchto kořenů u rostlin Col-0 a byla výrazně vyšší než u rostlin DN Ara7^{S24N} (po indukci tamoxifenem) (Obr. 9, 10).



Obr. 9: Fenotyp rostlin s modifikovanou Ara7. Rostliny Arabidopsis: ekotyp Col-0 (A), exprimující konstitutivně aktivní Ara7 (CA Ara7^{Q69L}) (B), exprimující dominantně negativní Ara7 (DN Ara7^{S24N}) ethanolová kontrola (C), exprimující dominantně negativní Ara7 (DN Ara7^{S24N}) po indukci tamoxifenem (D). Celkové stáří rostlin je 7 dnů, růst 5 dnů na ½ MS médiu, poté přenos na nové ½ MS médium (A, B), ½ MS médium s ethanolem (C) a tamoxifenem (D). Měřítko: 1 cm.

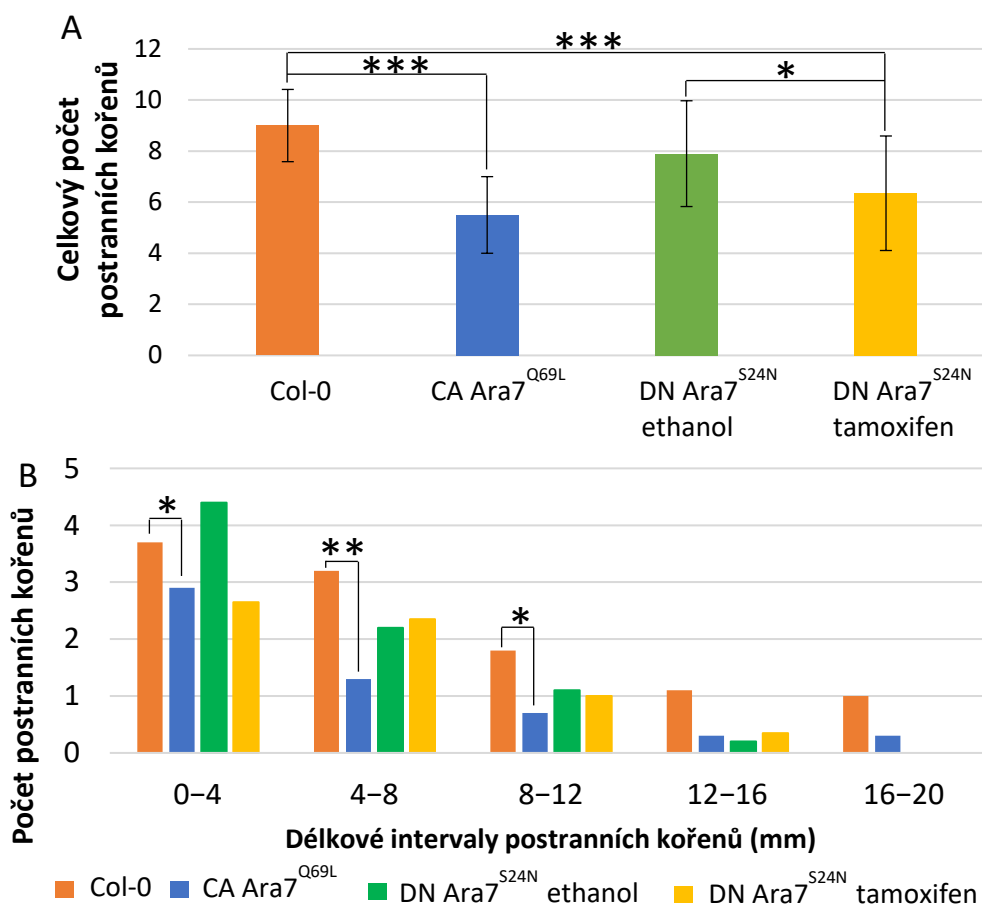


Obr. 10: Grafické znázornění průměrné délky primárních kořenů rostlin s modifikovanou Ara7. Rostliny Arabidopsis: ekotyp Col-0, s expresí konstitutivně aktivní Ara7 (CA Ara7^{Q69L}), exprimující dominantně negativní Ara7 (DN Ara7^{S24N}) ethanolová kontrola a po indukci tamoxifenem. Celkové stáří rostlin je 7 dnů, růst 5 dnů na ½ MS médiu, poté přenos na nové ½ MS médium (Col-0, CA Ara7^{Q69L}), ½ MS médium s ethanolem nebo tamoxifenem (DN Ara7^{S24N}). Sloupce vyjadřují průměr délky (\pm směrodatná odchylka) z 15 (Col-0, CA Ara7^{Q69L}) nebo ze 30 (DN Ara7^{S24N}) měřených rostlin. Statisticky významné rozdíly jsou označeny hvězdičkou podle hladiny významnosti v testu ANOVA: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

Výše uvedené výsledky poukazují na zapojení Ara7 v růstu primárního kořene. Rostliny exprimující aktivní Ara7 a inaktivní Ara7 výrazně snižují délku primárního kořene, přičemž toto snížení dosahuje u rostlin s inaktivní Ara7 větší výraznost. Lze vyvodit, že cyklická aktivace a inaktivace Ara7 je nezbytná pro správný růst primárních kořenů.

Úloha Ara7 v růstu postranních kořenů

V porovnání s divým typem *Arabidopsis Col-0* došlo k výraznému snížení celkového počtu postranních kořenů u obou transgenních linií CA Ara7^{Q69L} i DN Ara7^{S24N} (po indukci tamoxifenem) (Obr. 9, 11 A), a to na hladině významnosti $p \leq 0,001$ v testu ANOVA.



Obr. 11: Grafické znázornění počtu postranních kořenů rostlin s modifikovanou Ara7. Celkový počet postranních kořenů (A), počet postranních kořenů v jednotlivých délkových intervalech (B). Rostliny *Arabidopsis*: ekotyp Col-0, s expresí konstitutivně aktivní Ara7 (CA Ara7^{Q69L}), exprimující dominantně negativní Ara7 (DN Ara7^{S24N}) (po indukci tamoxifenem a ethanolová kontrola). Celkové stáří rostlin je 7 dnů, růst 5 dnů na ½ MS médiu, poté přenos na nové ½ MS médium (Col-0, CA Ara7^{Q69L}), ½ MS médium s ethanolem nebo tamoxifenem (DN Ara7^{S24N}). Sloupce vyjadřují průměrný počet (\pm směrodatná odchylka) z 10 měřených rostlin. Statisticky významné rozdíly jsou označeny hvězdičkou podle hladiny významnosti v testu ANOVA: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

Celkový počet postranních kořenů dosahoval u rostlin CA Ara7^{Q69L} nižších hodnot než u rostlin DN Ara7^{S24N} (po indukci tamoxifenem), tento rozdíl však statisticky významný nebyl. Rostliny DN Ara7^{S24N} ethanolové kontroly dosahovaly počtu postranních kořenů přibližně srovnatelného s rostlinami Col-0, tamoxifen vedl ke snížení tohoto počtu (Obr. 11 A).

Spočtené postranní kořeny byly následně rozděleny do pěti intervalů (0–4, 4–8, 8–12, 12–16 a 16–20 mm) a v nich porovnávány dle své délky (Obr. 11 B). V jednotlivých intervalech se projevil stejný trend, jako u celkového počtu postranních kořenů komentovaných v předchozím odstavci. V každém délkovém intervalu tak bylo zaznamenáno snížení počtu postranních kořenů u rostlin CA Ara7^{Q69L} i DN Ara7^{S24N} (po indukci tamoxifenem) v porovnání s divým typem Arabidopsis Col-0, přičemž rostliny DN Ara7^{S24N} již nevykazovaly přítomnost postranních kořenů v délkovém rozmezí 16–20 mm (Obr. 10 B).

Z výše uvedených výsledků vyplývá důležitost Ara7, resp. její cyklické aktivace a inaktivace, pro zachování správného počtu a délky postranních kořenů, neboť postranní kořeny rostlin tvořících konstitutivně aktivní CA Ara7^{Q69L} a inaktivní DN Ara7^{S24N} dosahují nižšího počtu i délky než rostliny divého typu Arabidopsis Col-0.

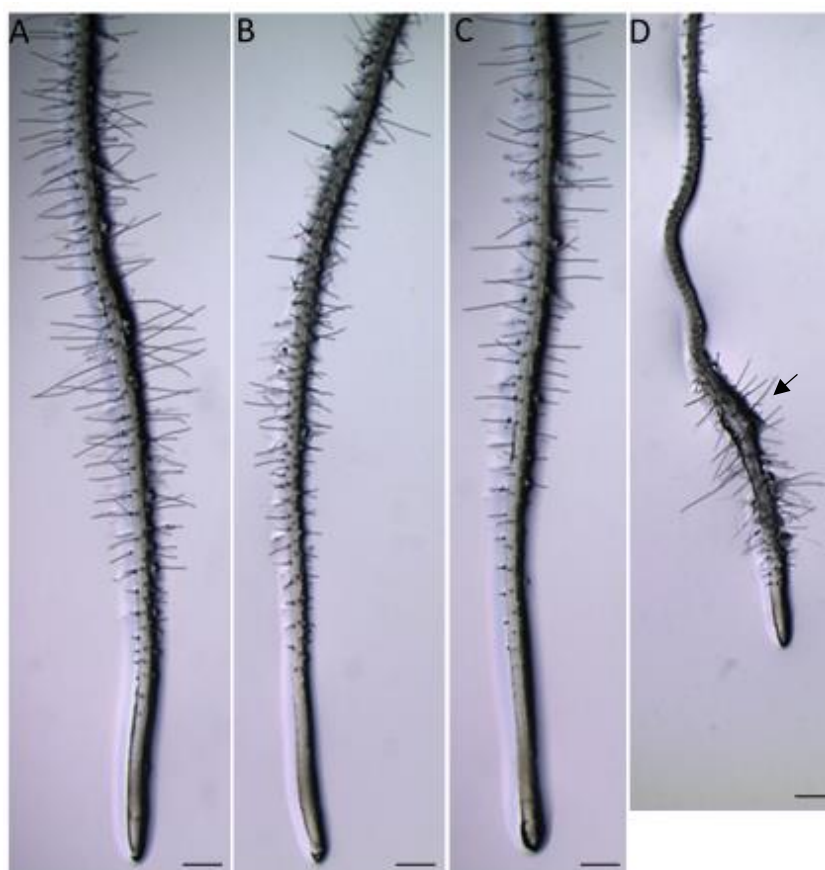
4.1.2 Zapojení Ara7 v růstu kořenových vlásků

Projev poruchy funkce Ara7 ve fenotypu kořenových vlásků, pramenící ze znemožnění hydrolýzy GTP (u rostlin CA Ara7^{Q69L}) nebo z neschopnosti záměny GDP za GTP (u rostlin DN Ara7^{S24N}) v porovnání s divým typem Arabidopsis Col-0, ukazuje Obr. 12. Experiment byl realizován postupem uvedeným v prvních třech odstavcích kapitoly 3.2.3. Byly měřeny všechny kořenové vlásky do vzdálenosti 5 mm od kořenové špičky.

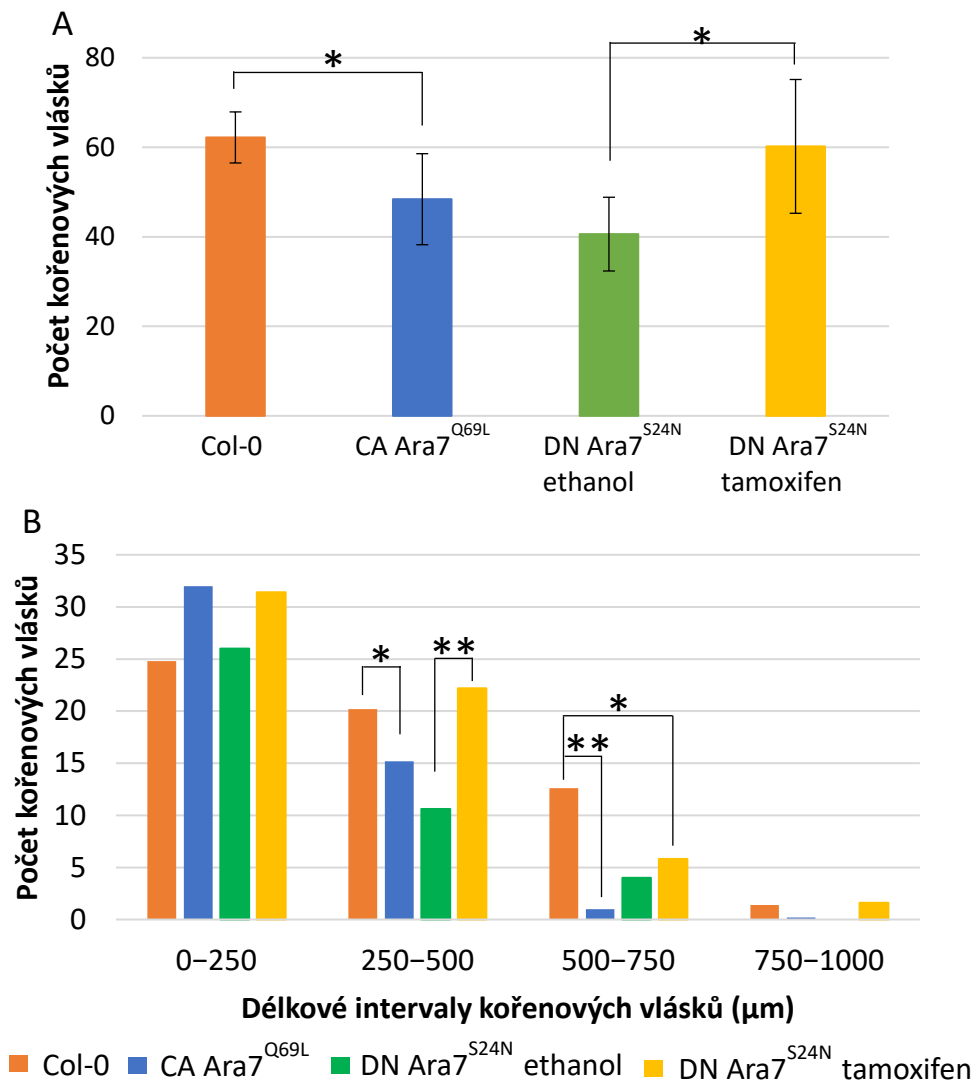
Signifikantní snížení počtu kořenových vlásků v porovnání s divým typem rostlin Arabidopsis Col-0 bylo zaznamenáno u rostlin CA Ara7^{Q69L}, přibližně o 14 vlásků na rostlinu a na hladině významnosti $p \leq 0,05$ v testu ANOVA (Obr. 12 A). Avšak rostliny DN Ara7^{S24N} (po indukci tamoxifenem) vykazovaly téměř identický počet kořenových vlásků jako rostliny Col-0. Nicméně signifikantní rozdíl byl patrný mezi rostlinami DN Ara7^{S24N} (po indukci tamoxifenem) a rostlinami DN Ara7^{S24N} ethanolové kontroly (Obr. 13 A).

Vyhodnocení délkových rozdílů kořenových vlásků, jehož bylo dosaženo rozdělením kořenových vlásků do čtyř intervalů (0–250, 250–500, 500–750 a 750–1000 μm) znázorňuje Obr. 13 B. Kořenové vlásky malé délky (0–250 μm) byly u všech

zkoumaných rostlin zastoupeny přibližně stejně, přestože počet těchto vlásků dosahoval u rostlin CA Ara7^{Q69L} a DN Ara7^{S24N} (po indukci tamoxifenem) mírně vyšších hodnot než u rostlin Col-0, nejednalo se o statisticky významné rozdíly. Signifikantní rozdíly se objevily až v intervalech s delšími kořenovými vlásky. Mezi rostlinami Col-0 a CA Ara7^{Q69L} tak byly tyto rozdíly statisticky významné od délky 250 μm . Rostliny DN Ara7^{S24N} (po indukci tamoxifenem) vykazovaly nepatrně vyšší počet kořenových vlásků než rostliny Col-0 v intervalech 750–1000 μm (Obr. 13 B).



Obr. 12: Mikroskopické pozorování rostlin s modifikovanou Ara7. Rostliny Arabidopsis: ekotyp Col-0 (A), s expresí konstitutivně aktivní Ara7 (CA Ara7^{Q69L}) (B), exprimující dominantně negativní Ara7 (DN Ara7^{S24N}) ethanolová kontrola (C), exprimující dominantně negativní Ara7 (DN Ara7^{S24N}) po indukci tamoxifenem (D). Celkové stáří rostlin je 7 dnů, růst 5 dnů na ½ MS médiu, poté přenos na nové ½ MS médium (A, B), ½ MS médium s ethanollem (C), tamoxifenem (D). Šipka znázorňuje otok kořene. Měřítka: 0,5 mm.



Obr. 13: Grafické znázornění počtu kořenových vlásků u rostlin s modifikovanou Ara7. Celkový počet kořenových vlásků (A), počet kořenových vlásků v jednotlivých délkových intervalech (B). Rostliny *Arabidopsis*: ekotyp Col-0, s expresí konstitutivně aktivní Ara7 (CA Ara7^{Q69L}), exprimující dominantně negativní Ara7 (DN Ara7^{S24N}) ethanolová kontrola a po indukci tamoxifenem. Celkové stáří rostlin je 7 dnů, růst 5 dnů na ½ MS médiu, poté přenos na nové ½ MS médium (Col-0, CA Ara7^{Q69L}), ½ MS médium s ethanolem nebo tamoxifenem (DN Ara7^{S24N}). Sloupce vyjadřují průměrný počet (± směrodatná odchylka) z 10 měřených rostlin. Statisticky významné rozdíly jsou označeny hvězdičkou podle hladiny významnosti v testu ANOVA: *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001

Uspořádání kořenových vlásků se u rostlin DN Ara7^{S24N} (po indukci tamoxifenem) značně odlišovalo od ethanolové kontroly. Bylo možné pozorovat výrazné přiblížení zóny růstu kořenových vlásků ke kořenové špičce u rostlin DN Ara7^{S24N} po indukci tamoxifenem (Obr. 12 D).

Výsledky prokázaly zapojení Ara7 v tvorbě kořenových vlásků. Neschopnost Ara7 hydrolyzovat GTP (aktivace) vede k celkovému snížení počtu a délky těchto vlásků. Zamezení výměny GDP za GTP (inaktivace) poškozuje normální uspořádání vlásků

po celé délce kořene a namísto toho je soustřeďuje pouze v jeho dolní části a způsobuje deformaci kořene (otoky).

Doba působení tamoxifenu na rostliny DN Ara7^{S24N} činila dva dny, další výsledky této práce, prezentované v kapitole 4.2.1 (Obr. 15), ukázaly, že průměrný nárůst kořene za den u těchto rostlin (po indukci tamoxifenem) je $1,49 \pm 0,97$ mm. Výrazný nárůst kořenových vlásků byl pozorován právě v této zóně, lze tedy usoudit, že inaktivace Ara7 vede k rapidní tvorbě kořenových vlásků.

4.2 VLIV ARA7 NA ODPOVĚĎ ROSTLIN NA SOLNÝ STRES

Provedení testů s cílem analýzy zapojení Ara7 v odpovědi rostlin na solný stres, a tedy potenciální využití genetické manipulace Ara7 pro zvyšování výnosu rostlin na zasolených půdách, bylo realizováno ve třech částech. První část se týkala posouzení odolnosti kořenového systému rostlin *Arabidopsis* s modifikovanou Ara7, druhá nadzemních částí se zaměřením na změny v obsahu chlorofylu a třetí analýzy oxidativního poškození při solném stresu a antioxidačních enzymů.

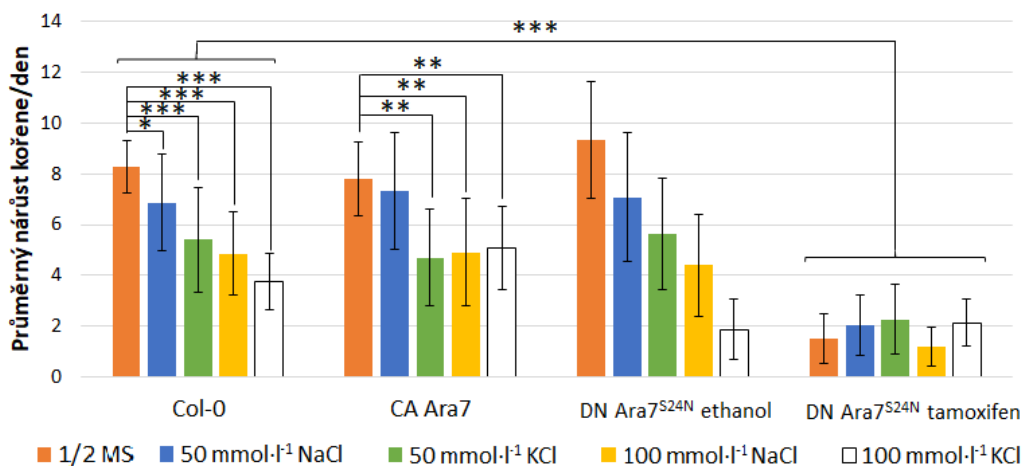
4.2.1 Vliv Ara7 na reakci kořenového systému na solný stres

Provedení experimentu, majícího za cíl stanovit úlohu Ara7 v reakci kořenového systému na solný stres, popisuje kapitola 3.2.3, výsledky pak shrnuje Obr. 14. Fenotypová analýza byla soustředěna na porovnání délek primárních kořenů (délky primárních kořenů po 4denním růstu na solných médiích znázorňuje Obr. 14), rychlosti růstu primárních kořenů vyjádřené jako průměrný přírůstek za 1 den (Obr. 15) a počtu postranních kořenů (Obr. 14, 16).

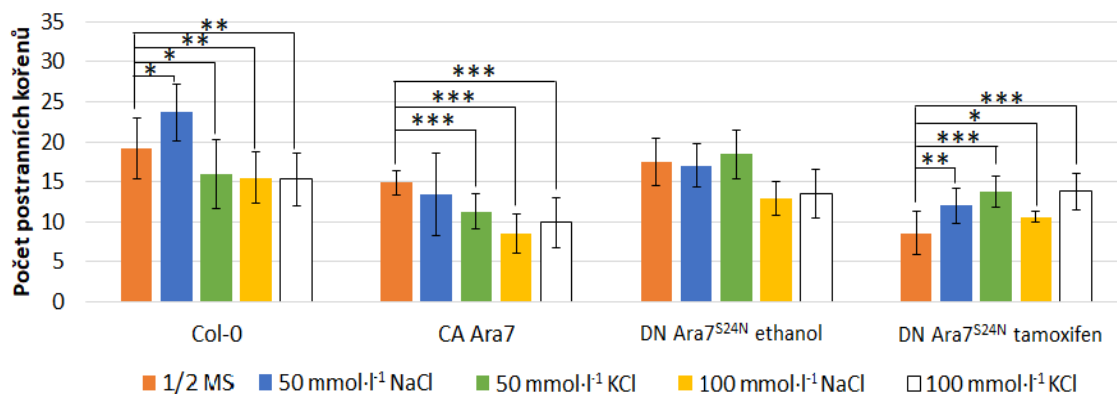
U rostlin *Arabidopsis* Col-0 byla pozorována, v souladu s očekáváním, klesající délka primárního kořene s rostoucí koncentrací solí NaCl a KCl. U obou koncentrací KCl (50 a 100 mmol·l⁻¹) byl tento trend výraznější, než u odpovídajících koncentrací NaCl (Obr. 14). Stejná situace nastala při vyhodnocení průměrného přírůstku primárního kořene za 1 den a tyto výsledky byly statisticky významné (Obr. 15). Jiný trend se projevil při porovnání počtu postranních kořenů. Zde NaCl v koncentraci 50 mmol·l⁻¹ zpříčinil signifikantní zvýšení počtu postranních kořenů, avšak u stejné koncentrace KCl k němu nedošlo, naopak bylo vyvoláno výrazné snížení počtu těchto kořenů, velmi podobné tomu, které bylo vyvoláno také účinkem 100 mmol·l⁻¹ NaCl i KCl (Obr. 14, Obr. 16).



Obr. 14: Vliv solného stresu na fenotyp kořenového systému rostlin s modifikovanou Ara7. Rostliny *Arabidopsis*: ekotyp Col-0, s expresí konstitutivně aktivní Ara7 (CA Ara7^{Q69L}), exprimující dominantně negativní Ara7 (DN Ara7^{S24N}) ethanolová kontrola a po indukci tamoxifenem, rostoucí na ½ MS médiu (A), ½ MS médiu s 50 mmol·l⁻¹ NaCl (B), 50 mmol·l⁻¹ KCl (C), 100 mmol·l⁻¹ NaCl (D), 100 mmol·l⁻¹ KCl (E). Celkové stáří rostlin je 11 dnů, růst 5 dnů na ½ MS médiu, poté přenos na nové ½ MS médium (Col-0, CA Ara7^{Q69L}), ½ MS médium s ethanolem nebo tamoxifenem (DN Ara7^{S24N}). Po dvou dnech přenos na solná média, zde růst 4 dny. Měřítko: 1 cm.



Obr. 15: Grafické znázornění průměrného nárůstu primárních kořenů za den u rostlin s modifikovanou Ara7 při solném stresu. Rostliny Arabidopsis: ekotyp Col-0, s expresí konstitutivně aktivní Ara7 (CA Ara7^{Q69L}), exprimující dominantně negativní Ara7 (DN Ara7^{S24N}) ethanolová kontrola a po indukci tamoxifenem. Celkové stáří rostlin je 11 dnů, růst 5 dnů na ½ MS médiu, poté přenos na nové ½ MS médium (Col-0, CA Ara7^{Q69L}), ½ MS médium s ethanolem nebo tamoxifenem (DN Ara7^{S24N}). Po dvou dnech přenos na solná média. Sloupce vyjadřují průměrný nárůst (\pm směrodatná odchylka) z 15 (Col-0, CA Ara7^{Q69L}) nebo ze 30 (DN Ara7^{S24N}) měřených rostlin. Statisticky významné rozdíly jsou označeny hvězdičkou podle hladiny významnosti v testu ANOVA: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.



Obr. 16: Grafické znázornění počtu postranních kořenů u rostlin s modifikovanou Ara7 při solném stresu. Rostliny Arabidopsis: ekotyp Col-0, s expresí konstitutivně aktivní Ara7 (CA Ara7^{Q69L}), exprimující dominantně negativní Ara7 (DN Ara7^{S24N}) ethanolová kontrola a po indukci tamoxifenem. Celkové stáří rostlin je 11 dnů, růst 5 dnů na ½ MS médiu, poté přenos na nové ½ MS médium (Col-0, CA Ara7^{Q69L}), ½ MS médium s ethanolem nebo tamoxifenem (DN Ara7^{S24N}). Po dvou dnech přenos na solná média, zde růst 4 dny. Sloupce vyjadřují průměrný počet (\pm směrodatná odchylka) z 15 (Col-0, CA Ara7^{Q69L}) nebo ze 30 (DN Ara7^{S24N}) měřených rostlin. Statisticky významné rozdíly jsou označeny hvězdičkou podle hladiny významnosti v testu ANOVA: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

Délky primárních kořenů rostlin Arabidopsis CA Ara7^{Q69L} nevykazovaly snížení v reakci na působení 50 mmol·l⁻¹ NaCl (Obr. 14). Snížení délky a také statisticky významné snížení průměrné rychlosti růstu (na hladině $p \leq 0,01$ v testu ANOVA) bylo patrné až účinkem následujících koncentrací solí: 50 mmol·l⁻¹ KCl, 100 mmol·l⁻¹ NaCl

a 100 mmol·l⁻¹ KCl, přičemž výrazné rozdíly mezi těmito koncentracemi nebyly zaznamenány (Obr. 14, Obr. 15). Stejný trend byl pozorován také při účinku solí na počet postranních kořenů, kde se aplikace 50 mmol·l⁻¹ NaCl změnou v počtu postranních kořenů neprojevila, avšak aplikace 50 mmol·l⁻¹ KCl, 100 mmol·l⁻¹ NaCl a 100 mmol·l⁻¹ KCl vedla k signifikantnímu poklesu počtu těchto kořenů na hladině významnosti $p \leq 0,001$ v testu ANOVA (Obr. 16).

U rostlin *Arabidopsis* exprimujících dominantně negativní Ara7 (DN Ara7^{S24N}) (ethanolová kontrola) byl pozorován stejný trend poklesu délek a rychlosti růstu primárních kořenů jako v případě rostlin Col-0. Výrazné snížení počtu postranních kořenů se zde projevilo až při 100 mmol·l⁻¹ koncentraci obou solí (Obr. 14, 15, 16, statisticky významné rozdíly neuvedeny).

Přestože délky a rychlost růstu primárních kořenů u rostlin *Arabidopsis* DN Ara7^{S24N} po indukci tamoxifenem vykazovaly mírné zvýšení po aplikaci 50 mmol·l⁻¹ NaCl, KCl a 100 mmol·l⁻¹ KCl oproti rostlinám rostoucím na médiu bez solí, nebyly tyto výsledky statisticky významné (Obr. 14, 15). Zvýšení počtu postranních kořenů těchto rostlin v reakci na sůl však bylo statisticky významné jak u NaCl, tak u KCl (Obr. 14, 16).

Délka primárního kořene a jeho průměrná rychlost růstu byla u rostlin Col-0 postižena výrazněji při vystavení solnému stresu, než tomu bylo u rostlin CA Ara7^{Q69L}. U rostlin DN Ara7^{S24N} dokonce nedošlo vůbec k signifikantnímu snížení těchto dvou parametrů. Snížení počtu postranních kořenů bylo naopak mírnější u rostlin Col-0 vystavených účinku solí než u rostlin CA Ara7^{Q69L}. Naproti tomu rostliny DN Ara7^{S24N} vykazovaly výrazné zvýšení počtu postranních kořenů v tomto experimentu.

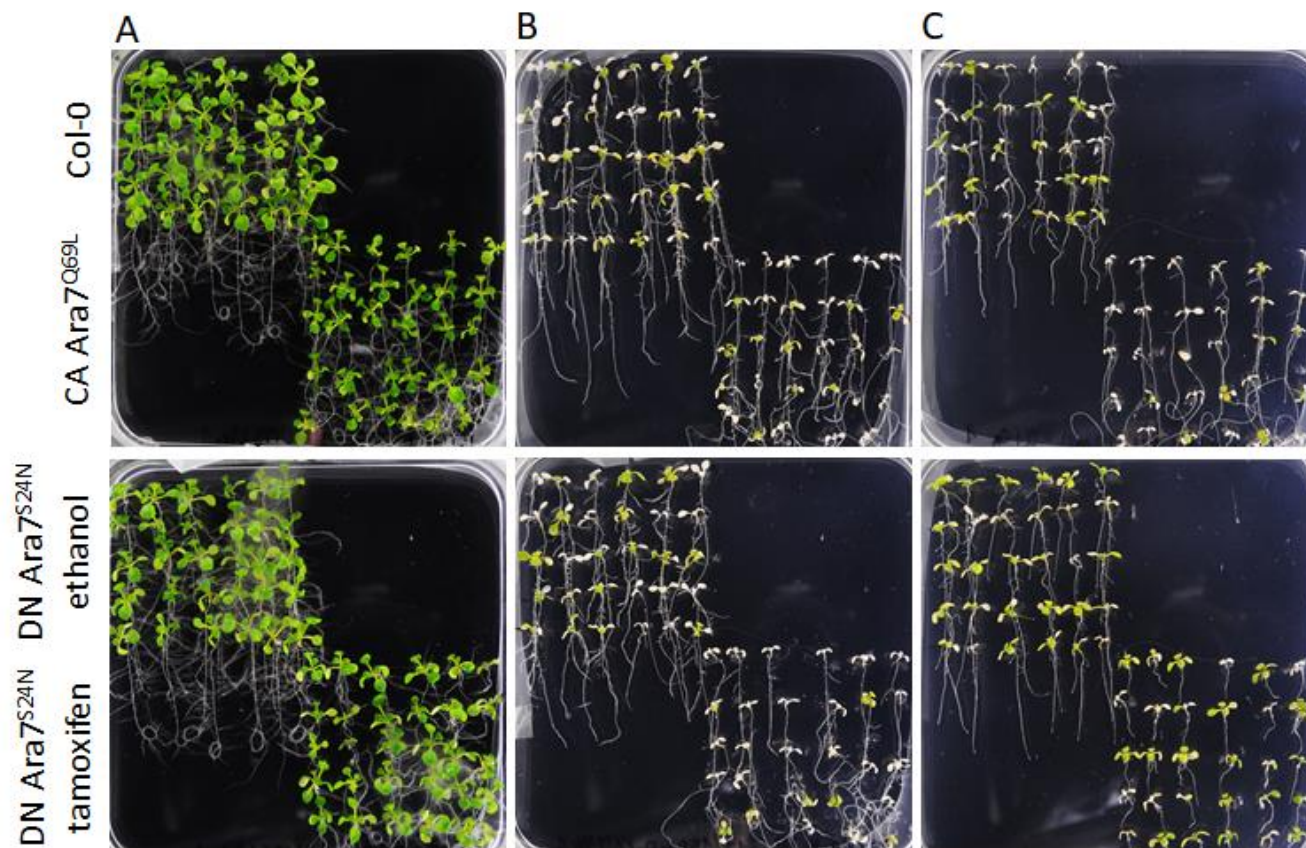
Zapojení Ara7 v růstu primárních i postranních kořenů již bylo v této práci vyvozeno, z výše uvedených výsledků můžeme také konstatovat, že stálá aktivita Ara7 mírně snižuje negativní efekt solí na délku a rychlost růstu primárních kořenů, avšak zároveň prohlubuje snížení počtu postranních kořenů při stejných podmínkách. Inaktivní Ara7 zvyšuje odolnost na účinek solí v obou parametrech, resp. působí proti inhibičnímu vlivu inaktivace Ara7 na délku primárního kořene a počet postranních kořenů. I přes tyto výsledky zůstává však počet postranních kořenů u Col-0 vyšší ve všech případech než u obou transgenních rostlin a stejně je tomu tak i s délkou primárních kořenů. Na základě výše uvedeného lze konstatovat, že Ara7 je zapojena v reakci kořenového systému rostlin na solný stres.

4.2.2 Obsah chlorofylu u *Arabidopsis* s modifikovanou Ara7 při solném stresu

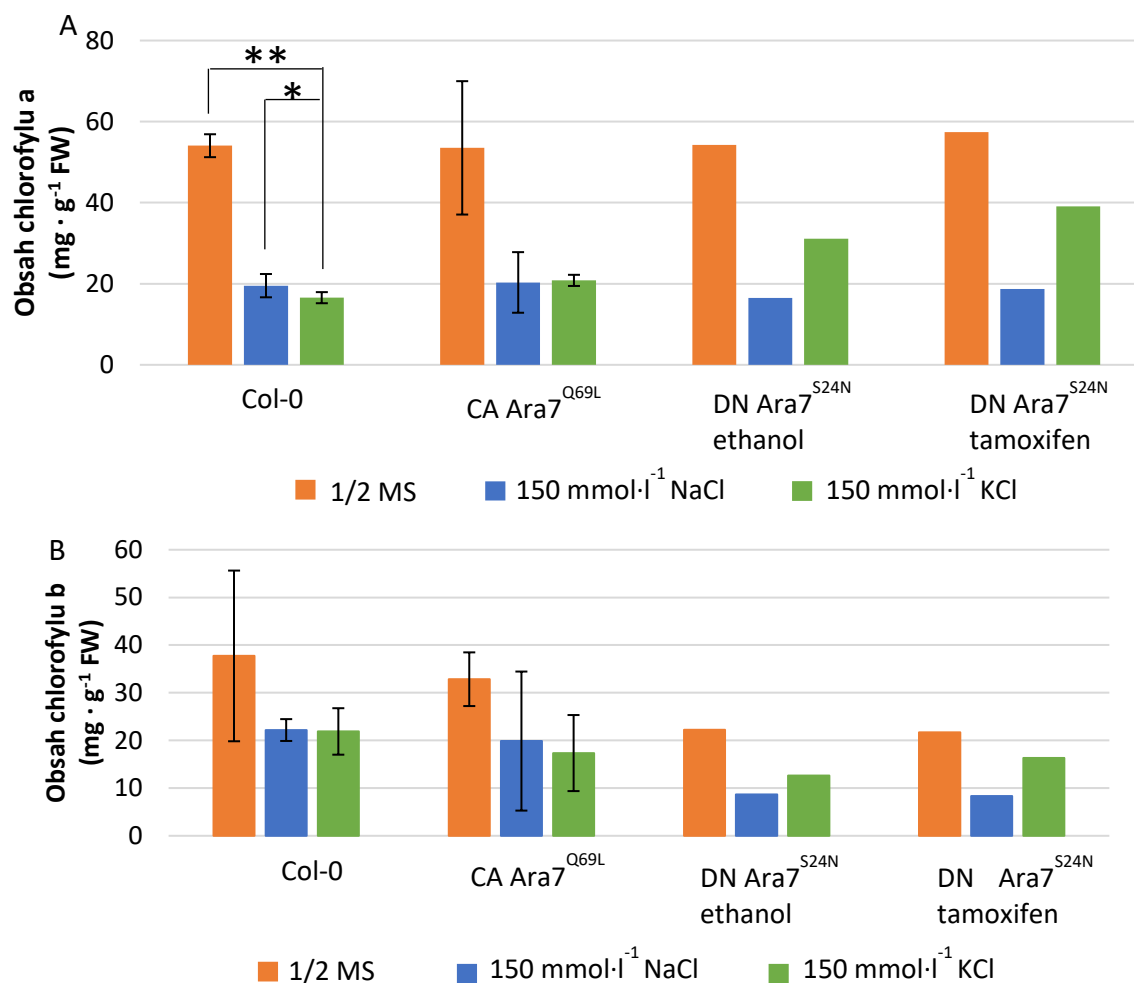
Obsah chlorofylu je jedním z nejčastěji používaných parametrů odolnosti nebo citlivosti rostlin na nepříznivé podmínky (Yancheva *et al.*, 2016). Obsah chlorofylu v liniích s modifikovanou Ara7 shrnuje Obr. 17. Grafické znázornění naměřených hodnot obsahuje Obr. 18.

Účinek $150 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl i KCl se projevil u rostlin *Arabidopsis* Col-0 snížením obsahu chlorofylu *a* i chlorofylu *b*, přičemž toto snížení se ukázalo být zřetelnější v reakci na $150 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl u chlorofylu *a*. Obdobná situace nastala u rostlin CA Ara7^{Q69L}, kde účinek soli, $150 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl i KCl, vyvolal přibližně shodné snížení obsahu chlorofylu. Ztráta chlorofylu účinkem solí byla zaznamenána také u rostlin DN Ara7^{S24N}, avšak při působení $150 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl dosahovala tato ztráta menší výraznosti, jak u chlorofylu *a*, tak u chlorofylu *b* (Obr. 17, 18 A, B).

Ztráta chlorofylu *a* i chlorofylu *b* dosahovala u rostlin Col-0 a CA Ara7^{Q69L} vystaveným účinku $150 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl a KCl přibližně stejných hodnot, nelze tedy říci, že by aktivace Ara7 změnila schopnost rostlin tolerovat solný stres. Avšak účinek $150 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl na ztrátu chlorofylu *a* u rostlin s inaktivní Ara7 nedosahoval takové výraznosti, jako tomu bylo u rostlin Col-0 a CA Ara7^{Q69L} (Obr. 17, 18 A, B). Tato linie může být odolnější na solný stres způsobený $150 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl. Množství biomasy vytvořené rostlinami, a tedy i zemědělský výnos, závisí na účinnosti fotosyntézy (Foyer *et al.*, 2017).



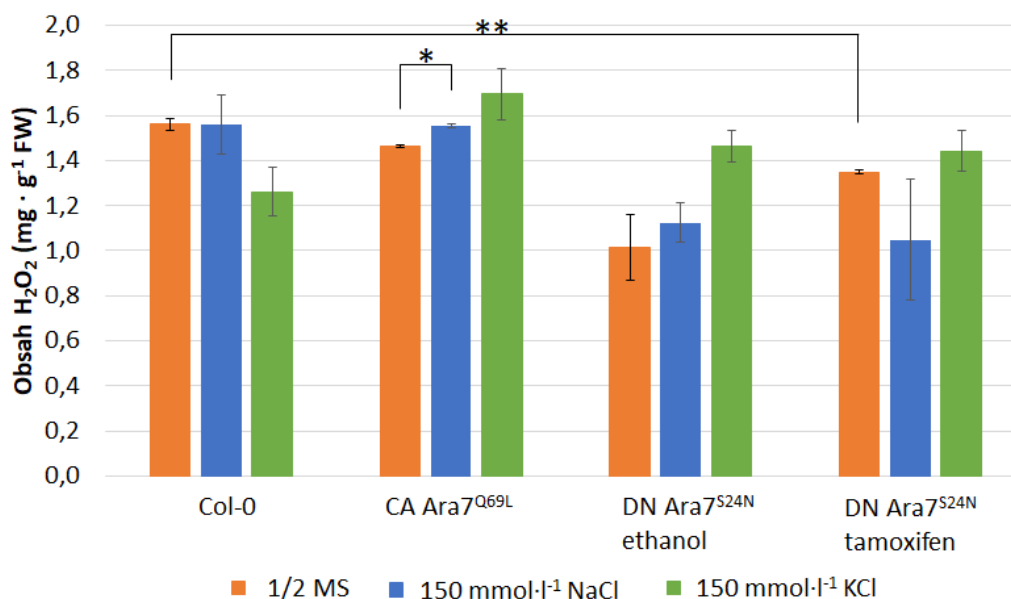
Obr. 17: Vliv solného stresu na fenotyp nadzemní části (obsahu chlorofylu) u rostlin s modifikovanou Ara7. Rostliny Arabidopsis: ekotyp Col-0, s expresí konstitutivně aktivní Ara7 (CA Ara7^{Q69L}), exprimující dominantně negativní Ara7 (DN Ara7^{S24N}) ethanolová kontrola nebo po indukci tamoxifenem, rostoucí na médiích ½ MS: bez soli (A), 150 mmol·l⁻¹ NaCl (B), 150 mmol·l⁻¹ KCl (C). Celkové stáří rostlin je 12 dnů, růst 5 dnů na ½ MS médiu, poté přenos na nové ½ MS médium (Col-0, CA Ara7^{Q69L}), ½ MS médium s ethanolem nebo tamoxifenem (DN Ara7^{S24N}). Po dvou dnech přenos na solná média, zde růst 5 dnů.



Obr. 18: Grafické znázornění obsahu chlorofylu u rostlin s modifikovanou Ara7 při solném stresu. Chlorofyl *a* (A), chlorofyl *b* (B). Rostliny *Arabidopsis*: ekotyp Col-0, s expresí konstitutivně aktivní Ara7 (CA Ara7^{Q69L}), exprimující dominantně negativní Ara7 (DN Ara7^{S24N}) ethanolová kontrola nebo po indukci tamoxifenem. Celkové stáří rostlin 14 dnů, růst 5 dnů na ½ MS médiu, poté přenos na nové ½ MS médium (Col-0, CA Ara7^{Q69L}), ½ MS médium s ethanolem nebo tamoxifenem (DN Ara7^{S24N}). Po dvou dnech přenos na solná média (150 mmol·l⁻¹ NaCl, 150 mmol·l⁻¹ KCl) zde růst 7 dnů. Sloupce vyjadřují průměrný obsah chlorofylu (mg·g⁻¹ FW) (\pm směrodatná odchylka) ze dvou biologických opakování (Col-0, CA Ara7^{Q69L}) nebo z jednoho (DN Ara7^{S24N}). Statisticky významné rozdíly jsou označeny hvězdičkou podle hladiny významnosti v testu ANOVA: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

4.2.3 Vliv Ara7 na regulaci obsahu H₂O₂ při solném stresu

Buněčné i orgánové poškození pozorovatelné při solném stresu je z velké části dílem nadměrné produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) (Krishnamurthy a Rathinasabapathi, 2013). Z tohoto důvodu byl další výzkum směřován tímto směrem a zde jsou předloženy výsledky měření obsahu H₂O₂ (Obr. 19), jednoho z klíčových zástupců ROS. Provedení experimentu popisuje kapitola 3.2.7.



Obr. 19: Grafické znázornění obsahu H_2O_2 u rostlin s modifikovanou Ara7. Rostliny Arabidopsis: ekotyp Col-0, s expresí konstitutivně aktivní Ara7 (CA Ara7^{Q69L}), exprimující dominantně negativní Ara7 (DN Ara7^{S24N}) ethanolová kontrola a po indukci tamoxifenem. Celkové stáří rostlin 14 dnů, růst 5 dnů na 1/2 MS médiu, poté přenos na nové 1/2 MS médium (Col-0, CA Ara7^{Q69L}), 1/2 MS médium s ethanolem nebo tamoxifenem (DN Ara7^{S24N}). Po dvou dnech přenos na solná média (100 mmol·l⁻¹ NaCl, 100 mmol·l⁻¹ KCl) zde růst 7 dnů. Sloupce vyjadřují průměrný obsah H_2O_2 (mg·g⁻¹ FW) (\pm směrodatná odchylka) ze dvou biologických opakování. Statisticky významné rozdíly jsou označeny hvězdičkou podle hladiny významnosti v testu ANOVA: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

Obsah H_2O_2 v rostlinách Arabidopsis Col-0 zůstal prakticky nezměněn působením 100 mmol·l⁻¹ NaCl v porovnání s rostlinami rostoucími Col-0 na médiu bez soli. Snížení bylo zaznamenáno až v reakci na účinek 100 mmol·l⁻¹ KCl, pokles však nedosahoval statistické významnosti. U rostlin CA Ara7^{Q69L} došlo k nárůstu obsahu H_2O_2 v důsledku působení 100 mmol·l⁻¹ NaCl, o něco vyšší nárůst způsobil 100 mmol·l⁻¹ KCl. Situace se opakovala u rostlin DN Ara7^{S24N} (ethanolová kontrola). Rostliny DN Ara7^{S24N} (po indukci tamoxifenem) vykazovaly snížení obsahu H_2O_2 v reakci na 100 mmol·l⁻¹ NaCl, ale malé zvýšení tohoto obsahu v reakci na 100 mmol·l⁻¹ KCl (Obr. 19).

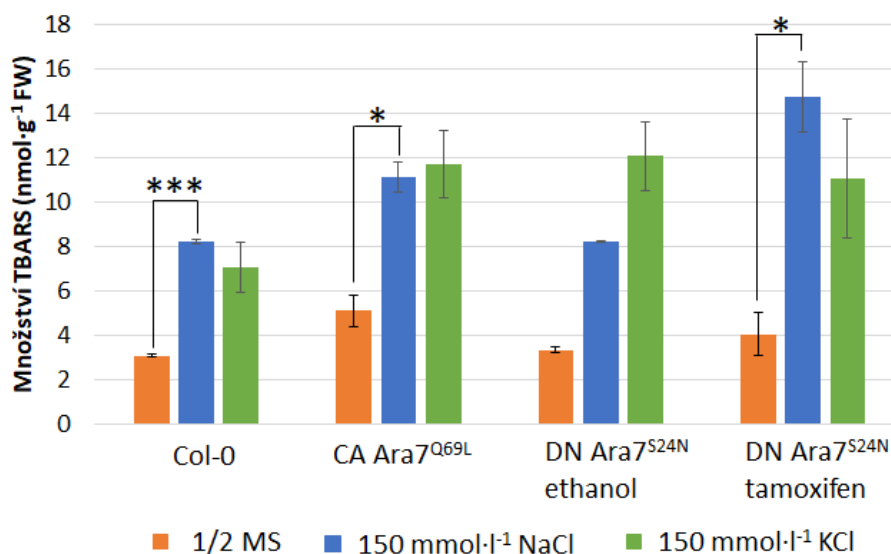
Z výše uvedeného lze usoudit vliv Ara7 na tvorbu nebo spíše odstraňování H_2O_2 při solném stresu. Aktivace Ara7 zvyšuje obsah H_2O_2 výrazněji, než je tomu v případě rostlin s normální funkcí Ara7. Inaktivace Ara7 při účinku 100 mmol·l⁻¹ NaCl snižuje obsah H_2O_2 v porovnání s rostlinami s normální funkcí Ara7, avšak při působení 100 mmol·l⁻¹ KCl tento obsah zvyšuje. Pokud neuvážíme působení solného stresu, lze říci, že porucha funkce Ara7 se projevuje snížením obsahu H_2O_2 (Obr. 19). Nutno poznamenat, že na oxidativním poškození způsobeném solným stresem se kromě H_2O_2 podílejí i další

ROS, které zastávají navíc i signální funkci, neexistuje tedy přímá souvislost mezi obsahem H₂O₂, stupněm oxidativního poškození a odolností zkoumaných linií.

4.2.4 Analýza peroxidace lipidů v liniích s modifikovanou Ara7

Reaktivní formy kyslíku, jejichž produkce je vyvolána solným stresem, způsobují poškození biologických membrán (Cordeiro, 2014). Produkty tohoto poškození vytváří komplex s kyselinou thiobarbiturovou (TBA) a měření jeho absorbance tvoří základ metody použité v této práci pro stanovení peroxidace lipidů. Více k principu a metodě v kapitole 3.2.6.

Nejmenší oxidativní poškození lipidů po účinku solí vykazovaly rostliny Col-0. Nárůst peroxidace lipidů u rostlin Col-0 při účinku 100 mmol·l⁻¹ NaCl je výraznější než u rostlin CA Ara7^{S24N} a DN Ara7^{S24N}, celkové oxidativní poškození lipidů však dosahuje stále nejnižší hodnoty. Oxidativní poškození lipidů rostlin CA Ara7^{Q69L} je v podstatě srovnatelné u obou solí (100 mmol·l⁻¹ NaCl i 100 mmol·l⁻¹ KCl). U rostlin DN Ara7^{S24N} působení 100 mmol·l⁻¹ NaCl vedlo k větší míře peroxidace lipidů než působení 100 mmol·l⁻¹ KCl (Obr. 20).



Obr. 20: Grafické znázornění peroxidace lipidů (obsahu TBARS) u rostlin s modifikovanou Ara7. Rostliny Arabidopsis: ekotyp Col-0, s expresí konstitutivně aktivní Ara7 (CA Ara7^{Q69L}), exprimující dominantně negativní Ara7 (DN Ara7^{S24N}) ethanolová kontrola a po indukci tamoxifenem. Celkové stáří rostlin 14 dnů, růst 5 dnů na ½ MS médiu, poté přenos na nové ½ MS médium (Col-0, CA Ara7^{Q69L}), ½ MS médium s ethanolom nebo tamoxifenem (DN Ara7^{S24N}). Po dvou dnech přenos na solná média (100 mmol·l⁻¹ NaCl, 100 mmol·l⁻¹ KCl) zde růst 7 dnů. Sloupce vyjadřují průměrný obsah TBARS (mg·g⁻¹ FW) (± směrodatná odchylka) ze dvou biologických opakování. Statisticky významné rozdíly jsou označeny hvězdičkou podle hladiny významnosti v testu ANOVA: *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001.

Lze konstatovat, že jak trvalá aktivace, tak i inaktivace Ara7 vede ke zvýšenému poškození lipidů vyvolaného produkcí ROS v solném stresu v porovnání s normální funkcí Ara7. Nejvyšší odolnost vykazovaly rostliny s normální funkcí Ara7. Třeba však zohlednit fakt, že z celkového množství všech molekul potenciálně podléhajících oxidativnímu poškození vyvolanému solným stresem, byla zde pozornost věnována pouze lipidům.

4.3 ÚLOHA ARA7 V REAKCI ANTIOXIDAČNÍCH ENZYMŮ NA SOLNÝ STRES

Antioxidační enzymy zajišťují svou schopností zneškodnit ROS ochranu buněčných struktur před oxidativním poškozením vyvolaným mj. solným stresem. Díky této vlastnosti jsou častým cílem genetické manipulace využívané pro zvyšování odolnosti rostlin na abiotický stres (Negi *et al.*, 2016). Změny v aktivitě a abundanci superoxiddismutasy (SOD) a katalasy (KAT) v liniích DN Ara7^{S24N} v podmínkách solného stresu byl zkoumán v této práci. Realizaci experimentů pro analýzu aktivity SOD a KAT popisuje kapitola 3.2.8, provedení analýzy abundance pak kapitola 3.2.9.

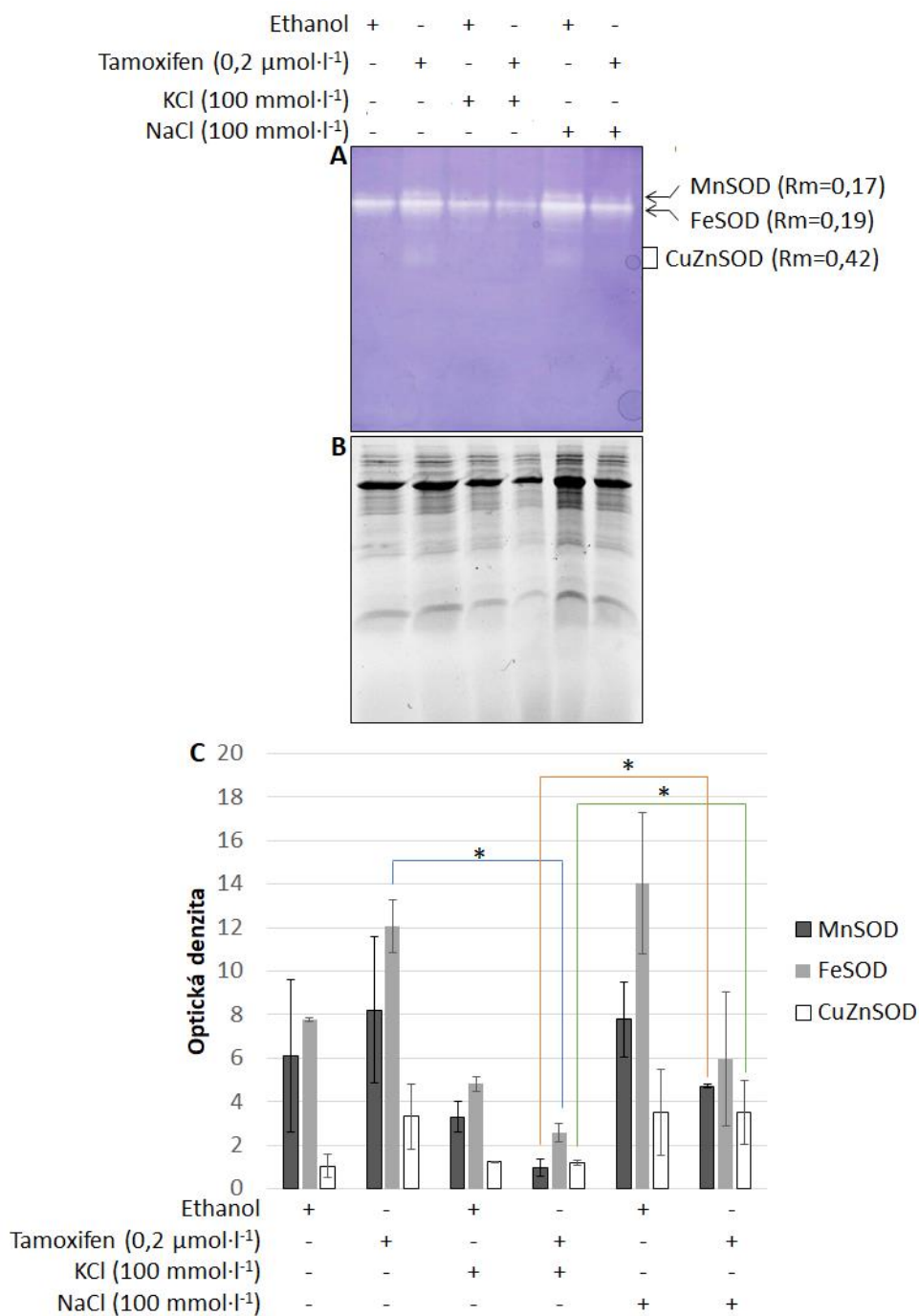
4.3.1 Úloha Ara7 v regulaci aktivity a abundance superoxiddismutasy při solném stresu

Vliv inaktivace Ara7 na aktivitu a abundanci SOD při solném stresu vyjadřují Obr. 21 a 22.

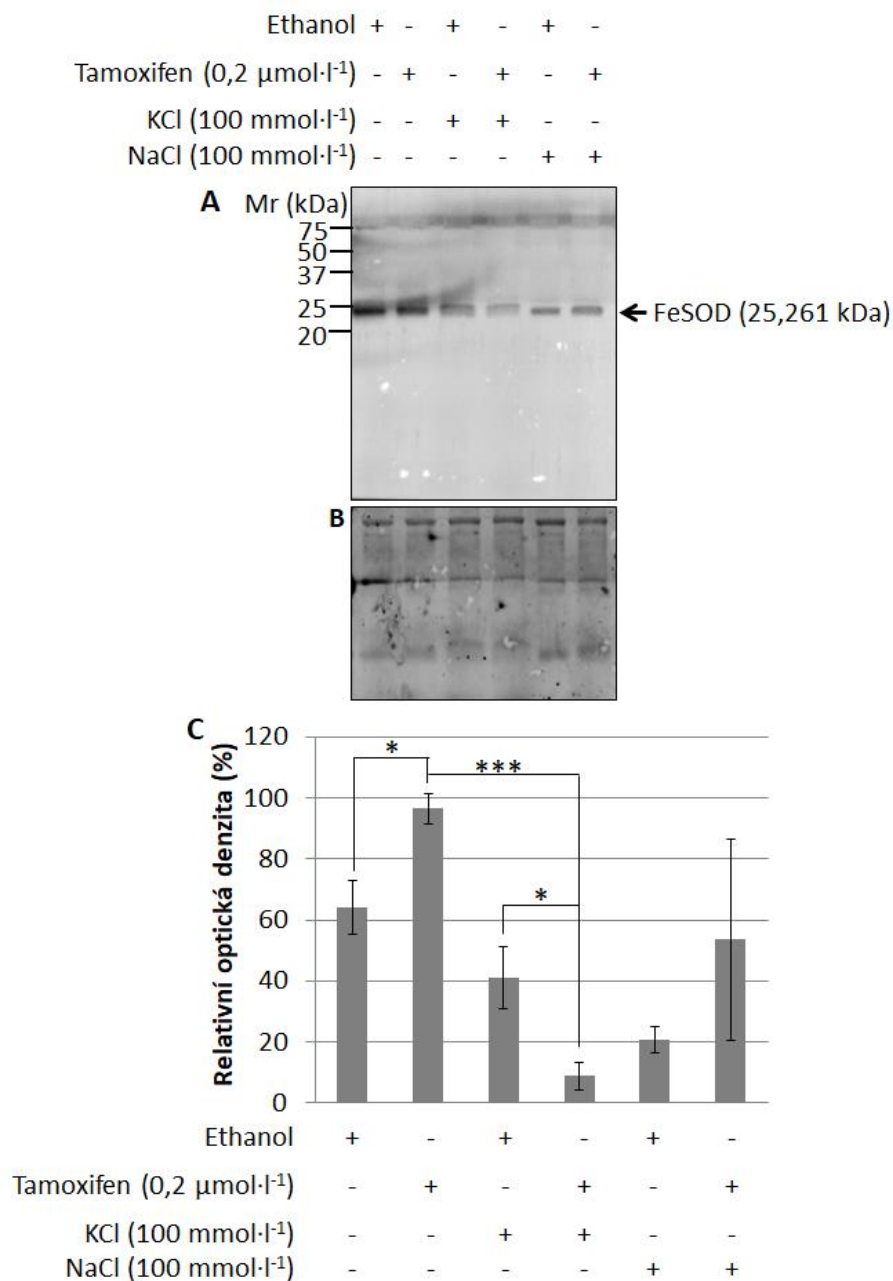
Aktivita SOD u rostlin DN Ara7^{S24N} (po indukci tamoxifenem), na něž nepůsobil solný stres, dosahovala vyšších hodnot než u ethanolové kontroly těchto rostlin, a tento trend byl pozorován u všech isoform SOD (MnSOD, FeSOD i CuZnSOD). Působení 100 mmol·l⁻¹ KCl vyvolalo snížení aktivity všech tří isoform SOD u ethanolové kontroly rostlin DN Ara7^{S24N} i rostlin DN Ara7^{S24N} po indukci tamoxifenem, přičemž snížení aktivit MnSOD a FeSOD u rostlin DN Ara7^{S24N} (po indukci tamoxifenem) dosahovalo větší výraznosti, než tomu bylo u rostlin DN Ara7 ethanolové kontroly. Pokles aktivit CuZnSOD byl však vyrovnaný. Stejná situace, avšak s méně výrazným poklesem, nastala při působení 100 mmol·l⁻¹ NaCl (Obr. 21).

Ke stanovení abundance SOD byla vybrána FeSOD. Byla použita primární protilátka rozeznávající všechny 3 isoformy FeSOD (FeSOD1, FeSOD2 a FeSOD3). Tamoxifenem indukovatelné rostliny DN Ara7^{S24N} obsahovaly v kontrolních podmínkách více FeSOD,

než tomu bylo u ethanolové kontroly rostlin DN Ara7^{S24N}. Účinek 100 mmol·l⁻¹ KCl vedl ke snížení abundance FeSOD u obou zkoumaných případů, u rostlin DN Ara7^{S24N} po indukci tamoxifenem byl tento pokles výraznější. Tyto výsledky jsou v souladu s trendem pozorovaným u aktivit FeSOD. Nesoulad však nastal při působení 100 mmol·l⁻¹ NaCl, kde došlo k poklesu aktivity FeSOD u rostlin DN Ara7^{S24N} po indukci tamoxifenem a nárůstu aktivity FeSOD u ethanolové kontroly, avšak abundance vykazovala přesně opačný trend, tyto rozdíly však nebyly statisticky významné. Nicméně z výsledků lze usuzovat roli Ara7 v regulaci SOD při solném stresu, přičemž její inaktivace vede ke snížení aktivity FeSOD.



Obr. 21: Vizualizace specifické aktivity superoxiddismutasy (SOD) na nativních gelech v rostlinách exprimujících dominantně negativní Ara7 (DN Ara7^{S24N}) ethanolové kontroly a po indukci tamoxifenem (A). Vizualizace proteinů ze vzorků použitých v Obr. A pomocí „Stain free“ technologie (BioRad) (B). Grafické znázornění téhož (C). Celkové stáří rostlin 14 dnů, růst 5 dnů na $\frac{1}{2}$ MS médiu, poté přenos na nové $\frac{1}{2}$ MS médiu, s ethanolem nebo tamoxifenem. Po dvou dnech přenos na solná média (100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl, 100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl) zde růst 7 dnů. Sloupce vyjadřují průměrnou optickou denzitu (\pm směrodatná odchylka) ze dvou biologických opakování. Rm, relativní mobilita (poměr migrační dráhy proteinu k celkové délce elektroforezy). Statisticky významné rozdíly jsou označeny hvězdičkou podle hladiny významnosti v testu ANOVA: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.



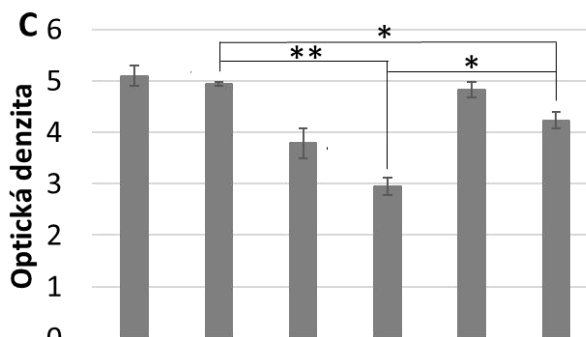
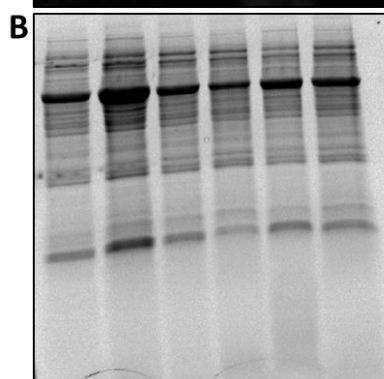
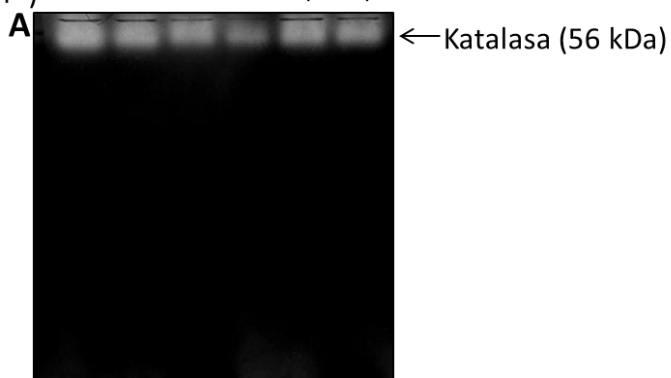
Obr. 22: Abundance FeSOD v rostlinách exprimujících dominantně negativní Ara7 (DN Ara7^{S24N}) ethanolová kontrola a po indukcii tamoxifenem (A). Vizualizace proteinů ze vzorků použitých v Obr. A pomocí „Stain free“ technologie (BioRad) (B). Grafické znázornění téhož (C). Celkové stáří rostlin 14 dnů, růst 5 dnů na ½ MS médiu, poté přenos na nové ½ MS médium s ethanolem nebo tamoxifenem. Po dvou dnech přenos na solná média (100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl, 100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl) zde růst 7 dnů. Sloupce vyjadřují průměrnou relativní optickou denzitu (\pm směrodatná odchylka) ze tří biologických opakování. Statisticky významné rozdíly jsou označeny hvězdičkou podle hladiny významnosti v testu ANOVA: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

4.3.2 Úloha Ara7 v regulaci aktivity a abundance katalasy při solném stresu

Rozdíly v aktivitě katalasy nebyly mezi ethanolovou kontrolou rostlin DN Ara7^{S24N} a těmito rostlinami po indukci tamoxifenem a rostoucími na médiu bez soli signifikantní. Avšak co se týče abundance katalasy, ta byla u rostlin DN Ara7^{S24N} po indukci tamoxifenem vyšší. Působením 100 mmol·l⁻¹ KCl došlo ke snížení aktivit katalasy u obou rostlin DN Ara7^{S24N}, přičemž toto snížení bylo větší u rostlin po indukci tamoxifenem. Výsledky abundance toto pozorování kopírují. Působení 100 mmol·l⁻¹ NaCl vyvolalo pouze nepatrné snížení aktivity katalasy u rostlin DN Ara7^{S24N} ethanolové kontroly, větší bylo u DN Ara7^{S24N} po indukci tamoxifenem. Tyto výsledky nesouhlasí s výsledky získanými měřeními abundance, kde došlo ke zcela opačné situaci, avšak rozdíly nebyly signifikantní (Obr. 23, 24).

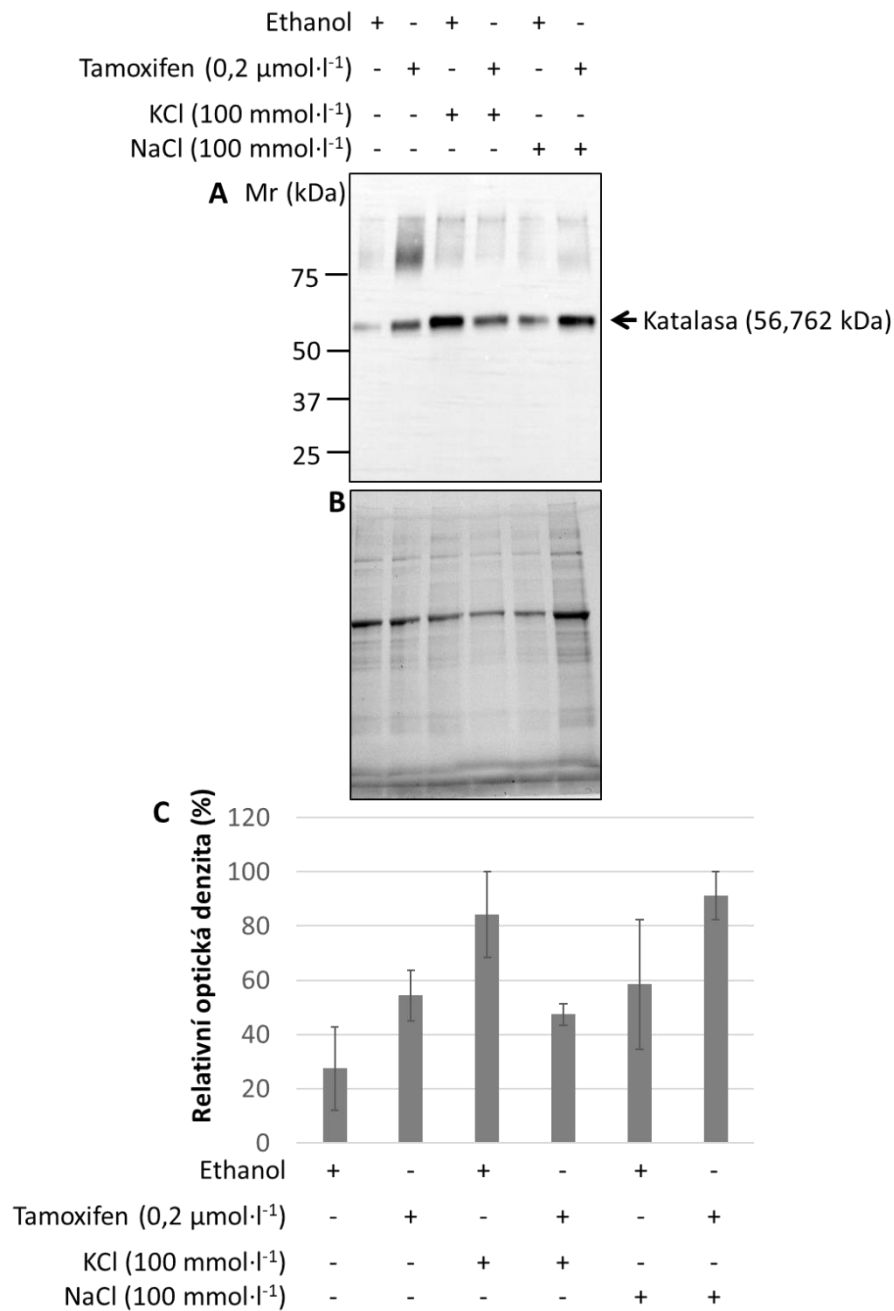
Ze získaných výsledků je možné usuzovat na roli Ara7 v regulaci aktivity katalasy při solném stresu, neboť inaktivace Ara7 aktivitu katalasy výrazněji snižuje, rozdíly však statisticky významné nejsou.

Ethanol	+	-	+	-	+	-
Tamoxifen (0,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	-	+	-	+	-	+
KCl (100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$)	-	-	+	+	-	-
NaCl (100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$)	-	-	-	-	+	+



Ethanol	+	-	+	-	+	-
Tamoxifen (0,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	-	+	-	+	-	+
KCl (100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$)	-	-	+	+	-	-
NaCl (100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$)	-	-	-	-	+	+

Obr. 23: Vizualizace specifické aktivity katalasy (KAT) na nativních gelech v rostlinách exprimujících dominantně negativní Ara7 (DN Ara7^{S24N}), ethanolová kontrola a po indukci tamoxifenem (A). Vizualizace proteinů ze vzorků použitých v Obr. A pomocí „Stain free“ technologie (BioRad) (B). Grafické znázornění téhož (C). Celkové stáří rostlin 14 dnů, růst 5 dnů na ½ MS médiu, poté přenos na nové ½ MS médium s ethanolem nebo tamoxifenem. Po dvou dnech přenos na solná média (100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl, 100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl) zde růst 7 dnů. Sloupce vyjadřují průměrnou optickou denzitu (\pm směrodatná odchylka) ze dvou biologických opakování. Statisticky významné rozdíly jsou označeny hvězdičkou podle hladiny významnosti v testu ANOVA: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.



Obr. 24: Abundance katalasy v rostlinách exprimujících dominantně negativní Ara7 (DN Ara7^{S24N}), ethanolová kontrola a po indukci tamoxifenem (A). Vizualizace proteinů ze vzorků použitých v Obr. A pomocí „Stain free“ technologie (BioRad) (B). Grafické znázornění téhož (C). Celkové stáří rostlin 14 dnů, růst 5 dnů na ½ MS médiu, poté přenos na nové ½ MS médium s ethanolem nebo tamoxifenem. Po dvou dnech přenos na solná média (100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl, 100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl) zde růst 7 dnů. Sloupce vyjadřují průměrnou relativní optickou denzitu (\pm směrodatná odchylka) ze dvou biologických opakování. Statisticky významné rozdíly jsou označeny hvězdičkou podle hladiny významnosti v testu ANOVA: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

5 DISKUZE

Neporušená aktivita Ara7 se zachovanou schopností měnit stav mezi aktivním s navázaným GTP a inaktivním s navázaným GDP, se ukázala jako nezbytná pro správnou morfologii kořenového systému, tj. normální délku primárního kořene, počet a délku postranních kořenů a kořenových vlásků. Lze předpokládat interferenci Ara7 s mechanismy kontrolujícími tyto parametry.

Délku primárního kořene určují dva faktory: rychlost buněčného dělení v meristemické (dělivé) zóně kořene a následná expanze kořenových buněk v elongační (prodlužovací) zóně kořene, definovaná jako nárůst objemu buňky způsobený zvýšením objemu vakuoly za současného zvětšení povrchu buňky (Dolan a Davies, 2004; Bizet *et al.*, 2015). Hlavní postavení při regulaci růstu primárního kořene patří fytohormonu auxinu pracujícímu v součinnosti s jinými fytohormony, z nichž lze zdůraznit cytokininy, ethylen a gibereliny (Fu a Harberd, 2003). Auxin, syntetizován v nadzemní části, proudí floémem do kořenové špičky po koncentračním gradientu (Morris a Thomas, 1978) a maximální koncentrace dosahuje v buňkách tzv. klidového centra (ang. quiescent centre), které stimuluje sousedící buňky meristému k produkci buněk všech kořenových oblastí, tj. kořenové čepičky, epidermis, kortexu, endodermis a cévních svazků (Doerner, 1998; Beemster *et al.*, 2003; Overvoorde *et al.*, 2010). Další transport auxinu, z míst v blízkosti buněk tichého centra, vede buňkami epidermis a kortexu vzhůru k elongační zóně kořene, kde se uplatňuje jako regulátor expanze buněk (Muday a DeLong, 2001; Rahman *et al.*, 2007). Vysoké koncentrace auxinu inhibují elongaci buněk kořene, avšak v nízké koncentraci auxin tuto elongaci podporuje pravděpodobně potlačením inhibice giberelinů, považovaných za hormony přímo stimující elongaci buněk kořene (Okumura *et al.*, 2013; Saini *et al.*, 2013). Nutno poukázat na mechanismus transportu auxinu buňkami kořene směrem k elongační zóně. Nepřítomnost sítkových buněk floému zde vyžaduje membránové transportery, z nichž nejvýznamnější příjem (influx) zajišťující přenašeči se označují jako AUX/LAX proteiny a výdej (efflux) zprostředkující přenašeči jako PIN proteiny (Bennett *et al.*, 1996; Blilou *et al.*, 2005; Ljung *et al.*, 2005). Pro správnou polární distribuci PIN proteinů v plasmatické membráně buňky je nezbytná jejich klathrinem zprostředkovaná endocytosa a následná recyklace z raných endosomů/TGN zpět na plasmatickou membránu (Kitakura *et al.*, 2011; Kleine-Vehn *et al.*, 2011). Za předpokladu, že se Ara7 účastní regulace endocytosy (Ueda *et al.*, 2001), lze spatřit její vliv na délku primárního kořene právě zde. Porucha správné distribuce PIN

proteinů na plasmatické membráně může vést ke snížení transportu auxinu do elongační zóny kořene, nedostatek auxinu zde neumožní potlačení inhibice giberelinů a jejich pozitivní vliv na elongaci kořene.

Distribuci PIN proteinů na plasmatické membráně ovlivňuje další třída rostlinných hormonů, cytokininy, které inhibují endocytosou zprostředkovanou recyklaci PIN proteinů na této membráně a podněcují jejich degradaci ve vakuole. Tímto mechanismem cytokininy regulují distribuci auxinu v kořenech (Marhavý *et al.*, 2014). Cytokininové receptory mohou pravděpodobně cyklovat mezi plasmatickou membránou a endosomy (Dortay *et al.*, 2008), v čemž může hrát roli Ara7. Nadprodukce cytokininů vede ke snížení odolnosti rostlin na solný stres (Wang *et al.*, 2015).

Tvorba dominantně negativní Ara7 (inaktivní s GDP), lokalizovaná difuzně v cytosolu, již byla spojena s inhibicí endocytosy a s výraznou inhibicí růstu primárního kořene (Dhonukshe *et al.*, 2006). Tato studie navíc prokázala poškození tvorby buněčné přepážky v cytokinezi vlivem inhibice endocytosy. Fenotyp zkráceného primárního kořene tak může být přičten i tomuto faktoru, tedy poruše dělení buněk meristému (Dhonukshe *et al.*, 2006). Konstitutivně aktivní Ara7 (s GTP) může snižovat délku primárního kořene podobně, tedy interferencí s transportem auxinu. Za předpokladu, že Ara7 reguluje také transport z MVB do vakuoly, by mohlo docházet k poruše transportu PIN z raných endosomů/TGN do MVB a odtud do vakuoly k degradaci (Kotzer *et al.*, 2004; Kleine-Vehn *et al.*, 2008b; Jia *et al.*, 2013). Porucha transportu PIN proteinů do vakuoly negativně ovlivňuje jejich polární lokalizaci na plasmatické membráně (Inoue *et al.*, 2013).

Vyřazení funkce genu kódujícího VPS9 (GEF pro Rab5) se projevilo také snížením délky primárního kořene, a to až 3x v porovnání s kontrolou, a vznikem abnormální kořenové architektury (Goh *et al.*, 2007). Jmenovaná studie prokázala důležitost Rab5 v těchto procesech: vytvoření nebo udržení polární distribuce PIN proteinů na plasmatické membráně, popř. v lokalizaci PIN proteinů na plasmatickou membránu (v součinnosti s Arf/GNOM systémem), správnou aktivitu kořenového meristému (mutace VPS9 vedla ke snížení jeho aktivity) a elongace buněk kořene (Goh *et al.*, 2007). Neschopnost aktivace Ara7 vedla k otoku kořene způsobeného periklinálním dělením endodermis (Benfey a Scheres, 2000; Inoue *et al.*, 2013). Otok primárního kořene u rostlin s inaktivovanou Ara7 byl pozorován také v této diplomové práci. Správná aktivita Rab5 je nezbytná také pro koncentrování auxinového maxima do tichého centra (Inoue *et al.*, 2013).

Iniciace tvorby postranních kořenů u dvouděložných rostlin je situována do pericyklu a na kontrole všech fází se podílí mnoho mechanismů, z nichž hlavní roli zastává auxin, jehož přítomnost vyvolá degradaci AUX/IAA proteinů inhibujících ARF transkripční faktor nezbytný pro tvorbu postranních kořenů (Fukaki a Tasaka, 2009; Péret *et al.*, 2009; Goh *et al.*, 2012; Stoeckle *et al.*, 2018). Počet postranních kořenů je závislý na koncentraci auxinu (Péret *et al.*, 2009). Znemožněním transportu auxinu způsobeným nesprávnou funkcí Ara7 popsané výše, tak lze vysvětlit úbytek počtu postranních kořenů u rostlin s modifikovanou Ara7, pozorovaný v této diplomové práci.

Nadprodukce cytokininů inhibuje tvorbu postranních kořenů, avšak přesný mechanismu této cytokininové regulace není zcela znám (Laplaze *et al.*, 2007; Stoeckle *et al.*, 2018).

Iniciace a elongace kořenových vlásků z buněk epidermis závisí na auxinu, přičemž rostoucí koncentrace auxinu zvyšuje délku kořenových vlásků (Pitts *et al.*, 1998; Grebe *et al.*, 2002). V buňkách epidermis zajišťují auxinový transport PIN2 proteiny (Petrášek a Friml, 2009). Správná funkce Ara7 je nezbytná pro polární lokalizaci PIN2 a pro jeho transport do vakuol, přičemž transport PIN2 do vakuoly je sám nezbytný pro udržení polární distribuce PIN2 (Inoue *et al.*, 2013). Bylo také zjištěno, že nadexprese PIN2 snižuje délku kořenových vlásků, PIN2 proteiny zde nejspíš způsobují nadměrný výdej auxinu z buněk epidermis do vnějšího prostředí, a tedy snižují obsah auxinu, nezbytného pro elongaci vlásků, v buňkách epidermis (Ganguly *et al.*, 2010). Je možné se domnívat, že stálá aktivita Ara7 by mohla blíže nespecifikovaným způsobem inhibovat degradaci PIN2 proteinů nebo jejich endocytosu, což by vyústilo ve zvýšení množství PIN2 na membráně buněk epidermis a snížení délky kořenových vlásků. Alternativně by nahromadění PIN2 proteinů na membráně mohlo vést ke zvýšenému obsahu auxinu v této oblasti, což by vysvětlovalo rapidní nárůst kořenových vlásků u rostlin se stále inaktivní Ara7.

5.1 ROLE ARA7 V TOLERANCI K SOLNÉMU STRESU

Typická reakce rostlin na solný stres zahrnuje snížení délky primárního kořene (Potters *et al.*, 2007; Bernstein *et al.*, 2010) a změny kořenové architektury (Julkowska *et al.*, 2014). Pokles elongace kořene vyvolaný solí je nejčastěji dáván do souvislosti s poklesem expanze buněk v elongační zóně (Bustos *et al.*, 2008) a s inhibicí buněčného cyklu v kořenovém meristému vedoucí k menší buněčné produkci a zkrácení délky meristému (West *et al.*, 2004).

Jedním z mechanismů vedoucích k ochraně buňky před vysokou cytoplasmatickou koncentrací Na^+ je oddělení Na^+ do vakuoly pomocí tonoplastových a endosomálních Na^+/H^+ antiporterů z rodiny NHX (Chinnusamy *et al.*, 2005). Tyto transportery také regulují vesikulární transport kontrolou endosomálního pH (Bassil *et al.*, 2012). Solný stres vede ke zvýšení exprese NHX transporterů a ty následně zvyšují odolnost na solný stres (Popova a Gollmack, 2007). Mutace genu kódujícího protein VAM3/SYP22 (Q-SNARE regulující transport mezi MVB a vakuolou) způsobující jeho vyřazení z činnosti se projevila ve zvýšení: odolnosti rostlin na solný stres a abundance NHX transporterů v kořenech, avšak ve snížení této abundance v nadzemní části. Také obsah Na^+ narostl u tohoto mutantu v kořenech, ale poklesl v nadzemní části, díky čemuž se tyto rostliny jeví jako tolerantnější na solný stres (Hamaji *et al.*, 2009). Narušení funkce Ara7, která také reguluje vakuolární transport, by mohlo vykazovat podobné vlivy na lokalizaci NHX. Úloha Ara7 může být spatřena také v regulaci splývání malých vesikul obsahujících Na^+ s vakuolou, které bylo pozorováno při solném stresu (Hamaji *et al.*, 2009).

5.1.1 Ara7 v regulaci růstu primárních kořenů

Solným stresem vyvolaná inhibice průměrného růstu primárního kořene prohlubující se s koncentrací NaCl byl, mimo předkládanou práci, pozorován také v jiných studiích u *Arabidopsis* (Zolla *et al.*, 2010; Meng *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2016) a kukuřice (Li *et al.*, 2014). Shi *et al.* (2002b) prokázali, v souladu s výsledky v této diplomové práci, stejný pokles v závislosti na koncentraci u KCl s větším inhibičním vlivem než NaCl (Shi *et al.*, 2002b). Za přirozených podmínek je právě NaCl a jeho akumulace v půdě hlavní příčinou solného stresu. Z tohoto důvodu mohlo u rostlin dojít k vývoji adaptačních mechanismů vedoucích ke schopnosti lépe tolerovat NaCl než s KCl (Ramos *et al.*, 2004; Affenzeller *et al.*, 2009). Mechanismy reakce rostlin na obě soli jsou zřejmě odlišné. Lucini *et al.* (2016) pozorovali snížení biomasy a obsahu makroprvků i mikroprvků (Ca, Mg, Mn, B, Zn) při solném stresu, který byl vyvolán nadbytkem KCl. Tento stres narušil také hormonální rovnováhu auxinu, brassinosteroidů a giberelinů (zvýšil akumulaci GA, auxinu) (Lucini *et al.*, 2016).

Narušení růstu primárního kořene při solném stresu může být způsobeno poruchou transportu auxinu. Již byly prokázány poruchy polarizované lokalizace auxinových transporterů AUX1, PIN1 a PIN2 na plasmatické membráně vyvolané solným stresem, který vede k disociaci PIN1 z této membrány a lokalizuje jej difuzně do cytoplasmy,

snižuje expresi PIN2 a znemožňuje jeho asociaci s plasmatickou membránou buněk kortexu a, v menší míře, také buněk epidermis. Takto je ovlivněno působení auxinu na kořenový meristém a elongační zónu (Chávez-Avilés *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2016). Za zmínku stojí také studie spojující narušení lokalizace PIN proteinů při solném stresu s distribucí ROS (Tsukagoshi *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2016). Produkce ROS vyvolává zvýšení redoxního potenciálu (posun ke kladnějším hodnotám) v kořenu a je nejspíše nutná k aktivaci obranných procesů v prvních hodinách působení solného stresu. Nárůst redoxního potenciálu meristemické zóny kořene je spojen se snížením četnosti mitosy, což vede ke snížení délky primárního kořene, a navíc kolísáním redoxního potenciálu dochází ke spojení signalizace pomocí ROS s regulací buněčného cyklu a diferenciaci (Fehér *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2016).

Aplikace NaCl (v koncentraci $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) a KCl (v koncentraci 50 a $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) vedla k mírné nápravě inhibičního efektu inaktivní Ara7 na elongaci primárního kořene v této práci. Stálá inaktivace Ara7 inhibuje endocytosu (Dhonukshe *et al.*, 2006). Při solném stresu však dochází ke zvýšení endocytosy, které má pravděpodobně funkci v internalizaci sodných transporterů, popř. aquaporinů, pro zamezení příjmu Na^+ a ztrátě vody. Endocytosa NADPH oxidasy vyskytující se na plasmatické membráně vede k tvorbě ROS uvnitř vzniklého vesikulu, a tyto ROS nejspíše fungují jako signální molekuly nezbytné pro aktivaci odpovědi na solný stres a zajištění tolerance (Leshem *et al.*, 2007; Hao *et al.*, 2014; Baral *et al.*, 2015). Osud vesikul přijatých endocytosou při solném stresu není zcela znám, většina z nich však skončí ve vakuole nebo je recyklována zpět na plasmatickou membránu (Baral *et al.*, 2015). Inhibice endocytosy navíc vede ke zvýšené citlivosti rostlin na solný stres (Golani *et al.*, 2013). Inhibice endocytosy vyvolaná stálou inaktivací Ara7 by se tak měla také projevit sníženou tolerancí na solný stres. V předkládané práci skutečně vykazovaly nejmenší délku primárního kořene rostliny se stále inaktivní Ara7, avšak stimulace nárůstu primárního kořene byla vyvolána právě účinkem solí. Existuje několik možných vysvětlení pro tento efekt: 1) inhibice endocytosy může narušit internalizaci membránové NADPH oxidasy, čímž nedojde k výraznému nárůstu redoxního potenciálu kořene a k následné inhibici jeho nárůstu, 2) pokud solný stres vede k rapidnímu zvýšení endocytosy, může být endocytosa intenzivnější než u nestresovaných rostlin, a tedy vliv inhibice endocytosy způsobený inaktivní Ara7 může být při solném stresu mírně potlačen, 3) inhibice endocytosy popř. alterace některých kroků vesikulárního transportu může potlačovat rozsáhlost narušení lokalizace auxinových transporterů při solném stresu, 4) inhibice endocytosy může,

neznámým mechanismem, snížit příjem NaCl a KCl do cytoplasmy. Poslední hypotézu však popírá studie, v níž byla pozorována zvýšená tolerance rostlin na solný stres při zvýšení endocytosy, neboť tyto rostliny lépe uzavíraly NaCl do vakuoly (Mazel *et al.*, 2004). Jiná z třídy Rab5 GTPas, Ara6, při solném stresu dramaticky mění svou lokalizaci na plasmatickou membránu, kde nejspíše zastává své funkce při solném stresu právě ovlivněním endocytosy (Ebine *et al.*, 2011).

5.1.2 Ara7 v regulaci růstu postranních kořenů

Výsledky mnoha studií potvrzují v této práci pozorované snížení počtu postranních kořenů při solném stresu u divého typu *Arabidopsis* při vyšších koncentracích solí, a naopak stimulaci tvorby těchto kořenů při nižších koncentracích NaCl (kolem $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) (Zolla *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2011; Duan *et al.*, 2013). Inhibice iniciace tvorby postranních kořenů nejspíš opět odráží narušení auxinového transportu.

Iniace i elongace postranních kořenů při mírném solném stresu je regulována proteinem SOS3, který stimuluje produkci auxinu a jeho transport do kořenů, dále ovlivňuje aktivitu PIN1 a PIN2 proteinů (Zhao *et al.*, 2011). Intenzivní solný stres zase zvyšuje produkci ABA, jejíž účinek vyvolává snížení počtu primárních kořenů (Achard *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2014) a bylo zjištěno, že při solném stresu ABA reguluje růst postranních kořenů, avšak nemá vliv na primární (Duan *et al.*, 2013).

Ve zvýšení počtu postranních kořenů účinkem NaCl i KCl v obou koncentracích u rostlin se stále inaktivovanou Ara7 mohou hrát roli podobné mechanismy jako ve zvýšení nárůstu primárního kořene u těchto rostlin, viz předchozí kapitola.

5.1.3 Ara7 v regulaci reaktivních forem kyslíku a antioxidačních enzymů

Aby mohly rostliny využívat H_2O_2 jako signální molekulu, je třeba zachovat jeho hladinu nízkou, a tedy netoxickou, je nutno přesně regulovat rovnováhu mezi jeho produkcí a odstraňováním. Produkce ROS je jednou z prvních odpovědí organismu na stresové podmínky (Halliwell, 2006; Gill a Tuteja, 2010). H_2O_2 je rostlinami využíván k aktivaci mnoha genů důležitých pro toleranci na abiotický stres (Hossain *et al.*, 2015).

V této práci inaktivace Ara7 snižovala při solném stresu, vyvolanému účinkem NaCl, obsah H_2O_2 v rostlinách. Jednu z cest interference endocytosy s produkcí H_2O_2 lze vidět v internalizaci NADPH oxidasy (Baral *et al.*, 2015). ROS mohou být produkovány také

peroxisomy nebo v apoplastu funkcí peroxidas (Minibayeva *et al.*, 2015; Del Río a López-Huertas, 2016).

Produkce H₂O₂, resp. ROS při solném stresu slouží jako signál pro zajištění exprese genů sloužících k ochraně před tímto stresem, mezi něž patří geny pro antioxidantní enzymy (Niu a Liao, 2016). Vyvození přímé souvislosti mezi obsahem H₂O₂ a aktivitou antioxidantních enzymů není zcela možné, je třeba uvážit komplikovanost a zapojení ostatních ROS a antioxidantních enzymů. U rostlin s inaktivní Ara7 bylo také zaznamenáno největší poškození membrán vyvolané účinkem NaCl a zároveň nejmenší obsah H₂O₂, nelze přímo určit, zda se H₂O₂ zde nespotřeboval při tomto poškození.

Změna aktivity a abundance antioxidantních enzymů při solném stresu závisí na koncentraci soli, koncentraci H₂O₂, době expozice a také na orgánu rostliny. Exogenní aplikace H₂O₂ u rostlin bavlny stimuluje expresi a aktivitu SOD pouze do určité koncentrace (do 1 mmol·l⁻¹), poté je již inhibuje, naopak u KAT dochází ke zvýšení aktivity až při vyšších koncentracích H₂O₂ (Wang *et al.*, 2016). U rostliny *Brassica oleracea* klesá aktivita SOD v dolní části kořene při aplikaci 80 mmol·l⁻¹ NaCl, avšak narůstá v horní části kořene při stejné koncentraci NaCl. Aktivita KAT klesá v obou zónách kořene H₂O₂ byl akumulován při solném stres v kořenech *Brassica oleracea* (Hernandez *et al.*, 2010) v kořenech rýže (Tsai *et al.*, 2004). Některé studie však nezaznamenaly žádnou změnu (Lee *et al.*, 2001) nebo zaznamenaly dokonce snížení obsahu H₂O₂ (Kim *et al.*, 2005). Jiang *et al.* (2007) ve své studii pozorovali efekt soli na SOD u *Arabidopsis* v závislosti na době expozice a kořenové zóně. Krátká expozice vedle k poruše činnosti SOD, ale dlouhá její aktivitu zvýšila (Jiang *et al.*, 2007). V této práci byla aktivita i abundance SOD a KAT měřena v celých rostlinách, v čemž může spočívat nesoulad mezi aktivitami těchto enzymů a jejich abundancí.

V mnoha případech bylo předpokládáno, že tolerance na solný stres je závislá na aktivitě antioxidantních enzymů, ale tato souvislost není vždy splněna, nekoreluje vždy, protože zvýšená exprese antioxidantních enzymů nezvyšuje vždy toleranci na solný stres (Munns a Tester, 2008).

6 ZÁVĚR

Výzkum provedený v této práci se záměrem zjistit a posoudit vhodnost malé GTPasy Ara7 jako potenciálního cíle genetické manipulace pro zvyšování odolnosti rostlin na solný stres a umožnění jejich vitálního růstu a výnosu i na zasolených půdách, byl realizován v několika krocích.

Na počátku stála fenotypová analýza rostlin s modifikovanou Ara7, která prokázala, že cyklická aktivace a inaktivace Ara7 je nezbytná pro správný růst primárních kořenů, zachování správného počtu a délky postranních kořenů a normální uspořádání kořenových vlásků. Tyto fenotypové znaky mají důležitý agronomický význam, neboť zajišťují ukotvení rostlin v půdě a příjem látek z půdy. Zvláště inaktivace Ara7 je potenciálně zajímavá pro biotechnologické aplikace, neboť vyvolává rapidní produkci kořenových vlásků.

Fenotypové analýzy rostlin s modifikovanou Ara7 na toleranci k solnému stresu ukázaly, že je Ara7 důležitým proteinem pro reakci rostlin na zasolení a rostliny se schopností udržování cyklické aktivace a inaktivace Ara7 vykazují nejmenší defekty způsobené solným stresem, pokud uvažujeme délku primárního kořene a počet a délku postranních kořenů a obsah chlorofylu. Inaktivace Ara7 by potenciálně mohla, na základě výsledků v této práci, zvyšovat toleranci rostlin na stres způsobený KCl, je ovšem třeba dalších výzkumů po potvrzení této hypotézy.

Další výzkum v této práci, zaměřený na detekci ROS, oxidativního poškození a antioxidantních enzymů při solném stresu, naznačil, že by Ara7 mohla být zapojena i v regulaci těchto procesů, avšak pro potvrzení této hypotézy je potřeba dalšího výzkumu zaměřeného na detekci ostatních forem ROS (např. superoxidového radikálu, využití histochemických metod k pozorování produkce ROS následkem solného stresu), antioxidantních enzymů (např. peroxidasy) popř. antioxidantních molekul, výzkum zaměřený na NADPH oxidasu a oxidativní poškození dalších buněčných struktur v rostlinách vystavených solnému stresu.

7 LITERATURA

- Aebi H. (1984): Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* **105**, 121–126.
- Affenzeller M. J., Darehshouri A., Andosch A., Lütz C., Lütz-Meindl U. (2009): Salt stress-induced cell death in the unicellular green alga *Micrasterias denticulata*. *Journal of Experimental Botany* **60**, 939–954.
- Achard P., Cheng H., De Grauwe L., Decat J., Schoutteten H., Moritz T., Van Der Straeten D., Peng J., Harberd N. P. (2006): Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science* **311**, 91–94.
- Alscher R. G., Erturk N., Heath L. S. (2002): Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1331–1341.
- Apel K., Hirt H. (2004): Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* **55**, 373–399.
- Araki S., Kaibuchi K., Sasaki T., Hata Y., Takai Y. (1991): Role of the C-terminal region of smg p25A in its interaction with membranes and the GDP/GTP exchange protein. *Molecular and Cellular Biology* **11**, 1438–1447.
- Asaoka R., Uemura T., Nishida S., Fujiwara T., Ueda T., Nakano A. (2013): New insights into the role of Arabidopsis RABA1 GTPases in salinity stress tolerance. *Plant Signaling & Behavior* **8**, e25377. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/psb.25377>
- Assani A., Moundanga S., Beney L., Gervais P. (2009): Vesicle formation in the membrane of onion cells (*Allium cepa*) during rapid osmotic dehydration. *Annals of Botany* **104**, 1389–1395.
- Baral A., Irani N. G., Fujimoto M., Nakano A., Mayor S., Mathew M. K. (2015): Salt-induced remodeling of spatially restricted clathrin-independent endocytic pathways in Arabidopsis root. *The Plant Cell* **27**, 1297–1315.
- Barr F. A. (2013): Rab GTPases and membrane identity: causal or inconsequential? *Journal of Cell Biology* **202**, 191–199.
- Bassil E., Coku A., Blumwald E. (2012): Cellular ion homeostasis: emerging roles of intracellular NHX Na⁺/H⁺ antiporters in plant growth and development. *Journal of Experimental Botany* **63**, 5727–5740.
- Batelli G., Verslues P. E., Agius F., Qiu Q., Fujii H., Pan S., Schumaker K. S., Grillo S., Zhu J. K. (2007): SOS2 promotes salt tolerance in part by interacting with the vacuolar H⁺-ATPase and upregulating its transport activity. *Molecular and Cellular Biology* **27**, 7781–7790.
- Baxter A., Mittler R., Suzuki N. (2014): ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of Experimental Botany* **65**, 1229–1240.
- Baxter-Burrell A., Yang Z., Springer P. S., Bailey-Serres J. (2002): RopGAP4-dependent Rop GTPase rheostat control of Arabidopsis oxygen deprivation tolerance. *Science* **296**, 2026–2028.
- Beauchamp C., Fridovich I. (1971): Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* **44**, 276–287.
- Beemster G. T. S., Fiorani F., Inzé D. (2003): Cell cycle: the key to plant growth control? *Trends in Plant Science* **8**, 154–158.
- Benfey P. N., Scheres B. (2000): Root development. *Current biology* **10**, 813–815.
- Bennett M. J., Marchant A., Green H. G., May S. T., Ward S. P., Millner P. A., Walker A. R., Schulz B., Feldmann K. A. (1996): Arabidopsis AUX1 gene: A permease-like regulator of Root gravitropism. *Science* **273**, 948–950.
- Bernstein N., Shores M., Xu Y., Huang B. (2010): Involvement of the plant antioxidative response in the differential growth sensitivity to salinity of leaves vs roots during cell development. *Free Radical Biology & Medicine* **49**, 1161–1171.
- Bizet F., Hummel I., Bogeat-Triboulot M. B. (2015): Length and activity of the root apical meristem revealed in vivo by infrared imaging. *Journal of Experimental Botany* **66**, 1387–1395.
- Blilou I., Xu J., Wildwater M., Willemsen V., Paponov I., Friml J., Heidstra R., Aida M., Palme K., Scheres B. (2005): The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots. *Nature* **433**, 39–44.
- Blumwald E. (2000): Sodium transport and salt tolerance in plants. *Current Opinion in Cell Biology* **12**, 431–434.

- Bolte S., Brown S., Satiat-Jeunemaitre B. (2004): The N-myristoylated Rab-GTPase m-Rabmc is involved in post-Golgi trafficking events to the lytic vacuole in plant cells. *Journal of Cell Science* **117**, 943–954.
- Bolte S., Schiene K., Dietz K. J. (2000): Characterization of a small GTP-binding protein of the rab 5 family in *Mesembryanthemum crystallinum* with increased level of expression during early salt stress. *Plant Molecular Biology* **42**, 923–936.
- Bonifacino J. S., Glick B. S. (2004): The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* **116**, 153–166.
- Bottanelli F., Gershlick D. C., Denecke J. (2012): Evidence for sequential action of Rab5 and Rab7 GTPases in prevacuolar organelle partitioning. *Traffic* **13**, 338–354.
- Bourne H. R., Sanders D. A., McCormick F. (1991): The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* **349**, 117–127.
- Bradford M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248–254.
- Brandizzi F., Barlowe C. (2013): Organization of the ER-Golgi interface for membrane traffic control. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **14**, 382–392.
- Bustos D., Lascano R., Villasuso A. L., Machado E., Senn M. E., Córdoba A., Taleisnik E. (2008): Reductions in raize Root-tip elongation by salt and osmotic stress do not correlate with apoplastic O₂^{•-} levels. *Annals of Botany* **102**, 551–559.
- Carden D. E., Walker D. J., Flowers T. J., Miller A. J. (2003): Single-cell measurements of the contributions of cytosolic Na⁺ and K⁺ to salt tolerance. *Plant Physiology* **131**, 676–683.
- Carroll K. S., Hanna J., Simon I., Krise J., Barbero P., Pfeffer S. R. (2001): Role of Rab9 GTPase in facilitating receptor recruitment by TIP47. *Science* **292**, 1373–1376.
- Cevher-Keskin B. (2013): ARF1 and SAR1 GTPases in endomembrane trafficking in plants. *International Journal of Molecular Sciences* **14**, 18181–18199.
- Cipriano D. J., Jung J., Vivona S., Fenn T. D., Brunger A. T., Bryant Z. (2013): Processive ATP-driven substrate disassembly by the N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) molecular machine. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 23436–23445.
- Collins R. N. (2003): “Getting it on”--GDI displacement and small GTPase membrane recruitment. *Molecular Cell* **12**, 1064–1066.
- Cordeiro R. M. (2014): Reactive oxygen species at phospholipid bilayers: Distribution, mobility and permeation. *Biochimica et Biophysica Acta* **1838**, 438–444.
- Cox A. D., Der C. J. (2010): Ras history: The saga continues. *Small GTPases* **1**, 2–27.
- Craddock C., Lavagi I., Yang Z. (2012): New insights into Rho signaling from plant ROP/Rac GTPases. *Trends in Cell Biology* **22**, 492–501.
- Cremona O., Di Paolo G., Wenk M. R., Lüthi A., Kim W. T., Takei K., Daniell L., Nemoto Y., Shears S. B., Flavell R. A., McCormick D. A., De Camilli P. (1999): Essential role of phosphoinositide metabolism in synaptic vesicle recycling. *Cell* **99**, 179–188.
- Cui Y., Shen J., Gao C., Zhuang X., Wang J., Jiang L. (2016): Biogenesis of plant prevacuolar multivesicular bodies. *Molecular Plant* **9**, 774–786.
- Davenport R. J., Tester M. (2000): A weakly voltage-dependent, nonselective cation channel mediates toxic sodium influx in wheat. *Plant Physiology* **122**, 823–834.
- de Nadal E., Alepuz P. M., Posas F. (2002): Dealing with osmotic stress through MAP kinase activation. *EMBO Reports* **3**, 735–740.
- de Oliveira A. B., Alencar N. L. M., Gomes-Filho E. (2013): Comparison between the water and salt stress effects on plant growth and development. In: *Responses of organisms to water stress*. (Akinci S., ed.), InTech, London, United Kingdom, 67–94.
- Deeken R., Geiger D., Fromm J., Koroleva O., Ache P., Langenfeld-Heyser R., Sauer N., May S. T., Hedrich R. (2002): Loss of the AKT2/3 potassium channel affects sugar loading into the phloem of *Arabidopsis*. *Planta* **216**, 334–344.
- Del Conte-Zerial P., Bruschi L., Rink J. C., Collinet C., Kalaidzidis Y., Zerial M., Deutsch A. (2008): Membrane identity and GTPase cascades regulated by toggle and cut-out switches. *Molecular Systems Biology* **4**, 206.
- Del Río L. A., López-Huertas E. (2016): ROS generation in peroxisomes and its role in cell signaling. *Plant & Cell Physiology* **57**, 1364–1376.

- Delevoye C., Goud, B. (2015): Rab GTPases and kinesin motors in endosomal trafficking. *Methods in cell biology* **130**, 235–246.
- Demidchik V., Tester M. (2002): Sodium fluxes through nonselective cation channels in the plasma membrane of protoplasts from Arabidopsis roots. *Plant Physiology* **128**, 379–387.
- Dhonukshe P., Baluska F., Schlicht M., Hlavacka A., Samaj J., Friml J., Gadella T. W. J. (2006): Endocytosis of cell surface material mediates cell plate formation during plant cytokinesis. *Developmental Cell* **10**, 137–150.
- Dietz K. J., Tavakoli N., Kluge C., Mimura T., Sharma S. S., Harris G. C., Chardonnens A. N., Golldack D. (2001): Significance of the V-type ATPase for the adaptation to stressful growth conditions and its regulation on the molecular and biochemical level. *Journal of Experimental Botany* **52**, 1969–1980.
- Ding Y., Robinson D. G., Jiang L. (2014): Unconventional protein secretion (UPS) pathways in plants. *Current Opinion in Cell Biology* **29**, 107–115.
- Doerner P. (1998) Root development: Quiescent center not so mute after all. *Current Biology* **8**, 42–44.
- Dolan L., Davies J. (2004): Cell expansion in roots. *Current Opinion in Plant Biology* **7**, 33–39.
- Dortay H., Gruhn N., Pfeifer A., Schwerdtner M., Schmülling T., Heyl A. (2008): Toward an interaction map of the two-component signaling pathway of Arabidopsis thaliana. *Journal of Proteome Research* **7**, 3649–3660.
- Downward J. (2003): Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nature Reviews. Cancer* **3**, 11–22.
- Duan L., Dietrich D., Ng C. H., Chan P. M. Y., Bhalerao R., Bennett M. J., Dinneny J. R. (2013): Endodermal ABA signaling promotes lateral root quiescence during salt stress in Arabidopsis seedlings. *The Plant Cell* **25**, 324–341.
- Dunn B., Stearns T., Botstein D. (1993): Specificity domains distinguish the Ras-related GTPases Ypt1 and Sec4. *Nature* **362**, 563–565.
- Ebine K., Fujimoto M., Okatani Y., Nishiyama T., Goh T., Ito E., Dainobu T., Nishitani A., Uemura T., Sato M. H., Thordal-Christensen H., Tsutsumi N., Nakano A., Ueda T. (2011): A membrane trafficking pathway regulated by the plant-specific RAB GTPase ARA6. *Nature Cell Biology* **13**, 853–859.
- Ebine K., Inoue T., Ito J., Ito E., Uemura T., Goh T., Abe H., Sato K., Nakano A., Ueda T. (2014): Plant vacuolar trafficking occurs through distinctly regulated pathways. *Current biology* **24**, 1375–1382.
- Ebine K., Miyakawa N., Fujimoto M., Uemura T., Nakano A., Ueda T. (2012): Endosomal trafficking pathway regulated by ARA6, a RAB5 GTPase unique to plants. *Small GTPases* **3**, 23–27.
- Fan L., Li R., Pan J., Ding Z., Lin J. (2015): Endocytosis and its regulation in plants. *Trends in Plant Science* **20**, 388–397.
- FAO (2009): How to feed the world in 2050. Economic and Social Development, Food and Agriculture organization of the United Nations, Rome, Italy, 35 stran.
- Fehér A., Otvös K., Pasternak T. P., Szandtner A. P. (2008): The involvement of reactive oxygen species (ROS) in the cell cycle activation (G(0)-to-G(1) transition) of plant cells. *Plant Signaling & Behavior* **3**, 823–826.
- Fernández-Medarde A., Santos E. (2011): Ras in cancer and developmental diseases. *Genes & Cancer* **2**, 344–358.
- Flowers T. J. (2004): Improving crop salt tolerance. *Journal of Experimental Botany* **55**, 307–319.
- Flowers T. J., Colmer T. D. (2008): Salinity tolerance in halophytes. *The New Phytologist* **179**, 945–963.
- Foyer C. H., Ruban A. V., Nixon P. J. (2017): Photosynthesis solutions to enhance productivity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **372**, 20160374. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5566875/>
- Fritz R. D., Pertz O. (2016): The dynamics of spatio-temporal Rho GTPase signaling: formation of signaling patterns. *F1000Research* **5**, F1000 Faculty Rev-749. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4847568/>

- Frugoli J. A., Zhong H. H., Nuccio M. L., McCourt P., McPeck M. A., Thomas T. L., McClung C. R. (1996): Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiology* **112**, 327–336.
- Fu X., Harberd N. P. (2003): Auxin promotes *Arabidopsis* root growth by modulating gibberellin response. *Nature* **421**, 740–743.
- Fu Y., Wu G., Yang Z. (2001): Rop GTPase-dependent dynamics of tip-localized F-actin controls tip growth in pollen tubes. *The Journal of Cell Biology* **152**, 1019–1032.
- Fukaki H., Tasaka M. (2009): Hormone interactions during lateral root formation. *Plant Molecular Biology* **69**, 437–449.
- Fukuda M., Kanno E., Ishibashi K., Itoh T. (2008): Large scale screening for novel rab effectors reveals unexpected broad Rab binding specificity. *Molecular & cellular proteomics* **6**, 1031–1042.
- Ganguly A., Lee S. H., Cho M., Lee O. R., Yoo H., Cho H. T. (2010): Differential auxin-transporting activities of PIN-FORMED proteins in *Arabidopsis* root hair cells. *Plant Physiology* **153**, 1046–1061.
- Garg N., Manchanda G. (2009): ROS generation in plants: Boon or bane? *Plant Biosystems* **143**, 81–96.
- Geldner N., Anders N., Wolters H., Keicher J., Kornberger W., Muller P., Delbarre A., Ueda T., Nakano A., Jürgens G. (2003): The *Arabidopsis* GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth. *Cell* **112**, 219–230.
- George S., Parida A. (2011): Over-expression of a Rab family GTPase from phreatophyte *Prosopis juliflora* confers tolerance to salt stress on transgenic tobacco. *Molecular Biology Reports* **38**, 1669–1674.
- Gill S. S., Tuteja N. (2010): Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry* **48**, 909–930.
- Goh T., Kasahara H., Mimura T., Kamiya Y., Fukaki H. (2012): Multiple AUX/IAA–ARF modules regulate lateral root formation: the role of *Arabidopsis* SHY2/IAA3-mediated auxin signalling. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **367**, 1461–1468.
- Goh T., Uchida W., Arakawa S., Ito E., Dainobu T., Ebine K., Takeuchi M., Sato K., Ueda T., Nakano A. (2007): VPS9a, the common activator for two distinct types of Rab5 GTPases, is essential for the development of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* **19**, 3504–3515.
- Golani Y., Kaye Y., Gilhar O., Ercetin M., Gillaspay G., Levine A. (2013): Inositol polyphosphate phosphatidylinositol 5-phosphatase9 (At5ptase9) controls plant salt tolerance by regulating endocytosis. *Molecular Plant* **6**, 1781–1794.
- Goldack D., Quigley F., Michalowski C. B., Kamasani U. R., Bohnert H. J. (2003): Salinity stress-tolerant and -sensitive rice (*Oryza sativa* L.) regulate AKT1-type potassium channel transcripts differently. *Plant Molecular Biology* **51**, 71–81.
- Gossett D. R., Millhollon E. P., Lucas M. C., Banks S. W., Marney M. M. (1994): The effects of NaCl on antioxidant enzyme activities in callus tissue of salt-tolerant and salt-sensitive cotton cultivars. *Plant Cell Reports* **13**, 498–503.
- Grebe M., Friml J., Swarup R., Ljung K., Sandberg G., Terlou M., Palme K., Bennett M. J., Scheres B. (2002): Cell polarity signaling in *Arabidopsis* involves a BFA-sensitive auxin influx pathway. *Current biology* **12**, 329–334.
- Grebe M., Xu J., Möbius W., Ueda T., Nakano A., Geuze H. J., Rook M. B., Scheres B. (2003): *Arabidopsis* sterol endocytosis involves actin-mediated trafficking via ARA6-positive early endosomes. *Current biology* **13**, 1378–1387.
- Guo W., Roth D., Walch-Solimena C., Novick P. (1999): The exocyst is an effector for Sec4p, targeting secretory vesicles to sites of exocytosis. *The EMBO journal* **18**, 1071–1080.
- Guo Y., Qiu Q. S., Quintero F. J., Pardo J. M., Ohta M., Zhang C., Schumaker K. S., Zhu J. K. (2004): Transgenic evaluation of activated mutant alleles of SOS2 reveals a critical requirement for its kinase activity and C-terminal regulatory domain for salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* **16**, 435–449.

- Gupta B., Huang B. (2014): Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization. *International Journal of Genomics* **2014**, 701596. <https://www.hindawi.com/journals/ijg/2014/701596/>
- Halfter U., Ishitani M., Zhu J. K. (2000): The Arabidopsis SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 3735–3740.
- Hall A. (1998): Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* **279**, 509–514.
- Halliwell B. (2006): Reactive species and antioxidants. redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology* **141**, 312–322.
- Hamaji K., Nagira M., Yoshida K., Ohnishi M., Oda Y., Uemura T., Goh T., Sato M. H., Morita M. T., Tasaka M., Hasezawa S., Nakano A., Hara-Nishimura I., Maeshima M., Fukaki H., Mimura T. (2009): Dynamic aspects of ion accumulation by vesicle traffic under salt stress in Arabidopsis. *Plant & Cell Physiology* **50**, 2023–2033.
- Han J., Pluhackova K., Böckmann R. A. (2017): The multifaceted role of SNARE proteins in membrane fusion. *Frontiers in physiology* **8**, 5. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2017.00005/full>
- Hanson P. I., Roth R., Morisaki H., Jahn R., Heuser J. E. (1997): Structure and conformational changes in NSF and its membrane receptor complexes visualized by quick-freeze/deep-etch electron microscopy. *Cell* **90**, 523–535.
- Hao H., Fan L., Chen T., Li R., Li X., He Q., Botella M. A., Lin J. (2014): Clathrin and membrane microdomains cooperatively regulate RbohD dynamics and activity in Arabidopsis. *The Plant Cell* **4**, 1729–1745.
- Hasegawa P. M., Bressan R. A., Zhu J. K., Bohnert H. J. (2000): Plant cellular and molecular response to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **51**, 463–499.
- Heider D., Hauke S., Pyka M., Kessler D. (2010): Insights into the classification of small GTPases. *Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry* **3**, 15–24.
- Heo J. B., Rho H. S., Kim S. W., Hwang S. M., Kwon H. J., Nahm M. Y., Bang W. Y., Bahk J. D. (2005): OsGAP1 functions as a positive regulator of OsRab11-mediated TGN to PM or vacuole trafficking. *Plant & Cell Physiology* **46**, 2005–2018.
- Hernandez M., Fernandez-Garcia N., Diaz-Vivancos P., Olmos E. (2010): A different role for hydrogen peroxide and the antioxidative system under short and long salt stress in Brassica oleracea roots. *Journal of Experimental Botany* **61**, 521–535.
- Hetzer M., Gruss O. J., Mattaj J. W. (2002): The Ran GTPase as a marker of chromosome position in spindle formation and nuclear envelope assembly. *Nature Cell Biology* **4**, 177–184.
- Hong W. (2005): SNAREs and traffic. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, **1744**, 120–144.
- Horgan C. P., Hanscom S. R., Jolly R. S., Futter C. E., McCaffrey M. W. (2010): Rab11-FIP3 links the Rab11 GTPase and cytoplasmic dynein to mediate transport to the endosomal-recycling compartment. *Journal of Cell Science* **123**, 181–191.
- Horie T., Hauser F., Schroeder J. I. (2009): HKT transporter-mediated salinity resistance mechanisms in Arabidopsis and monocot crop plants. *Trends in Plant Science* **14**, 660–668.
- Hossain M. A., Bhattacharjee S., Armin S. M., Qian P., Xin W., Li H. Y., Burritt D. J., Fujita M., Tran L. S. P. (2015): Hydrogen peroxide priming modulates abiotic oxidative stress tolerance: insights from ROS detoxification and scavenging. *Frontiers in Plant Science* **6**. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2015.00420/full>
- Housden B. E., Muhar M., Gemberling M., Gersbach C. A., Stainier D. Y. R., Seydoux G., Mohr S. E., Zuber J., Perrimon N. (2017): Loss-of-function genetic tools for animal models: cross-species and cross-platform differences. *Nature Reviews Genetics* **18**, 24–40.
- Huertas R., Olías R., Eljakaoui Z., Gálvez F. J., Li J., de Morales P. A., Belver A., Rodríguez-Rosales M. P. (2012): Overexpression of SISOS2 (SICIPK24) confers salt tolerance to transgenic tomato. *Plant, Cell & Environment* **35**, 1467–1482.
- Hurtado-Lorenzo A., Skinner M., El Annan J., Futai M., Sun-Wada G. H., Bourgoïn S., Casanova J., Wildeman A., Bechoua S., Ausiello D. A., Brown D., Marshansky V. (2006): V-ATPase

- interacts with ARNO and Arf6 in early endosomes and regulates the protein degradative pathway. *Nature Cell Biology* **8**, 124–136.
- Chávez-Avilés M. N., Andrade-Pérez C. L., de la Cruz H. R. (2013): PP2A mediates lateral root development under NaCl-induced osmotic stress throughout auxin redistribution in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Soil* **368**, 591–602.
- Chavrier P., Gorvel J. P., Stelzer E., Simons K., Gruenberg J., Zerial M. (1991): Hypervariable C-terminal domain of rab proteins acts as a targeting signal. *Nature* **353**, 769–772.
- Chen X., Friml J. (2014): Rho GTPase-regulated vesicle trafficking in plant cell polarity. *Biochemical Society Transactions* **42**, 212–218.
- Chen X., Irani N. G., Friml J. (2011): Clathrin-mediated endocytosis: the gateway into plant cells. *Current Opinion in Plant Biology* **14**, 674–682.
- Chen Z., Pottosin I. I., Cuin T. A., Fuglsang A. T., Tester M., Jha D., Zepeda-Jazo I., Zhou M., Palmgren M. G., Newman I. A., Shabala S. (2007): Root plasma membrane transporters controlling K⁺/Na⁺ homeostasis in salt-stressed barley. *Plant Physiology* **145**, 1714–1725.
- Cherfils J., Zeghouf M. (2013): Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiological Reviews* **93**, 269–309.
- Chinnusamy V., Jagendorf A., Zhu J. K. (2005): Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Science* **45**, 437–448.
- Christoforidis S., Miaczynska M., Ashman K., Wilm M., Zhao L., Yip S. C., Waterfield M. D., Backer J. M., Zerial M. (1999): Phosphatidylinositol-3-OH kinases are Rab5 effectors. *Nature Cell Biology* **1**, 249–252.
- Inoue T., Kondo Y., Naramoto S., Nakano A., Ueda T. (2013): RAB5 activation is required for multiple steps in *Arabidopsis thaliana* root development. *Plant & Cell Physiology* **54**, 1648–1659.
- Jaffe A. B., Hall A. (2005): Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **21**, 247–269.
- Jahn R., Scheller R. H. (2006): SNAREs—engines for membrane fusion. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **7**, 631–643.
- Jean S., Kiger A. A. (2012): Coordination between RAB GTPase and phosphoinositide regulation and functions. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **13**, 463–470.
- Ji H., Pardo J. M., Batelli G., Van Oosten M. J., Bressan R. A., Li X. (2013): The Salt Overly Sensitive (SOS) pathway: established and emerging roles. *Molecular Plant* **6**, 275–286.
- Jia T., Gao C., Cui Y., Wang J., Ding Y., Cai Y., Ueda T., Nakano A., Jiang L. (2013): ARA7(Q69L) expression in transgenic *Arabidopsis* cells induces the formation of enlarged multivesicular bodies. *Journal of Experimental Botany* **64**, 2817–2829.
- Jiang K., Moe-Lange J., Hennem L., Feldman L. J. (2016): Salt Stress Affects the Redox Status of *Arabidopsis* Root Meristems. *Frontiers in Plant Science* **7**, 81. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4744855/>
- Jiang Y., Yang B., Harris N. S., Deyholos M. K. (2007): Comparative proteomic analysis of NaCl stress-responsive proteins in *Arabidopsis* roots. *Journal of Experimental Botany* **58**, 3591–3607.
- Jiang Z. Y., Hunt J. V., Wolff S. P. (1992): Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Analytical Biochemistry* **202**, 384–389.
- Jing X., Yang J., Wang T. (2018): Effects of salinity on herbicide lactofen residues in soil. *Water, Air, & Soil Pollution* **229**, 3.
- Julkowska M. M., Hoefsloot H. C. J., Mol S., Feron R., de Boer G. J., Haring M. A., Testerink C. (2014): Capturing *Arabidopsis* root architecture dynamics with ROOT-FIT reveals diversity in responses to salinity. *Plant Physiology* **166**, 1387–1402.
- Kanematsu S., Asada K. (1990): Characteristic amino acid sequences of chloroplast and cytosol isozymes of CuZn-superoxide dismutase in spinach, rice and horsetail. *Plant and Cell Physiology* **31**, 99–112.
- Kim S. Y., Lim J. H., Park M. R., Kim Y. J., Park T. I., Seo Y. W., Choi K. G., Yun S. J. (2005): Enhanced antioxidant enzymes are associated with reduced hydrogen peroxide in barley roots under saline stress. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* **38**, 218–224.

- Kitakura S., Vanneste S., Robert S., Löffke C., Teichmann T., Tanaka H., Friml J. (2011): Clathrin mediates endocytosis and polar distribution of PIN auxin transporters in Arabidopsis. *The Plant Cell* **23**, 1920–1931.
- Kleine-Vehn J., Leitner J., Zwiewka M., Sauer M., Abas L., Luschnig C., Friml J. (2008): Differential degradation of PIN2 auxin efflux carrier by retromer-dependent vacuolar targeting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 17812–17817.
- Kleine-Vehn J., Wabnik K., Martinière A., Łangowski Ł., Willig K., Naramoto S., Leitner J., Tanaka H., Jakobs S., Robert S., Luschnig C., Govaerts W., W Hell S., Runions J., Friml J. (2011): Recycling, clustering, and endocytosis jointly maintain PIN auxin carrier polarity at the plasma membrane. *Molecular Systems Biology* **7**, 540. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3261718/>
- Knickelbein K., Zhang L. (2015): Mutant KRAS as a critical determinant of the therapeutic response of colorectal cancer. *Genes & Diseases* **2**, 4–12.
- Korbei B., Luschnig C. (2013): Plasma membrane protein ubiquitylation and degradation as determinants of positional growth in plants. *Journal of Integrative Plant Biology* **55**, 809–823.
- Kotzer A. M., Brandizzi F., Neumann U., Paris N., Moore I., Hawes C. (2004): AtRabF2b (Ara7) acts on the vacuolar trafficking pathway in tobacco leaf epidermal cells. *Journal of Cell Science* **117**, 6377–6389.
- Krishnamurthy A., Rathinasabapathi B. (2013): Oxidative stress tolerance in plants. *Plant Signaling & Behavior* **8**, e25761. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4091114/>
- Kümmel D., Heinemann U. (2008): Diversity in structure and function of tethering complexes: evidence for different mechanisms in vesicular transport regulation. *Current Protein & Peptide Science* **9**, 197–209.
- Kurusu T., Kuchitsu K., Tada Y. (2015): Plant signaling networks involving Ca²⁺ and Rboh/Nox-mediated ROS production under salinity stress. *Frontiers in Plant Science* **6**, 427. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4461821/>
- Ladeiro B. (2012): Saline agriculture in the 21st Century: using salt contaminated resources to cope food requirements. *Journal of Botany* **2012**, 310705. <https://www.hindawi.com/journals/jb/2012/310705/>
- Lagarde D., Basset M., Lepetit M., Conejero G., Gaymard F., Astruc S., Grignon C. (1996): Tissue-specific expression of Arabidopsis AKT1 gene is consistent with a role in K⁺ nutrition. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* **9**, 195–203.
- Laplaze L., Benkova E., Casimiro I., Maes L., Vanneste S., Swarup R., Weijers D., Calvo V., Parizot B., Herrera-Rodriguez M. B., Offringa R., Graham N., Doumas P., Friml J., Bogusz D., Beeckman T., Bennett M. (2007): Cytokinins act directly on lateral root founder cells to inhibit root initiation. *The Plant Cell* **19**, 3889–3900.
- Larkindale J., Knight M. R. (2002): Protection against heat stress-induced oxidative damage in Arabidopsis involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid. *Plant Physiology* **128**, 682–695.
- Lee D. H., Kim Y. S., Lee C. B. (2001): The inductive responses of the antioxidant enzymes by salt stress in the rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Plant Physiology* **158**, 737–745.
- Lee G. J., Sohn E. J., Lee M. H., Hwang I. (2004): The Arabidopsis rab5 homologs rha1 and ara7 localize to the prevacuolar compartment. *Plant & Cell Physiology* **45**, 1211–1220.
- Lee M. C., Orci L., Hamamoto S., Futai E., Ravazzola M., Schekman R. (2005): Sar1p N-terminal helix initiates membrane curvature and completes the fission of a COPII vesicle. *Cell* **122**, 605–617.
- Lee T. G., Mishra A., Lambright D. G. (2009): Structural mechanisms for regulation of membrane traffic by rab GTPases. *Traffic* **10**, 1377–1389.
- Leevers S. J., Paterson H. F., Marshall C. J. (1994): Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane. *Nature* **369**, 411–414.
- Leipe D. D., Wolf Y. I., Koonin E. V., Aravind L. (2002): Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. *Journal of Molecular Biology* **317**, 41–72.

- Leshem Y., Seri L., Levine A. (2007): Induction of phosphatidylinositol 3-kinase-mediated endocytosis by salt stress leads to intracellular production of reactive oxygen species and salt tolerance. *The Plant Journal* **51**, 185–197.
- Li G., Liang Z. (2001): Phosphate-binding loop and Rab GTPase function: mutations at Ser29 and Ala30 of Rab5 lead to loss-of-function as well as gain-of-function phenotype. *The Biochemical Journal* **355**, 681–689.
- Li H., Wu G., Ware D., Davis K. R., Yang Z. (1998): Arabidopsis Rho-related GTPases: differential gene expression in pollen and polar localization in fission yeast. *Plant Physiology* **118**, 407–417.
- Li H., Yan S., Zhao L., Tan J., Zhang Q., Gao F., Wang P., Hou H., Li L. (2014): Histone acetylation associated up-regulation of the cell wall related genes is involved in salt stress induced maize root swelling. *BMC plant biology* **14**, 105. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24758373>
- Li R., Liu P., Wan Y., Chen T., Wang Q., Mettlich U., Baluska F., Samaj J., Fang X., Lucas W. J., Lin J. (2012): A membrane microdomain-associated protein, Arabidopsis Flot1, is involved in a clathrin-independent endocytic pathway and is required for seedling development. *The Plant Cell* **24**, 2105–2122.
- Lindsay A. J., Miserey-Lenkei S., Goud B. (2015): Analysis of the interactions between Rab GTPases and class V myosins **1298**, *Rab GTPases: Methods and Protocols*, 73–83.
- Lipka V., Kwon C., Panstruga R. (2007): SNARE-ware: the role of SNARE-domain proteins in plant biology. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **23**, 147–174.
- Liu J., Ishitani M., Halfter U., Kim C. S., Zhu J. K. (2000): The Arabidopsis thaliana SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 3730–3734.
- Ljung K., Hull A. K., Celenza J., Yamada M., Estelle M., Normanly J., Sandberg G. (2005): Sites and Regulation of Auxin Biosynthesis in Arabidopsis Roots. *The Plant Cell* **17**, 1090–1104.
- Lucini L., Borgognone D., Roupael Y., Cardarelli M., Bernardi J., Colla G. (2016): Mild potassium chloride stress alters the mineral composition, hormone network, and phenolic profile in artichoke leaves. *Frontiers in Plant Science* **7**, 948. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4923119/>
- Luo Y., Scholl S., Doering A., Zhang Y., Irani N. G., Rubbo S. D., Neumetzler L., Krishnamoorthy P., Houtte I. V., Mylle E., Bischoff V., Vernhettes S., Winne J., Friml J., Stierhof Y. D., Schumacher K., Persson S., Russinova E. (2015): V-ATPase activity in the TGN/EE is required for exocytosis and recycling in Arabidopsis. *Nature Plants* **1**, 15094. <https://www.nature.com/articles/nplants201594>
- Lupas A. N., Martin J. (2002): AAA proteins. *Current Opinion in Structural Biology* **12**, 746–753.
- Lutts S., Kinet J. M., Bouharmont J. (1996): NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. *Annals of Botany* **78**, 389–398.
- Luu D. T., Martinière A., Sorieul M., Runions J., Maurel C. (2012): Fluorescence recovery after photobleaching reveals high cycling dynamics of plasma membrane aquaporins in Arabidopsis roots under salt stress. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* **69**, 894–905.
- Ma F., Lu R., Liu H., Shi B., Zhang J., Tan M., Zhang A., Jiang M. (2012): Nitric oxide-activated calcium/calmodulin-dependent protein kinase regulates the abscisic acid-induced antioxidant defence in maize. *Journal of Experimental Botany* **63**, 4835–4847.
- Maathuis F. J. M. (2009): Physiological functions of mineral macronutrients. *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 250–258.
- Malinsky J., Opekarová M., Grossmann G., Tanner W. (2013): Membrane microdomains, rafts, and detergent-resistant membranes in plants and fungi. *Annual Review of Plant Biology* **64**, 501–529.
- Marhavý P., Duclercq J., Weller B., Feraru E., Bielach A., Offringa R., Friml J., Schwechheimer C., Murphy A., Benková E. (2014): Cytokinin controls polarity of PIN1-dependent auxin transport during lateral root organogenesis. *Current biology* **24**, 1031–1037.
- Matsuzaki M., Misumi O., Shin-i T., Maruyama S., Takahara M., Miyagishima S., Mori T., Nishida K., Yagisawa F., Nishida K., Yoshida Y., Nishimura Y., Nakao S., Kobayashi T.,

- Momoyama Y., Higashiyama T., Minoda A., Sano M., Nomoto H., Oishi K., Hayashi H., Ohta F., Nishizaka S., Haga S., Miura S., Morishita T., Kabeya Y., Terasawa K., Suzuki Y., Ishii Y., Asakawa S., Takano H., Ohta N., Kuroiwa H., Tanaka K., Shimizu N., Sugano S., Sato N., Nozaki H., Ogasawara N., Kohara Y., Kuroiwa T. (2004): Genome sequence of the ultrasmall unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Nature* **428**, 653–657.
- Matunis M. J., Coutavas E., Blobel G. (1996): A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *The Journal of Cell Biology* **135**, 1457–1470.
- 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**, 118–128.
- Meng L. S., Wang Y. B., Yao S. Q., Liu A. (2015): Arabidopsis AINTEGUMENTA mediates salt tolerance by trans-repressing SCABP8. *Journal of Cell Science* **128**, 2919–2927.
- Miller E. A., Barlowe C. (2010): Regulation of coat assembly--sorting things out at the ER. *Current Opinion in Cell Biology* **22**, 447–453.
- Min D., Kim K., Hyeon C., Cho Y. H., Shin Y. K., Yoon T. Y. (2013): Mechanical unzipping and re-zipping of a single SNARE complex reveals hysteresis as a force-generating mechanism. *Nature communications* **4**, 1705. <https://www.nature.com/articles/ncomms2692>
- Minibayeva F., Beckett R. P., Kranner I. (2015): Roles of apoplastic peroxidases in plant response to wounding. *Phytochemistry* **112**, 122–129.
- Mitin N., Rossman K. L., Der C. J. (2005): Signaling interplay in Ras superfamily function. *Current biology* **15**, 563–574.
- Miyawaki K. N., Yang Z. (2014): Extracellular signals and receptor-like kinases regulating ROP GTPases in plants. *Frontiers in Plant Science* **5**, 449. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2014.00449/full>
- Molendijk A. J., Ruperti B., Palme K. (2004): Small GTPases in vesicle trafficking. *Current Opinion in Plant Biology* **7**, 694–700.
- Morris D. A., Thomas A. G. (1978): A microautoradiographic study of auxin transport in the stem of intact pea seedlings (*Pisum sativum* L.). *Journal of Experimental Botany* **29**, 147–157.
- Muday G. K., DeLong A. (2001): Polar auxin transport: controlling where and how much. *Trends in Plant Science* **6**, 535–542.
- Munns R. (2005): Genes and salt tolerance: bringing them together. *The New Phytologist* **167**, 645–663.
- Munns R., Tester M. (2008): Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* **59**, 651–681.
- Murashige T., Skoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473–497.
- Murphy A. S., Bandyopadhyay A., Holstein S. E., Peer W. A. (2005): Endocytotic cycling of PM proteins. *Annual Review of Plant Biology* **56**, 221–251.
- Naramoto S., Kleine-Vehn J., Robert S., Fujimoto M., Dainobu T., Paciorek T., Ueda T., Nakano A., van Montagu M. C., Fukuda H., Friml, J. (2010): ADP-ribosylation factor machinery mediates endocytosis in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 21890–21895.
- Negi N. P., Shrivastava D., Shekhar S., Sharma V., Sarin N. B. (2016): Simultaneous overexpression of CuZnSOD and cAPX from *Arachis hypogaea* leads to salinity stress tolerance in tobacco. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* **52**, 484–491.
- Nielsen E., Cheung A. Y., Ueda T. (2008): The regulatory RAB and ARF GTPases for vesicular trafficking. *Plant Physiology* **147**, 1516–1526.
- Nielsen E., Christoforidis S., Uttenweiler-Joseph S., Miaczynska M., Dewitte F., Wilm M., Hoflack B., Zerial M. (2000): Rabenosyn-5, a novel Rab5 effector, is complexed with hVPS45 and recruited to endosomes through a FYVE finger domain. *The Journal of Cell Biology* **151**, 601–612.
- Nielsen M. E., Jürgens G., Thordal-Christensen H. (2017): VPS9a activates the Rab5 GTPase ARA7 to confer distinct pre-and post-invasive plant innate immunity. *The Plant Cell*, tpc-00859. <http://www.plantcell.org/content/29/8/1927.long>

- Niu L., Liao W. (2016): Hydrogen peroxide signaling in plant development and abiotic responses: crosstalk with nitric oxide and calcium. *Frontiers in Plant Science* **7**, 230. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4777889/>
- Noack L. C., Jaillais Y. (2017): Precision targeting by phosphoinositides: how PIs direct endomembrane trafficking in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **40**, 22–33.
- Novick P., Brennwald P. (1993): Friends and family: the role of the Rab GTPases in vesicular traffic. *Cell* **75**, 597–601.
- Okumura K., Goh T., Toyokura K., Kasahara H., Takebayashi Y., Mimura T., Kamiya Y., Fukaki H. (2013): GNOM/FEWER ROOTS is required for the establishment of an auxin response maximum for Arabidopsis lateral root initiation. *Plant and Cell Physiology* **54**, 406–417.
- Oparka K. J., Scottish C. R. I., Prior D.M., Harris N. (1990): Osmotic induction of fluid-phase endocytosis in onion epidermal cells. *Planta* **180**, 555–561.
- Otegui M. S., Herder R., Schulze J., Jung R., Staehelin L. A. (2006): The proteolytic processing of seed storage proteins in Arabidopsis embryo cells starts in the multivesicular bodies. *The Plant Cell* **18**, 2567–2581.
- Otegui M. S., Spitzer C. (2008): Endosomal functions in plants. *Traffic* **9**, 1589–1598.
- Overvoorde P., Fukaki H., Beeckman T. (2010): Auxin Control of Root Development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2**, a001537. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2869515/>
- Park H. Y., Seok H. Y., Park B. K., Kim S. H., Goh C. H., Lee B., Lee C. H., Moon Y. H. (2008): Overexpression of Arabidopsis ZEP enhances tolerance to osmotic stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **375**, 80–85.
- Parmar N., Singh K. H., Sharma D., Singh L., Kumar P., Nanjundan J., Khan Y. J., Chauhan D. K., Thakur A. K. (2017): Genetic engineering strategies for biotic and abiotic stress tolerance and quality enhancement in horticultural crops: a comprehensive review. *3 Biotech* **7**, 239. <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs13205-017-0870-y>
- Peng X., Ding X., Chang T., Wang Z., Liu R., Zeng X., Cai Y., Zhu Y. (2014): Overexpression of a vesicle trafficking gene, OsRab7, enhances salt tolerance in rice. *The Scientific World Journal* **2014**, 483526. <https://www.hindawi.com/journals/tswj/2014/483526/>
- Peng Y. H., Zhu Y. F., Mao Y. Q., Wang S. M., Su W. A., Tang Z. C. (2004): Alkali grass resists salt stress through high [K⁺] and an endodermis barrier to Na⁺. *Journal of Experimental Botany* **55**, 939–949.
- Pereira-Leal J. B., Seabra M. C. (2001): Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins. *Journal of Molecular Biology* **313**, 889–901.
- Péret B., de Rybel B., Casimiro I., Benková E., Swarup R., Laplace L., Beeckman T., Bennett M. J. (2009): Arabidopsis lateral root development: an emerging story. *Trends in Plant Science* **14**, 399–408.
- Petrášek J., Friml J. (2009): Auxin transport routes in plant development. *Development* **136**, 2675–2688.
- Pitts R. J., Cernac A., Estelle M. (1998): Auxin and ethylene promote root hair elongation in Arabidopsis. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* **16**, 553–560.
- Popova O. V., Golldack D. (2007): In the halotolerant *Lobularia maritima* (Brassicaceae) salt adaptation correlates with activation of the vacuolar H⁺-ATPase and the vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter. *Journal of Plant Physiology* **164**, 1278–1288.
- Potters G., Pasternak T. P., Guisez Y., Palme K. J., Jansen M. A. K. (2007): Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trends in Plant Science* **12**, 98–105.
- Pucadyil T. J., Schmid S. L. (2009): Conserved functions of membrane active GTPases in coated vesicle formation. *Science* **325**, 1217–1220.
- Quan R., Lin H., Mendoza I., Zhang Y., Cao W., Yang Y., Shang M., Chen S., Pardo J. M., Guo Y. (2007): SCABP8/CBL10, a putative calcium sensor, interacts with the protein kinase SOS2 to protect Arabidopsis shoots from salt stress. *The Plant Cell* **19**, 1415–1431.
- Quintero F. J., Martínez-Atienza J., Villalta I., Jiang X., Kim W. Y., Ali Z., Fujii H., Mendoza I., Yun D. J., Zhu J. K., Pardo J. M. (2011): Activation of the plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter Salt-Overly-Sensitive 1 (SOS1) by phosphorylation of an auto-inhibitory C-terminal domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 2611–2616.

- Rahman A., Bannigan A., Sulaman W., Pechter P., Blancaflor E. B., Baskin T. I. (2007): Auxin, actin and growth of the *Arabidopsis thaliana* primary root. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* **50**, 514–528.
- Ramos J., López M. J., Benlloch M. (2004): Effect of NaCl and KCl salts on the growth and solute accumulation of the halophyte. *Plant and Soil* **259**, 163–168.
- Richter S., Kientz M., Brumm S., Nielsen M. E., Park M., Gavidia R., Krause C., Voss U., Beckmann H., Mayer U., Stierhof Y. D., Jürgens G. (2014): Delivery of endocytosed proteins to the cell-division plane requires change of pathway from recycling to secretion. *eLife* **3**, e02131. <https://elifesciences.org/articles/02131>
- Rink J., Ghigo E., Kalaidzidis Y., Zerial M. (2005): Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell* **122**, 735–749.
- Rojas A. M., Fuentes G., Rausell A., Valencia A. (2012): The Ras protein superfamily: evolutionary tree and role of conserved amino acids. *The Journal of Cell Biology* **196**, 189–201.
- Rubino M., Miaczynska M., Lippé R., Zerial M. (2000): Selective membrane recruitment of EEA1 suggests a role in directional transport of clathrin-coated vesicles to early endosomes. *The Journal of Biological Chemistry* **275**, 3745–3748.
- Rush M. G., Drivas G., D'Eustachio P. (1996): The small nuclear GTPase Ran: how much does it run? *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* **18**, 103–112.
- Ryu J. K., Min D., Rah S. H., Kim S. J., Park Y., Kim H., Hyeon C., Jahn R., Yoon T. Y. (2015): Spring-loaded unraveling of a single SNARE complex by NSF in one round of ATP turnover. *Science* **347**, 1485–1489
- Saini S., Sharma I., Kaur N., Pati P. K. (2013) Auxin: a master regulator in plant root development. *Plant Cell Reports* **32**, 741–757.
- Sairam R. K., Tyagi A. (2004): Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Current Science* **86**, 407–421.
- Saito C., Ueda T. (2009): Functions of RAB and SNARE proteins in plant life. *International Review of Cell and Molecular Biology* **274**, 183–233.
- Sakuraba Y., Kim D., Paek N. C. (2018): Salt Treatments and Induction of Senescence. *Methods in Molecular Biology* **1744**, 141–149.
- Semerdjieva S., Shortt B., Maxwell E., Singh S., Fonarev P., Hansen J., Schiavo G., Grant B. D., Smythe E. (2008): Coordinated regulation of AP2 uncoating from clathrin-coated vesicles by rab5 and hRME-6. *The Journal of Cell Biology* **183**, 499–511.
- Settles E. I., Loftus A. F., McKeown A. N., Parthasarathy R. (2010): The vesicle trafficking protein Sar1 lowers lipid membrane rigidity. *Biophysical Journal* **99**, 1539–1545.
- Shabala L., Cuin T. A., Newman I. A., Shabala S. (2005): Salinity-induced ion flux patterns from the excised roots of *Arabidopsis* sos mutants. *Planta* **222**, 1041–1050.
- Shabala S. (2000): Ionic and osmotic components of salt stress specifically modulate net ion fluxes from bean leaf mesophyll. *Plant, Cell & Environment* **23**, 825–837.
- Shah Z. H., Rehman H. M., Akhtar T., Daur I., Nawaz M. A., Ahmad M. Q., Rana I. A., Atif R. M., Yang S. H., Chung G. (2017): Redox and ionic homeostasis regulations against oxidative, salinity and drought stress in wheat (a systems biology approach). *Frontiers in Genetics* **8**, 141. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5651134/>
- Shavrukov Y. (2013): Salt stress or salt shock: which genes are we studying? *Journal of Experimental Botany* **64**, 119–127.
- Shi H., Quintero F. J., Pardo J. M., Zhu J. K. (2002a) The putative plasma membrane Na(+)/H(+) antiporter SOS1 controls long-distance Na(+) transport in plants. *The Plant Cell* **14**, 465–477.
- Shi H., Xiong L., Stevenson B., Lu T., Zhu J. K. (2002b): The *Arabidopsis* salt overly sensitive 4 mutants uncover a critical role for vitamin B6 in plant salt tolerance. *The Plant Cell* **14**, 575–588.
- Shin H. W., Hayashi M., Christoforidis S., Lacas-Gervais S., Hoepfner S., Wenk M. R., Modregger J., Uttenweiler-Joseph S., Wilm M., Nystuen A., Frankel W. N., Solimena M., De Camilli P., Zerial M. (2005): An enzymatic cascade of Rab5 effectors regulates phosphoinositide turnover in the endocytic pathway. *The Journal of Cell Biology* **170**, 607–618.

- Shoji J., Kikuma T., Kitamoto K. (2014): Vesicle trafficking, organelle functions, and unconventional secretion in fungal physiology and pathogenicity. *Current Opinion in Microbiology* **20**, 1–9.
- Schachtman D. P., Schroeder J. I. (1994): Structure and transport mechanism of a high-affinity potassium uptake transporter from higher plants. *Nature* **370**, 655–658.
- Simonsen A., Lippé R., Christoforidis S., Gaullier J. M., Brech A., Callaghan J., Toh B. H., Murphy C., Zerial M., Stenmark H. (1998): EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature* **394**, 494–498.
- Singh M. K., Jürgens G. (2017): Specificity of plant membrane trafficking - ARFs, regulators and coat proteins. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. S1084-9521(17)30446-9. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1084952117304469>
- Sivars U., Aivazian D., Pfeffer S. R. (2003): Yip3 catalyses the dissociation of endosomal Rab-GDI complexes. *Nature* **425**, 856–859.
- Smith M. W., Doolittle R. F. (1992): A comparison of evolutionary rates of the two major kinds of superoxide dismutase. *Journal of Molecular Evolution* **34**, 175–184.
- Sohn E. J., Kim E. S., Zhao M., Kim S. J., Kim H., Kim Y. W., Lee Y. J., Hillmer S., Sohn U., Jiang L., Hwang I. (2003): Rha1, an Arabidopsis Rab5 homolog, plays a critical role in the vacuolar trafficking of soluble cargo proteins. *The Plant Cell* **15**, 1057–1070.
- Söllner T., Whiteheart S. W., Brunner M., Erdjument-Bromage H., Geromanos S., Tempst P., Rothman J. E. (1993): SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* **362**, 318–324.
- Sönnichsen B., De Renzis S., Nielsen E., Rietdorf J., Zerial M. (2000): Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *The Journal of Cell Biology* **149**, 901–914.
- Sorek N., Bloch D., Yalovsky S. (2009): Protein lipid modifications in signaling and subcellular targeting. *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 714–720.
- Stenmark H. (2009): Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **10**, 513–525.
- Stenmark H., Olkkonen V. M. (2001): The Rab GTPase family. *Genome Biology* **2**, reviews3007. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC138937/>
- Stenmark H., Valencia A., Martinez O., Ullrich O., Goud B., Zerial M. (1994): Distinct structural elements of rab5 define its functional specificity. *The EMBO journal* **13**, 575–583.
- Stoeckle D., Thellmann M., Vermeer J. E. (2018): Breakout—lateral root emergence in Arabidopsis thaliana. *Current Opinion in Plant Biology* **41**, 67–72.
- Šamaj J., Read N. D., Volkmann D., Menzel D., Baluska F. (2005): The endocytic network in plants. *Trends in Cell Biology* **15**, 425–433.
- Takai Y., Sasaki T., Matozaki T. (2001): Small GTP-binding proteins. *Physiological Reviews* **81**, 153–208.
- Terryn N., Arias M. B., Engler G., Tiré C., Villarroya R., Van Montagu M., Inzé D. (1993): rha1, a gene encoding a small GTP binding protein from Arabidopsis, is expressed primarily in developing guard cells. *The Plant Cell* **5**, 1761–1769.
- Tsai Y. C., Hong C. Y., Liu L. F., Kao C. H. (2004): Relative importance of Na⁺ and Cl⁻ in NaCl-induced antioxidant systems in roots of rice seedlings. *Physiologia Plantarum* **122**, 86–94.
- Tsiantis M. S., Bartholomew D. M., Smith J. A. (1996): Salt regulation of transcript levels for the c subunit of a leaf vacuolar H⁽⁺⁾-ATPase in the halophyte Mesembryanthemum crystallinum. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* **9**, 729–736.
- Tsukagoshi H., Busch W., Benfey P. N. (2010): Transcriptional regulation of ROS controls transition from proliferation to differentiation in the root. *Cell* **143**, 606–616.
- Ueda T., Uemura T., Sato M. H., Nakano A. (2004): Functional differentiation of endosomes in Arabidopsis cells. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* **40**, 783–789.
- Ueda T., Yamaguchi M., Uchimiya H., Nakano A. (2001): Ara6, a plant-unique novel type Rab GTPase, functions in the endocytic pathway of Arabidopsis thaliana. *The EMBO Journal* **20**, 4730–4741.
- Ullman K. S., Powers M. A., Forbes D. J. (1997): Nuclear export receptors: from importin to exportin. *Cell* **90**, 967–970.

- Vernoud V., Horton A. C., Yang Z., Nielsen E. (2003): Analysis of the small GTPase gene superfamily of Arabidopsis. *Plant Physiology* **131**, 1191–1208.
- Vetter I. R., Wittinghofer A. (2001): The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* **294**, 1299–1304.
- Viotti C., Bubeck J., Stierhof Y. D., Krebs M., Langhans M., van den Berg W., van Dongen W., Richter S., Geldner N., Takano J., Jürgens G., de Vries S. C., Robinson D. G., Schumacher K. (2010): Endocytic and secretory traffic in Arabidopsis merge in the trans-Golgi network/early endosome, an independent and highly dynamic organelle. *The Plant Cell* **22**, 1344–1357.
- Volkov V., Amtmann A. (2006): *Thellungiella halophila*, a salt-tolerant relative of Arabidopsis thaliana, has specific root ion-channel features supporting K⁺/Na⁺ homeostasis under salinity stress. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* **48**, 342–353.
- Vonderheit A., Helenius A. (2005): Rab7 associates with early endosomes to mediate sorting and transport of Semliki forest virus to late endosomes. *PLoS biology* **3**, e233. <http://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.0030233>
- Wang M., Zheng Q., Shen Q., Guo S. (2013): The critical role of potassium in plant stress response. *International Journal of Molecular Sciences* **14**, 7370–7390.
- Wang W., Xia M., Chen J., Deng F., Yuan R., Zhang X., Shen F. (2016): Genome-wide analysis of superoxide dismutase gene family in *Gossypium raimondii* and *G. arboreum*. *Plant Gene* **6**, 18–29.
- Wang Y., Li K., Li X. (2009): Auxin redistribution modulates plastic development of root system architecture under salt stress in Arabidopsis thaliana. *Journal of Plant Physiology* **166**, 1637–1645.
- Wang Y., Li X. (2008): Salt stress-induced cell reprogramming, cell fate switch and adaptive plasticity during root hair development in Arabidopsis. *Plant Signaling & Behavior* **3**, 436–438.
- Wang Y., Shen W., Chan Z., Wu Y. (2015): Endogenous cytokinin overproduction modulates ROS homeostasis and decreases salt stress resistance in Arabidopsis thaliana. *Frontiers in Plant Science* **6**. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4652137/>
- West G., Inzé D., Beecher G. T. (2004): Cell cycle modulation in the response of the primary root of Arabidopsis to salt stress. *Plant physiology* **135**, 1050–1058.
- Wieland F., Harter C. (1999): Mechanisms of vesicle formation: insights from the COP system. *Current Opinion in Cell Biology* **11**, 440–446.
- Wilkinson S., Davies W. J. (2002): ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants. *Plant, Cell & Environment* **25**, 195–210.
- Xie Y. J., Xu S., Han B., Wu M. Z., Yuan X. X., Han Y., Gu Q., Xu D. K., Yang Q., Shen W. B. (2011): Evidence of Arabidopsis salt acclimation induced by up-regulation of HY1 and the regulatory role of RbohD-derived reactive oxygen species synthesis. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* **66**, 280–292.
- Xu P., Zang A., Chen H., Cai W. (2016): The small G protein AtRAN1 regulates vegetative growth and stress tolerance in Arabidopsis thaliana. *PloS One* **11**, e0154787. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0154787>
- Yancheva S., Georgieva L., Kostova M., Halkoglu P., Dimitrova M., Naimov, S. (2016): Plant pigments content as a marker for herbicide abiotic stress in corn (*Zea mays* L.). *Emirates Journal of Food and Agriculture* **28**, 332. <https://search.proquest.com/docview/1786775431?pq-origsite=gscholar>
- Yang Z. (2002): Small GTPases: versatile signaling switches in plants. *The Plant Cell* **14**, 375–388.
- Yao X., Horie T., Xue S., Leung H. Y., Katsuhara M., Brodsky D. E., Wu Y., Schroeder J. I. (2010): Differential sodium and potassium transport selectivities of the rice OsHKT2;1 and OsHKT2;2 transporters in plant cells. *Plant Physiology* **152**, 341–355.
- Ye J., Zhang W., Guo Y. (2013): Arabidopsis SOS3 plays an important role in salt tolerance by mediating calcium-dependent microfilament reorganization. *Plant Cell Reports* **32**, 139–148.
- Yokoi S., Quintero F. J., Cubero B., Ruiz M. T., Bressan R. A., Hasegawa P. M., Pardo J. M. (2002): Differential expression and function of Arabidopsis thaliana NHX Na⁺/H⁺ antiporters in the salt stress responses. *Plant Journal* **5**, 529–539.

- You J., Chan Z. (2015): ROS regulation during abiotic stress responses in crop plants. *Frontiers in Plant Science* **6**, 1092. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4672674/>
- Yu L., Nie J., Cao C., Jin Y., Yan M., Wang F., Liu J., Xiao Y., Liang Y., Zhang W. (2010): Phosphatidic acid mediates salt stress response by regulation of MPK6 in *Arabidopsis thaliana*. *The New Phytologist* **188**, 762–773.
- Zerial M., McBride H. (2001): Rab proteins as membrane organizers. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **2**, 107–117.
- Zhang L., Tian L. H., Zhao J. F., Song Y., Zhang C. J., Guo Y. (2009): Identification of an apoplastic protein involved in the initial phase of salt stress response in rice root by two-dimensional electrophoresis. *Plant Physiology* **149**, 916–928.
- Zhang Y., McCormick S. (2010): The regulation of vesicle trafficking by small GTPases and phospholipids during pollen tube growth. *Sexual Plant Reproduction* **23**, 87–93.
- Zhao Y., Wang T., Zhang W., Li X. (2011): SOS3 mediates lateral root development under low salt stress through regulation of auxin redistribution and maxima in *Arabidopsis*. *The New Phytologist* **189**, 1122–1134.
- Zhao Y., Xing L., Wang X., Hou Y. J., Gao J., Wang P., Duan C. G., Zhu X., Zhu J. K. (2014): The ABA receptor PYL8 promotes lateral root growth by enhancing MYB77-dependent transcription of auxin-responsive genes. *Science Signaling* **7**, ra53. <http://stke.sciencemag.org/content/7/328/ra53.long>
- Zhu J. K., Hasegawa P. M., Bressan R. A., Bohnert P. H. J. (1997): Molecular aspects of osmotic stress in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **16**, 253–277.
- Zolla G., Heimer Y. M., Barak S. (2010): Mild salinity stimulates a stress-induced morphogenic response in *Arabidopsis thaliana* roots. *Journal of Experimental Botany* **61**, 211–224.
- Zwiewka M., Nodzyński T., Robert S., Vanneste S., Friml J. (2015): Osmotic stress modulates the balance between exocytosis and clathrin-mediated endocytosis in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant* **8**, 1175–1187.

8 SEZNAM ZKRATEK

AAK1	kinasa asociovaná s AP2
ABA	kyselina abscisová
ABS	absorbance
ANOVA	analýza variace
AP2	adaptorový protein 2
APS	persíran amonný
APX	askorbátperoxidasa
Arf	ADP-ribosylační faktor
ARF	auxin-responsivní faktor
AUX	auxin transporter
CA	konstitutivně aktivní
Cdc42	protein kontroly buněčného dělení 42
COPI, II	komplex obalového proteinu I, II
DN	dominantně negativní
DTT	dithiothreitol
ECL	zvýšená chemiluminiscence
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EE	raný endosom
EEA1	antigen raného endosomu 1
EGTA	ethylenglykoltetraoctová kyselina
ER	endoplasmatické retikulum
ESCRT	endosomální třídící komplexy potřebné pro transport
FAO	organizace pro výživu a zemědělství
FM4-64	N-(3-triethylamoniumpropyl)-4-(6-(4-(diethylamino)fenyl)hexatrienyl)pyridinium dibromid
FW	čerstvá hmota
GA	Golgiho aparát
GAP	GTPasu aktivující protein
GDF	GDI přemísťující faktor
GDI	inhibitor disociace guaninových nukleotidů
GEF	výměnný faktor pro guaninový nukleotid
GPX	glutathionperoxidasa
GR	glutathionreduktasa
GRB2	protein 2 vázající se na receptor růstového faktoru
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazin ethansulfonová kyselina
HKT	vysoce-afinitní draslíkový transporter
HPR	křenová peroxidasa
IAA	kyselina indolyl-3-octová
IgG	imunoglobulin G
KAT	katalasa
LAX	protein podobný auxinovému transporteru
LE	pozdní endosom
MAPK	mitogenem aktivovaná protein kinasa
MDA	malonaldehyd
MEK	mitogenem aktivovaná proteinkinasa kinasa
MPK6	mitogenem aktivovaná proteinkinasa 6
MS	Murashige a Skoog
MVB	multivesikulární tělísko
NBT	nitroblue tetrazolium
NHX	Na ⁺ /H ⁺ transporter
NSCC	neselektivní kationtový kanál
p	hladina významnosti

PA	kyselina fosfatidová
PI	fosfatidylinositol
PI(3)P	fosfatidylinositol-3-fosfát
PI(3,4,5)P ₃	fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát
PI(4,5)P ₂	fosfatidylinositol-4,5-difosfát
PI3K	fosfatidylinositol-3-kinasa
PIN	pin-formed, jehličkovitý
PKB	protein kinasa B
PLD	fosfolipasa D
PM	plasmatická membrána
PPasa	proteiny pumpující pyrofosfatasa
PVC	prevakuolární oddělení
PVDF	polyvinylidenfluorid
Rab	protein příbuzný Ras izolován z mozku
Rac	protein příbuzná Ras
Raf	rychle rostoucí fibrosarkomy
Ran	jaderný protein příbuzný Ras
Ras	kryší sarkom
RBOH	homolog oxidasy respiračního řetězce
Rho	homolog Ras
Rho	homolog Ras
RLK	receptor like kinase
Rm	relativní mobilita
Rop	rostlinný homolog Rho
ROS	reaktivní formy kyslíku
RPS5A	ribosomální protein S5a
RTK	tyrosin-kinasový receptor
S5a	podjednotka (subunit) 5a
Sar1	se sekrecí asociovaný protein 1 příbuzný Ras
SCaBP8	SOS2-podobný vápník vázající protein 8
SDS	dodecylsírán sodný
Sec12	protein spojený se sekrecí
SHC	obsahující Src homologní doménu
SOD	superoxiddismutasa
SOS	výrazně citlivý na sůl
SOS	son of sevenless, gen nacházející se downstream od genu sevenless
Src	sarkom
SYP	synaptophysin
TBA	kyselina thiobarbiturová
TBARS	sloučeniny reagující s kyselinou thiobarbiturovou
TCA	kyselina trichloroctová
TEMED	tetramethylethylendiamin
TGN	<i>trans</i> -Golgiho síť
VHA	protonová ATPasa typu V, podjednotka A
VPS9	vakuolární třídící protein 9