

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní program: BBI



Barbora Jelínková

Molekulární mechanismy mechanorecepce u rostlin
Molecular mechanisms of mechanoreception in plants

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Jan Martinek

Konzultant: Ivan Kulich, PhD.

Praha 2019

Poděkování:

Ráda bych za přínosné rady a trpělivý přístup poděkovala svému školiteli Mgr. Janu Martinkovi. Děkuji též Bc. Ivanu Loginovi za cenné konzultace.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 25. 7. 2019

Podpis

ABSTRAKT

Rostlina, jakožto přisedlý organismus, nedisponuje velkými možnostmi fyzického úniku a s nepřízní prostředí se vyrovnává přizpůsobením. Jedním z mnoha rostlinných smyslů zásadních pro zaznamenání změn v prostředí je mechanorecepce. Rostlina vnímá a rozlišuje mnoho mechanických podnětů, které mohou mimo jiné ovlivňovat rostlinnou imunitu a morfogenezi. Na mechanický podnět reaguje celá buňka a mechanorecepce se zřejmě účastní množství jejích struktur. Jakákoliv změna na buněčné stěně – hranicí mezi buňkou a jejím okolím – se přenáší na plasmatickou membránu a z ní je signál veden dále přes cytoskelet, potenciálně i na další struktury. Jedná se o tzv. kontinuum buněčná stěna – cytoplasmatická membrána – cytoskelet a stěžejním tématem mé práce je využití tohoto konceptu pro osvětlení molekulárních mechanismů mechanorecepce u rostlin.

Klíčová slova: mechanorecepce, kontinuum buněčná stěna – plasmatická membrána – cytoskelet, vápníková signalizace, cytoskelet.

ABSTRACT

Plant, as sedentary organism, does not have many possibilities to physically escape it's unpleasant surroundings, instead it adapts oneself. One of many plant senses that are crucial for tracking environment changes is mechanoreception. Plant senses and differentiates between many mechanical cues, some of them affecting plant immunity and morphogenesis. The whole plant cell reacts to mechanical cues and many cellular structures are involved in mechanoreception. Any change in cell wall – a borderline between the cell and it's surroundings – is transduced to plasma membrane, then to the cytoskeleton and potentially to other structures. Concept of this cell wall-plasma membrane-cytoskeleton continuum and it's use as an instrument to illuminate molecular mechanisms of mechanoreception in plants are the key topics of my thesis.

Key words: mechanoreception, cell wall-plasma membrane-cytoskeleton continuum, calcium signalisation, cytoskeleton.

OBSAH

1 Seznam zkratek	1
2 Úvod	2
2.1 Mechanorecepce u rostlin	2
3 Mechanorecepce na buněčné úrovni	4
3.1 Receptory buněčné stěny	5
3.1.1 WAK	5
3.1.2 ILR	5
3.2 Mechanosensitivní kanály	7
3.2.1 MSL	7
3.2.2 MCA	8
3.3 Vápníková signalizace	9
4 Role cytoskeletu v rostlinné mechanorepci	10
4.1 Struktury související s mechanorepcí	10
4.1.1 Kortikální mikrotubuly	10
4.1.2 Preprofázický prstenec	13
4.1.3 Aktinový cytoskelet	13
4.2 Styčné body BS-PM-C kontinua	15
4.2.1 Forminy	15
4.2.2 IQD	19
4.3 Další proteiny související s mechanorepcí	21
4.3.1 ADF/Cofilin	21
4.3.2 EB1	24
5 Závěr	25
6 Použitá literatura	28

1 SEZNAM ZKRATEK

ADF – Actin Depolymerizing Factor

BS-PM-C kontinuum – kontinuum buněčné stěny - plasmatické membrány - cytoskeletu

CaM – Calmodulin

Cdc12 – Cell division cycle12

CML – Calmodulin-like

Dia1 – Diaphanous1

EB1 – End Binding1

ER – endoplazmatické retikulum

FH – Formin Homology

GA – golgiho aparát

ILR – Integrin-Like Receptor

IQD – IQ67 Domain

MCA - Mid1-Complementing Activity1

MSC – Mechanosensitive channel

MSL – Mechanosensitive channel of Small conductance-Like

NDR – Non-race-specific Disease Resistance1

OPR3 – Oxophytodienoate Reductase3

TCH – Touch

WAK – Wall Associated Kinase

WT – wild type

2 ÚVOD

2.1 MECHANORECEPCE U ROSTLIN

Schopnost vnímat mechanické podněty je pro rostliny klíčová, neboť zprostředkovává informace jak o bezprostředním okolí, tak i o stavu samotného organismu.

Rostliny reagují na velmi drobné a přechodné podněty, jako je dotyk jehlou, na něž kultivované buňky petržele (*Petroselinum crispum*) odpovídají přesunem cytoplasmy a zvýšením produkce kyslíkových radikálů (Gus-Mayer *et al.*, 1998). Podobně se tyto buňky chovají při napadení patogenní houbou *Phytophthora infestans*, která specializovanou hyfou penetruje buněčnou stěnu - přesouvají svou cytoplasmu a jádro pod místo penetrace (Gross *et al.*, 1993). Dotek je tak zřejmě zásadní pro registraci patogenů.

I doteky většího rozsahu, jako je například tření listů či stonků mezi prsty, zřejmě též regulují rostlinnou imunitu – dráždění rostliny huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) získaly resistenci k oomycetě *Botrytis cinerea* (Chehab *et al.*, 2012). Kromě imunity takové doteky ovlivňují celkový habitus i ontogenezi rostliny – dráždění rostliny mívají menší a robustnější vzrůst, mimo jiné později kvetou (Jaffe, 1973). Tento jev se nazývá thigmomorfogeneze. Možný důvod pro existenci takového vývojového programu je, že menší a mohutnější rostlina lépe odolává sešlapu, lámání i rychlému větru.

Samotný zakrslý vzhled může být výsledkem jasmonátové signalizace, která souvisí jak se systémovou imunitou, tak s thigmomorfogenezí. Ukázalo se, že over-exprese genu pro OPR-3, gen jehož produkt hraje roli v biosyntetické dráze jasmonátu, vede k fenotypu, který u rostlin, jichž se nikdo nedotýkal, vypadal velmi podobně jako thigmomorfogeneze u WT. Naopak rostliny s defekty v syntéze jasmonátu na dotyk nereagovaly (Chehab *et al.*, 2012). Dotek kromě jasmonátové signalizace ovlivňuje i signalizaci ethylenovou, navíc samotný efekt ethylenu na rostlinu připomíná thigmomorfogenezi (Mensuali-Sodi *et al.*, 2006). Fytohormonální signalizace se pochopitelně vyskytuje i v případě napadení herbivorem, jako je třeba housenka. V této oblasti bylo nedávno zjištěno, že rostlina reaguje nejen na poškození pletiv, ale i na specifické vibrace vyvolané rytmickým chroustáním larvy (Body *et al.*, 2019).

Další, tradičnější, příklady makroskopické mechanorecepce jsou některé masožravé rostliny a citlivka (*Mimosa pudica*), které po indukci dotykem dokáží vyvíjet pohyby v pro rostliny nevídaném tempu. Masožravka mucholapka venušina (*Dionaea muscipula*) sklapuje své pasti na základě podráždění citlivých trichomů uvnitř (Curtis, 1834). Sklapuje je ovšem pouze po specifickém podráždění – na proud vzduchu, či protékající vodu nereaguje a rozeznává tak různé typy stimulů (Darwin, 1875a). Současná teorie tvrdí, že podráždění trichomů vede ke vzniku akčního potenciálu v přilehlých pletivech. Tento signál se šíří až dojde k motorovým

buňkám vyskytujícím se v blízkosti středního žebra listu na vnitřní i vnější straně. Následně se v motorových buňkách otevřou iontové kanály a pumpy, změní se osmotické poměry, voda aquaporiny opustí vnitřní motorické buňky. Naopak vnější motorické buňky nabudou na objemu a past se sklapne. Podporou této teorie je fakt, že k zavření pasti dojde i po elektrostimulaci (Volkov *et al.*, 2007). Podobně jako mucholapka i rosnatka (*Drosera rotundifolia*) obtáčí své lepkavé listy kolem kořisti po patřičné mechanické stimulaci (Darwin, 1875b).

Citlivka také sklapuje lístky svého složeného listu po doteku (Pfeffer, 1873). Mechanismus sklapnutí je podobný jako u mucholapky – ve specializované ztloustlé části řapíku tzv. pulvinu, dojde vlivem přenosu elektrochemického signálu ke změnám v turgorových poměrech a lístky se sklopí (Roblin, 1982; Fromm a Eschrich, 1988).

Některé mechanické stimuly působí na rostliny neustále – jako např. její vlastní váha. Bylo zjištěno, že rostlinám huseničku sekundárně tloustnou stonky pod tíhou vlastního květenství. Množství sekundárního dřeva pozitivně korelovalo pouze s délkou stonku, nikoliv například se stářím rostliny. Ukázalo se také, že při použití 2,5g agarového bločku jako zátěže připevněné na stoncích, docházelo k sekundárnímu tloustnutí i u mladých rostlin s jinak krátkým stonkem a zvýšila se exprese genů indukovaných dotykem (Ko *et al.*, 2004). Mechanismus kontroly vlastní tíhy může být zásadní u ovocných stromů, kde plody často dosahují velké váhy a nepřipravená větev se pod ní snadno zlomí.

Další neustále působící silou, je síla gravitační, která by podle všeho mohla být rostlinou vnímána jako mechanický stimul. Statolitová hypotéza kořenové gravirecepce říká, že při změně orientace kořene dochází ve specializovaných buňkách kořenové čepičky – statocytech – k sedimentaci těžkých, škrob obsahujících amyloplastů – statolitů – a tato změna v jejich poloze je odečítána a signalizuje rostoucím vrstvám, které zajistí ohnutí kořenu ve správném směru. Přesný způsob přenosu signálu na molekulární úrovni není v současnosti dostatečně objasněn a objevující se výsledky ukazující gravirepenci bez přítomných statolitů (Edelmann, 2018) vedou až ke zpochybňování její platnosti (Richter, Strauch a Lebert, 2019). Studie však naznačují roli aktinového cytoskeletu a ER. Cytoskelet, především ten aktinový, zřejmě vytváří v centrální oblasti síť, možná napojenou na kortikální mikrotubuly a mechanosenzitivní kanály, kterou se padající statolity prodírají a mění tak tahové poměry a celkové napětí mezi těmito provázanými elementy – tento koncept je ústřední v tzv. “tensegrity” modelu gravirecepce (Yoder *et al.*, 2002).

Aktinový cytoskelet zřejmě zprostředkuje i onen růst zajišťující ohyb orgánu. Je známo, že při gravistimulaci dochází ke změnám v lokální koncentraci růstového hormonu auxinu. Polární transport auxinu je závislý na membránových PIN (Pinned) proteinech, jejichž lokalizace je podmíněna jejich na aktinu závislým umístěním na membránu. Aktin je ve statocytech při

sedimentaci statolitů reorganizován, což může polarizovat transport PIN proteinů na membránu, tím dojde k polarizaci auxinového toku a elongaci přilehlých buněk (Friml *et al.*, 2002).

Roli ER pak nahrává fakt, že statocyty obsahují kromě tubulárního ER, které se vyskytuje hlavně ve středu buňky společně s jádrem, diktyosomy a statolity, ještě tzv. nodální ER. Tato specializovaná struktura ohraničuje ve formě pevných plátovitých cisteren kortikální oblast a možná ji chrání před disturbancemi a narušením možných interakcí mezi aktinovým cytoskeletem a mechanosenzitivními kanály cestujícími amyloplasty. (Zheng a Staehelin, 2002).

Jak ilustrují výše uvedené příklady, mechanické podněty jsou všudypřítomné a rostliny je vnímají a reagují na ně. Ovlivňují rostlinný růst kvalitativně i kvantitativně a modifikují interakce rostliny s okolím. Různé podněty by se daly převést na tlak či tah vyvíjený různými prostředky na různé části celé rostliny, pletiv i rostlinné buňky, rostlina mezi nimi rozlišuje, odpovídá na ně různě, zároveň mají mechanismy vnímání jednotlivých stimulů mnoho společných rysů. Rozsah s jakým mechanorecepce ovlivňuje každodenní rostlinné bytí není zcela zdokumentován, zasahuje do dějů na první pohled s mechanorecepční nesouvisejícími a může tak stát v hierarchii rostlinných smyslů výše, než se zdá.

3 MECHANORECEPCE NA BUNĚČNÉ ÚROVNI

Jakákoliv signalizace se dá rozdělit na několik fází – příjem, přenos a přeměna signálu. Při vnímání mechanického podnětu se zapojuje široké spektrum buněčných struktur. Topologicky stojí na počátku mechanorecepce buněčná stěna spolu s plasmatickou membránou jako prvky na pomezí buňky a okolního světa. Plasmatická membrána obsahuje množství receptorů a kanálů umožňujících příjem a předání signálu (Monshausen a Gilroy, 2009; Monshausen a Haswell, 2013), ačkoli jen nemnoho z nich je dostatečně prostudováno. Kanály přeměňují mechanické změny v plasmatické membráně na změnu iontových, následně případně i osmotických, poměrů v cytoplasmě i apoplastu. Obměnu iontů zaznamenávají další členové signalizační kaskády, kteří se mohou v důsledku toho aktivovat/deaktivovat navázáním ligandu, fosforylací, změnou konformace a přenášet signál dál.

Jeden z modelů mechanorecepce uvažuje kontinuum buněčné stěny, plasmatické membrány a cytoskeletu (dále jen BS-PM-C kontinuum), které je fyzicky i funkčně propojené (Liu, Persson a Sánchez-Rodríguez, 2015), změny v kterémkoliv jeho prvku se přenáší na ty ostatní a ty následně reagují proti jakémukoliv vyšínutí v zájmu zachování, obnovení či nastolení relativně ideálního stavu.

V následujícím textu budou blíže rozebráni jednotliví aktéři a propojení v BS-PM-C kontinuu.

Obzvláštní pozornost bude věnována úloze cytoskeletu. Problematika souvisejících jevů bude vyložena stručněji a s ohledem na jejich zasazení do rámce konceptu BS-PM-C kotinua.

3.1 RECEPTORY BUNĚČNÉ STĚNY

3.1.1 WAK

WAKs (Wall-Associated Kinases) jsou transmembránové proteiny z rodiny RLKs (Receptor-Like Kinases). Jedním z nejprozkoumanějších je WAK1 z huseníčku. Asociuje s buněčnou stěnou (He, Fujiki a Kohorn, 1996), je svou extracelulární doménou vázán na pektiny (Wagner a Kohorn, 2001), přesněji na homogalakturonany (Decreux *et al.*, 2006) a menší oligogalakturonidy (Brutus *et al.*, 2010). Menší fragmenty pektinů vznikají hydrolyzou pektinových polymerů pomocí pektináz vylučovaných patogenem či při poranění tvořených samotnou rostlinou (Orozco-Cardenas a Ryan, 1999). Aplikace oligogalakturonidů ovlivňuje expresi celé řady genů účastnících se obranných mechanismů, a dokonce za podmínky mechanické perturbace indukuje depozici kalózy (Denoux *et al.*, 2008). Exprese A α WAK1 a jí podobné A α WAK 2 je zvýšená v oblastech poranění listů (Wagner a Kohorn, 2001), A α WAK1 ovlivňuje expresi PR 1 (Patogen Related 1) proteinu a některé příbuzné WAKy z rýže (*Oryza sativa*) se účastní obrany před houbovým patogenem (Delteil *et al.*, 2016).

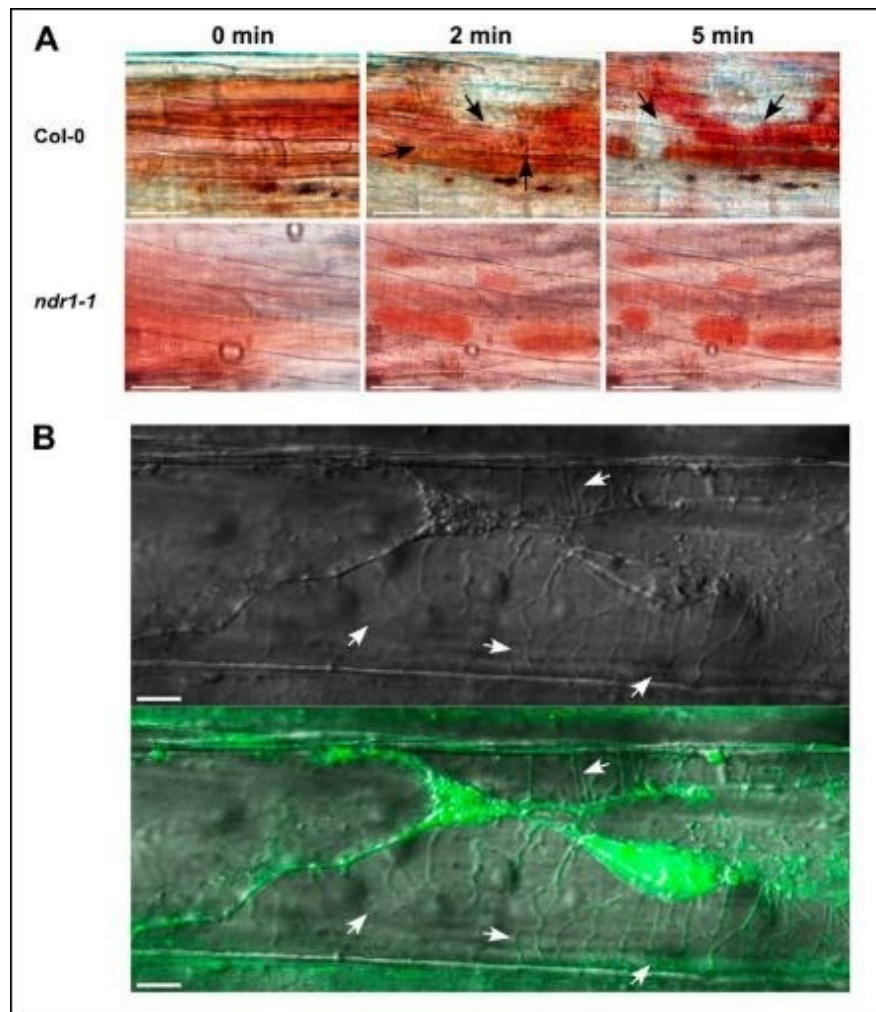
3.1.2 ILR

ILRs (Integrin-Like Receptors) je rodina kináz podobná pravým živočišným integrinům, jejichž homology však u rostlin nenalzáme. Živočišné integriny vážou RGD motiv (sekvence aminokyselin arginin – glycin – asparagová kyselina) přítomný na proteinech extracelulární matrix a zajišťují tak adhezi buněk k substrátu (Smith a Cheresch, 1990). Efekt RGD peptidu byl pozorován i na rostlinných buňkách –shluky tvořené protoplasty v mediu se po přidání peptidu rozpustily (Zhu *et al.*, 1993).

RGD peptid také ruší propojení plasmatické membrány s buněčnou stěnou (Carrasco *et al.*, 1998). Tato propojení zaujímající formu tenkých provazců natažených mezi plasmolyzovanou cytoplasmou a buněčnou stěnou se nazývají Hechtovy provazce podle svého objevitele. Vycházejí jak z plasmodezmů – mezibuněčných kanálů skrz buněčnou stěnu – tak i mimo ně, což bylo dokázáno u epidermálních buněk cibule, které z jedné své strany nemají sousední buňku a přesto z této stěny Hechtovy provazce vycházejí (Pont-Lezica, McNally a Pickard, 1993). V provazcích je přítomno ER, které se u rostlinných buněk vyskytuje kortikálně a může tak být v tomto případě součástí spojky plasmatické membrány a buněčné stěny. Dokonce bylo pozorováno větvení Hechtových provazců, které naznačuje roli též větveného ER jako lešení (Pont-Lezica, McNally a Pickard, 1993; Oparka, Prior a Crawford, 1994). Charakter

připojení Hechtových provazců není úplně jasný, ale interakce s RGD peptidem poukazuje na ILR.

Mutanti v genu pro NDR1 (Non-race-specific Disease Resistance1), integrin-like membránový protein, mají porušenou adhezi plasmatické membrány k buněčné stěně při plasmolýze (Obrázek 1) a jsou víc náchylní k infekci patogenní bakterií *Pseudomonas syringae*. V tomto případě samotný protein NDR1 nese RGD podobnou sekvenci NGD a mohl by tak signalizovat dalším proteinům vázajícími RGD sekvenci. Mutace v tomto místě však nijak neovlivnila asociaci s interagujícími proteiny či s vlastním oligomerem, způsobila ovšem snížení resistance vůči bakteriální nákaze (Knepper, Savory a Day, 2011).



Obrázek 1: A) průběh plasmolýzy epidermálních buněk cibule WT a ndr1 rostliny s viditelně větší disociací protoplastu od buněčné stěny u mutanta. B) mutantní buňka komplementovaná fluorescenčně značeným NDR1 proteinem, šipky označují Hechtovy provazce (Knepper, Savory a Day, 2011).

Kultivované kořenové buňky kukuřice (*Zea mays*) mají při přidání peptidu s RGD sekvencí pozorovatelné odchlípnutí membrány od buněčné stěny už v kontrolním mediu. V hyperosmotickém roztoku pak je jejich plasmolýza mnohem zřetelnější než u kontrolních

buněk. Použití protilátek proti $\beta 1$ podjednotce lidského integrinu ukázala na přítomnost ILR na membráně a v případě plasmolýzy přímo v místech adheze membrány ke stěně. Autoři se snažili objasnit mechanismus rozeznání nedostatku vláhy, který vede k signalizaci kyselinou abscisovou a spekulovali nad možným vlivem osmotického tlaku. Ukázalo se, že plasmolyzované buňky mají za normálních okolností zvýšenou míru syntézy abscisové kyseliny, to však neplatí při přidání RGD peptidu do media – obsah kyseliny se nezměnil (Lü *et al.*, 2007). Osmotický gradient v tomto případě způsobuje snížení turgoru, změnu mechanických poměrů kontinua plasmatické membrány a buněčné stěny, které rostlina jednoznačně zaznamenává.

AT14a je dalším kandidátním proteinem zprostředkovávajícím komunikaci mezi plasmalemou a buněčnou stěnou. Je lokalizován na membránu a u mutantů lze v hypertonickém prostředí pozorovat ztrátu spojení membrány s buněčnou stěnou. Buňky s over-expresí AT14a vytvářely shluky, mutanti nikoliv. Mutantní buňky byly oproti jiným použitým kmenům mnohem kulatější, měly zřejmě defektní tvorbu buněčné stěny a odlišné uspořádání cytoskeletu (Lü *et al.*, 2012).

Diverzita transmembránových receptorů je obrovská, receptory se často účastní receptce patogenu či signalizace spojené s imunitní odpovědí. Porušená buněčná stěna znamená otevřenou bránu patogenům a její celistvost zásadně snižuje riziko propuknutí nákazy, je proto důležité neustále všemi možnými prostředky sledovat její stav a možné mechanické poškození.

3.2 MECHANOSENSITIVNÍ KANÁLY

Dalším již zmíněným prvkem potenciálně stojícím na počátku mechanoreceptce jsou transmembránové mechanosensitivní iontové kanály (někdy zkracováno MSC). Existuje několik modelů způsobu otevírání těchto kanálů – “stretch-activated channels” se aktivují v důsledku působení tahu napínané membrány, tento způsob se jeví nejčastěji u současně prozkoumaných rostlinných mechanosensitivních kanálů; “tethered channels” jsou otevírány tahem vyvíjeným na vlákno připojené přímo ke kanálu, či k přilehlé membráně; obdobný “trapdoor” model nabízí proteinovou doménu připevněnou k cytoskeletu, či nějaké složce buněčné stěny, která funguje jako dvířka připevněná k provázku. Poslední dva modely jsou spíše spekulativní (Monshausen a Haswell, 2013), nepodařilo se mi nalézt konkrétní práce, které by se jimi zabývaly.

3.2.1 MSL

Mechanosensitivní jsou kanály z rodiny MSL (Mechanosensitive channel of Small conductance-Like), homology bakteriálního kanálu MscS (Mechanosensitive channel of Small

conductance), které v případě bakterie *E. coli* slouží k vyrovnání se s hypoosmotickým šokem, otevírají se v reakci na zvýšený turgor buňky a upouštějí z ní osmoticky aktivní rozpuštěné látky (Levina *et al.*, 1999). V případě *Arabidopsis thaliana* bylo nalezeno 10 členů rodiny lišících se svou lokalizací a funkcí v rostlinné buňce. MSL2 a MSL3 se vyskytují na plastidových membránách a pravděpodobně podobným mechanismem, jaký funguje u *E. coli*, udržují správný tvar a velikost plastidů, které jsou u dvojitého null mutanta zvětšené, kulovité, jakoby “nateklé” (Haswell a Meyerowitz, 2006). MSL8 se podílí na zdárném vývoji pylové láčky v průběhu opylení, kdy podstupuje spoustu osmotických změn – voda vstupuje do hydratovaného pylového zrna, láčka apikálně roste a je potřeba zajistit právě takový turgor, aby klíčila, ale předčasně nepraskla (Hamilton a Haswell, 2017). MSL9 a MSL10 byly lokalizovány na plasmatické membráně kořenových buněk, kde také podle patch-clamp analýzy plní funkci mechanosenzitivních kanálů aktivovaných tahem (Haswell *et al.*, 2008). Přesná struktura rostlinných MSL není známa, ovšem usuzuje se na podobnost s těmi bakteriálními, u kterých krystalografie ukazuje, že jde o homoheptamerní kanály, jejichž podjednotky mají 3 transmembránové domény a tvoří poměrně velkou cytosolickou doménu (Bass *et al.*, 2002). Specificita rostlinných MSL není do hloubky prostudovaná, je známo, že MSL10 působí eflux chloridových aniontů.

3.2.2 MCA

Dalším relativně dobře prozkoumaným mechanosensorem je MCA1 (Mid1-Complementing Activity1), integrovaný protein se zvláštní a mezi mechanosenzitivními kanály unikátní strukturou – jedna podjednotka tetrameru má jen jednu helikální transmembránovou doménu, která samotná plně postačuje pro přenos Ca^{2+} . Zbývá intracelulární část proteinu, zdá se, slouží k regulaci této funkce (Nakano *et al.*, 2011; Kamano *et al.*, 2015).

Mca1-null mutanti *Arabidopsis thaliana* nebyli schopni rozpoznat rozhraní měkkého a tvrdšího růstového media a prorůst do tvrdšího svými kořeny. U linií velmi silně over-exprimujících MCA1 docházelo k odumírání rostlin v ranných fázích vývoje. Trochu mírnější over-exprese způsobila, že mutanti rostli méně a později kvetli a plodili, což připomíná thigmomorfogenetický syndrom (Nakagawa *et al.*, 2007). O tom, že by mohlo jít o mechanoreceptory svědčí fakt, že při over-expresi MCA1 došlo také ke zvýšení exprese genu TCH3 (Touch 3) – TCH3 je gen pro jeden z CML (Calmodulin-Like) - Ca^{2+} vazebných proteinů (Sistrunk *et al.*, 2007), u něhož byla doložena zvýšená exprese u mechanicky stimulovaných rostlin (Braam a Davis, 1990) – a experiment s buňkami křeččího ovaria s vneseným genem MCA1 reagujícími na natahování zvýšením vtoku Ca^{2+} , což naznačuje možné otevírání tahem (Nakagawa *et al.*, 2007).

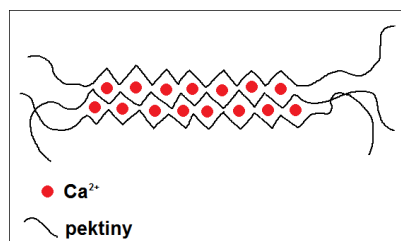
3.3 VÁPŇÍKOVÁ SIGNALIZACE

Vápníkatý kationt je obecným nástrojem buněčné signalizace, koncentrovaný mimo cytosol – u rostlin např. v buněčné stěně, uvnitř ER, vakuoly – může být otevřením příslušných vápníkových kanálů využit pro rychlý a pomíjivý, časoprostorově přesný pokyn. Změna cytoplasmatické koncentrace Ca^{2+} provází celou řadu událostí (Zhu *et al.*, 2013), mimo jiné i těch mechanosensitivních. Vápníkový signál se šíří jako vlna s různým trváním a různou pulzací a může se takto ladit na frekvenci potřebnou k aktivaci příslušné signalizační dráhy. Například pokud je jediná buňka drážděna jehlou, lze pozorovat vlévání Ca^{2+} do cytoplasmy s pouze jediným maximem, pokud je však mechanický podnět plošně větší, třeba v podobě ohnutí celého kořene, objevují se maxima dvě (Monshausen *et al.*, 2009). Stejně tak v případě gravistimulace byla zaznamenána dvě maxima, přičemž druhé z nich zmizelo po použití inhibitorů mechanosensitivních kanálů (Toyota *et al.*, 2007) jejichž role v ovlivňování cytoplasmatické koncentrace Ca^{2+} byla naznačena v předchozí kapitole.

Dále v této kaskádě stojí cytoplasmatické proteiny s Ca^{2+} vazebnými doménami, jako jsou napříč organismy velmi konzervované CaM (Calmodulin) a CML (Calmodulin-Like). U *Arabidopsis thaliana* jsou některé geny kódující tyto proteiny příznačně označeny jako Touch (TCH) geny a to kvůli zvýšené expresi v souvislosti s dotykem a jinou mechanickou stimulací (Braam a Davis, 1990; Lee, Polisensky a Braam, 2005; Sistrunk *et al.*, 2007). CaM a jim podobné proteiny mohou na základě změny cytosolické koncentrace vápníkatých kationtů rozsáhle působit na pochody v buňce díky CaM vazebné doméně vyskytující se u množství proteinů např. kináz (Picton, Klee a Cohen, 1980; Watillon *et al.*, 1993), pump (Vorherr *et al.*, 1990; Ko, Merkle a Neuhaus, 1999) a proteinů asociovaných s cytoskeletem (Sobue a Itoh, 1987; Narasimhulu a Reddy, 1998). Mutanti v genu TCH2, který kóduje CML24 odlišně odpovídají na mechanický podnět zakoušený kořenem, který má snahu růst ve směru vektoru gravitace, ale nepenetruje nakloněnou plochu tuhého agarového média. Zřejmě též funguje jako regulátor mikrotubulů, neboť mutanti je měli odlišně uspořádané (Wang *et al.*, 2011).

Mimo zprostředkovaného efektu vápníku pomocí CaM a CML mají často proteiny přímo Ca^{2+} vazebnou doménu.

Přítomnost Ca^{2+} ovlivňuje vazebné vlastnosti výše rozebíraného receptoru buněčné stěny WAK1 (Decreux a Messiaen, 2005). Pektiny, na které se údajně váže, zaujímají v prostředí bohatém na Ca^{2+} tzv. egg-box konformaci připomínající tvar plata na vejce, kde kationt sedí jako vejce v platu tvořeném dlouhými řetězci pektinů (Obrázek 2) (Grant *et al.*, 1973).



Obrázek 2: model egg-box konformace pektinů v přítomnosti vápenatých iontů (podle G. Grant et al., 1973).

Vápník je v rámci rostlinné signalizace téměř nevyhnutelná křižovatka a ačkoliv v této kapitole nebude více rozebírán, další přiblížení jeho funkcí bude následovat v kapitolách souvisejících s cytoskeletem.

4 ROLE CYTOSKELETU V ROSTLINNÉ MECHANORECEPCI

4.1 STRUKTURY SOUVISEJÍCÍ S MECHANORECEPCÍ

Cytoskelet je dynamická prostorová síť zaujímající značné množství cytoplazmy, mezi eukaryoty vysoce konzervovaná. U prokaryot vzhledem k absenci větších endomembránových systémů, které u eukaryot cytoskelet rozsáhle spravuje, není cytoskeletární systém moc rozvinut. Prokaryotické proteiny podobné eukaryotickým jsou však známy – ParM podobný F-aktinu, btubA a btubB monomery homologické tubulinu (Ent *et al.*, 2002; Jenkins *et al.*, 2002).

U rostlin tvoří cytoskelet aktinová filamenta a mikrotubuly, obě složky mají společné to, že se skládají z globulárních monomerů, které k polymeraci využívají NTP – aktin ATP a tubulin GTP, jsou polarizované – konce označujeme jako (+) a (-) konec a jejich interakce se zbytkem buňky jsou zprostředkovány asociovanými proteiny. Mají stěžejní úlohu v buněčném dělení a polohy organel v buňce, váčkovém transportu, udávají tvar buňky a další.

Pro pochopení molekulárních mechanismů mechanorecepce je důležité poznávat i molekulární mechanismy odpovědi na mechanický stimul. Ta musí po mechanoreceptci nutně následovat a doplňuje tak celou signalizační dráhu od stimulu po odpověď a proto se budu v následujícím textu zabývat i jí.

4.1.1 KORTIKÁLNÍ MIKROTUBULY

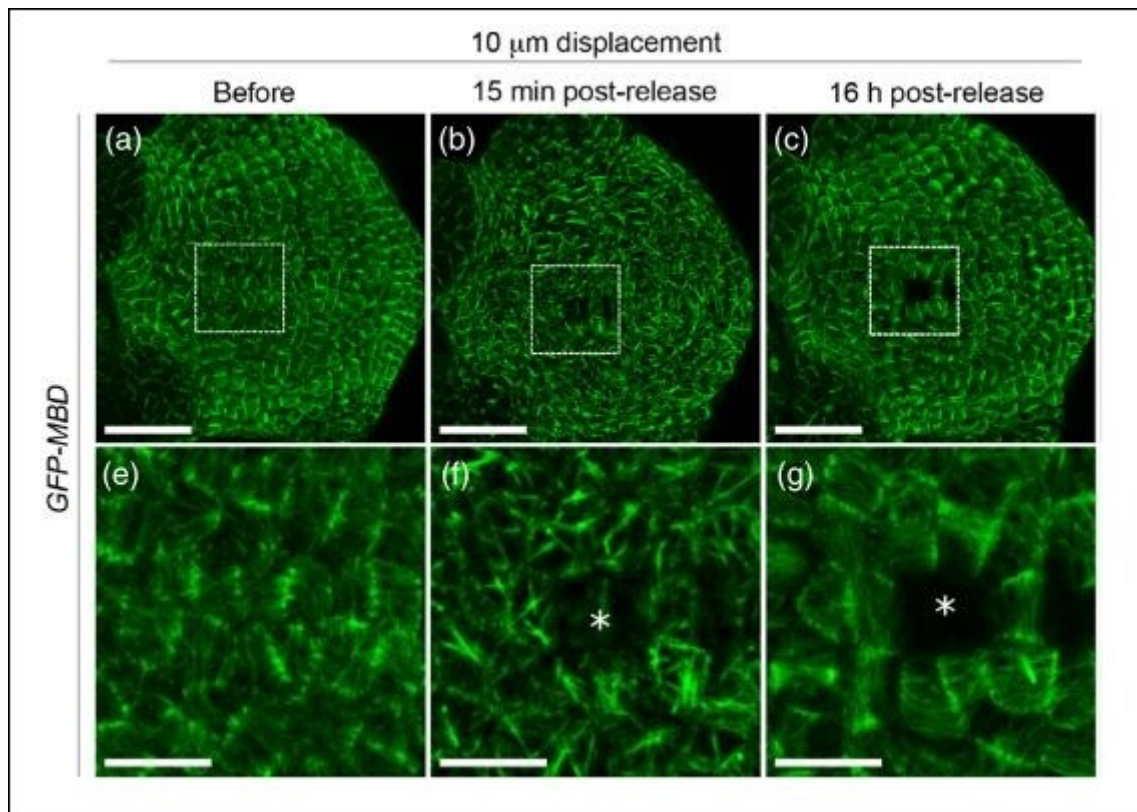
Kortikální mikrotubuly jsou typ mikrotubulárního cytoskeletu typický pro rostliny. Vytvářejí v prostoru přiléhajícím zevnitř k plasmatické membráně rovnoběžné provazce, podél nichž jsou deponována celulózová vlákna. Ve směru kolmém na celulózová vlákna je pak buňka schopna elongovat. Celulóza je syntetizována z UDP-glukózy komplexem proteinů celulóza syntáz (CESA), procházejících skrz membránu, ty ovšem kopírují svým pohybem uložení kortikálních mikrotubulů pod membránou. Buňka tak může regulovat strukturu a tím odolnost buněčné

stěny pomocí cytoskeletálních elementů. Celý syntetizující komplex se skládá z několika dalších proteinů, například CSI (cellulose syntase interactive protein) poutající CESA k mikrotubulům (Li *et al.*, 2012), nebo extracelulární transmembránový COBRA spojující buněčnou stěnu s plasmalemou (Fernandez *et al.*, 2005).

Kortikální mikrotubuly se orientují na základě mechanického podnětu, tahového a tlakového stresu v buňce, čímž ovlivňují, jakým směrem může buňka růst a to jak roste, jak na ni působí tah a tlak. Jedná se o zpětnovazebnou smyčku regulující morfogenezi nejen vrcholového meristému, ale třeba i vývoj kališních lístků u *Arabidopsis thaliana* (Hervieux *et al.*, 2016).

Pod tlakem vyvíjeným na pletivo se kortikální mikrotubuly orientují napříč buňkami kolmo na vyvíjený tlak, v případě vytvoření díry v pletivu zabitím jedné, nebo několika buněk uprostřed dochází k vytvoření cirkulární struktury (Obrázek 3) (Hamant *et al.*, 2008; Jacques, Verbelen a Vissenberg, 2013; Berquand *et al.*, 2014; Louveaux, Rochette, *et al.*, 2016). Reorientace mikrotubulů u adzuki fazole (*Vigna angularis*) nastává u ohybu stonků jak při mechanickém ohnutí, tak při gravitropickém. V obou případech se ukázalo, že inhibice mechanosenzitivních tahem aktivovaných kanálů ruší i reorientaci kortikálních mikrotubulů, naopak inhibice auxinu nemá na mikrotubuly vliv (Ikushima a Shimmen, 2005). Dynamika mikrotubulů je narušena mutací v genu pro protein katanin, ten je znám tím, že v přítomnosti ATP stříhá polymerující mikrotubuly (McNally a Vale, 1993). Mutantní rostliny v kataninu vykazují sníženou reorientaci kortikálních mikrotubulů a změnu v růstových vzorcích buněk vrcholového meristému v odpovědi na mechanický stres oproti WT (Uyttewaal *et al.*, 2012).

U reorientovaných mikrotubulů lze pozorovat zvýšení svazčitosti – oproti běžným okolnostem se jednotlivé větvené mikrotubuly shluknou do orientovaných silnějších svazků, tím více pak reorientace vynikne. Při pokusu o vytvoření kvantitativních metod, které by mohly sloužit při výzkumu kortikálních mikrotubulů byla svazčitost u vrcholových meristémů pod tlakem opravdu navýšena (Louveaux, Rochette, *et al.*, 2016). Kromě mutantu v kataninu byl použit i mutant ve specificky rotinném proteinu SPIRAL2, antagonistovi kataninu, regulujícímu tak kataninovou stříhací aktivitu (Wightman *et al.*, 2013). Použité fluorescenční markery však podle všeho v ohledu svazkování způsobují artefakty, navíc cílem studie bylo ukázat funkčnost metody, ne změny v mikrotubulech, k čemuž by se po náležitém přizpůsobení ovšem použít dala (Louveaux, Rochette, *et al.*, 2016).



Obrázek 3: buňky apikálního meristému huseníčku s fluorescenčně značenými mikrotubuly, na které je vyvíjen tlak. (e-g) jsou přibližné výřezy z (a-c). (a, e) situace před započítím tlačením, (b, f) situace 15 minut po odstranění tlaku, (c, g) situace 16 hodin po odstranění tlaku. Hvězdička značí prasklou buňku. Měřítko = 30 μm (Louveaux et al., 2016).

Pokus s jiným typem mechanického stimulu – tlakem vyvolaným μm wolframovou či skleněnou jehlou připomínajícím penetrující parazitickou hyfu, tzv. nanoindentační experiment – ukazuje jiné chování mikrotubulů. Síť kortikálních mikrotubulů v místě dotyku depolymerovala a utvořil se oblak GFP-tubulinu, který se při přesouvání jehly po povrchu pohyboval s ní. Oblak byl zpočátku obklopen zónou bez signálu, ta jím byla v průběhu půlhodiny vyplněna. Zóna bez signálu je ve chvíli své existence lemována prstecem mikrotubulů s poměrně silnějším signálem, což by mohlo poukazovat na svazky (Hardham, Takemoto a White, 2008). Prsteneček je v tomto případě možná homologický s cirkulárními strukturami vyskytujícími se u buněk lemující zabitě buňky v ablačních experimentech a mohlo by být na místě i za tímto jevem hledat činnost kataninu. V *in vitro* pokusu byl ukázán negativní vliv Ca^{2+} na stříhací a ATPázovou aktivitu. Sami autoři zmiňují, že tento výsledek jde proti předpokladům, že by katanin mohl v důsledku otevření mechanosenzitivních kanálů a zvýšení koncentrace vápníků být aktivnější a působit tak reorganizaci mikrotubulů. Jedno z vysvětlení, které nabízejí je, že jde o mechanismus bránící rapidní depolymerizaci mikrotubulů při náhodném zvýšení intracelulární koncentrace vápníku např. v důsledku poranění (Iwaya et al., 2012). Pozorovaná

počáteční depolymerace by mohla být homologická depolymeraci mikrotubulů pozorované u houbou napadených buněk petržele (Gross *et al.*, 1993).

4.1.2 PREPROFÁZICKÝ PRSTENEC

Preprofázický prstenec je vlastně zvláštní funkcí kortikálních mikrotubulů. Než se buňka vůbec začne dělit, lze pozorovat prstenec mikrotubulů (Burgess a Northcote, 1967), který posléze zmizí a na jeho místě se ve fázi cytokineze objeví fragmoplast, přechodná struktura, jejímž nejvýraznějším prvkem jsou dvě antiparalelní řady mikrotubulů tvořící centrifugálně rostoucí prstenec. Spolu s dalšími elementy jako jsou aktinová filamenta, váčky původem z ER i GA pak ve středu rozestupujícího se prstence vzniká buněčná deska, která nakonec oddělí nově vznikající buňky.

Kortikální mikrotubuly reagují na mechanický podnět a ten tudíž může ovlivňovat i rovinu buněčného dělení, jejíž proměnná poloha je jedním ze způsobů, jak dosáhnout variabilní morfologie – jak bylo zmíněno výše, v případě rostlin zásadního prostředí přizpůsobení se prostředí.

Kultivované buňky tabáku a jejich protoplasty zavedené do agarového bločku, na který bylo působeno silou, opravdu signifikantně měnily rovinu svého dělení tak, aby byla buněčná deska orientována v místě, kde hrozí nejmenší poškození působícími silami (Lynch a Lintilhac, 1997).

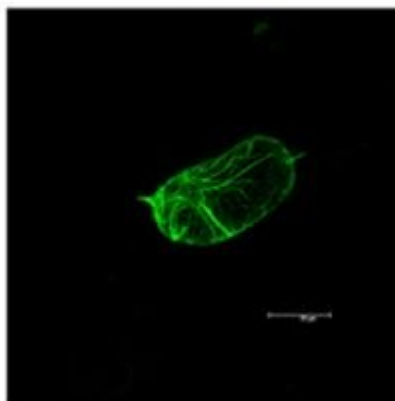
I v případě buněk zasazených do kontextu pletiva bylo ukázáno, že je rovina dělení rovnoběžná se směrem největšího tahového stresu. Při ablaci buněk se orientace buněčné desky sousedních buněk může změnit od umístění preprofázického prstence před ablaci a jeho role v určování roviny dělení a souvislost s mechanorecepcí bude ještě třeba více prostudovat (Louveaux, Julien, *et al.*, 2016).

4.1.3 AKTINOVÝ CYTOSKELET

Na síti aktinových filament závisí struktura a pohyb jádra, endomembránového systému (Marthur, Marthur a Hülskramp, 2002; Hasezawa *et al.*, 2010), semiautonomních organel, v případě kořenových vlásků a pylové láčky pak podstatně i tvar a růst buňky.

Pozorování podobná těm s meristémy a v nich na tlak reagujících kortikálních mikrotubulů nebyla u aktinu provedena a nelze tak srovnat jejich chování v těchto případech. K dispozici jsou ale studie prováděné na buňkách v kulturách, pro které byla mechanickým stimulem změna turgoru způsobená použitím hyper- a následně hypoosmotického média. Vystavení buňky hyperosmotickému prostředí vede k úniku vody z protoplastu, ke ztrátě turgoru a zmenšení objemu protoplastu, který se odchlipuje od buněčné stěny. Při velmi silné plasmolýze zaujímá jako zahuštěná kulička jen zlomek původního prostoru, ale zůstává k buněčné stěně připojen množstvím tenkých Hechtových provazců (obrázek 4). Aktinová

filamenta zůstala v případě plasmolýzy připojena k buněčné stěně jako součást Hechtových provazců. Při vpravení buněk do destilované vody došlo k rychlému zvýšení turgoru, což vedlo k rozsáhlému cytoplasmatickému proudění a následně i částečné depolymeraci mikrofilament. Mikrotubuly při plasmolýze depolymerují, podobně jako v nanoindentacních pokusech (Shi *et al.*, 2011).



Obrázek 4: buňka *Arabidopsis thaliana* ze suspenzní kultury po 5 minutách v hyperosmotickém roztoku 1mol/L manitolu, fluorescenčně značený aktin vystupuje v místech, kde jsou Hechtovy provazce (Shi *et al.*, 2011).

Častěji je aktinový cytoskelet zkoumán v souvislosti s obranou před houbovými a jim podobnými patogeny, které se aktivně účastní (Hardham, Jones a Takemoto, 2007). Použití aktinové drogy cytochalasinu u tabákových BY-2 buněk způsobilo, že nekompatibilní plíseň *Erysiphe pisi* za běžných okolností neschopna buňky penetrovat a nakazit tuto schopnost získala (Kobayashi a Hakuno, 2003). Na funkčním aktinovém cytoskeletu závisí pozorované přesuny cytoplasmy u kultivovaných buněk petržele napadených houbou *Phytophthora infestans* – při penetraci buňky se objevuje cytoplasmatické proudění a jádro se i s okolní cytoplasmou přesouvá pod místo průniku hyfy (Gross *et al.*, 1993).

Nanoindentacní experimenty na huseníčku s μm wolframovou a skleněnou jehlou předvádějí, jak aktinový cytoskelet přímo pod skleněnou jehlou vytváří jakousi záplatovitou strukturu (tzv. actin patch) – oblast hustě nahloučených, “zamotaných” mikrofilament. V případě použití preciznější wolframové jehly též vzniká, během 20 minut se však redukuje a lze pozorovat, jak se svazky mikrofilamentů – aktinové “kabely” – koncentrují do místa kontaktu (Hardham, Takemoto a White, 2008). Kvantifikace této odpovědi mikrofilament ukazuje, že se dostavuje v řádech sekund až několika málo minut a v reakci na tlaky velikostí srovnatelných s tlakem, který vyvíjí hyfa (Branco *et al.*, 2017).

Endomembránové struktury jako ER a peroxisomy v oblasti pod jehlou agregovaly. ER vytváří kruhový difuzní signál, který následuje pohybující se jehlu a při jejím odstranění rychle mizí. Peroxisomy vytváří pod místem kontaktu diskrétní seskupení (Hardham, Takemoto a White,

2008). Bylo by zajímavé podívat se, jak spolu aktinová vlákna a na nich závislé struktury během takových experimentů kolokalizují.

Přiblížení organel, jako jsou ER, GA a peroxisomy s funkcemi jako je proteosyntéza, syntéza komponent buněčné stěny, či tvorba kyslíkových radikálů k místu pocíťovaného tlaku, vytváří první linii v boji proti fytopatogenu.

4.2 STYČNÉ BODY BS-PM-C KONTINUA

4.2.1 FORMINY

Problematika forminů (FH proteinů) je kvůli jejich výskytu napříč eukaryoty, množství funkcí a forem poněkud komplikovaná. Obecně je všem forminům společná schopnost nukleace a elongace aktinových filament, pro mé záměry je také důležitá způsobilost některých z nich asociovat s membránami. Všechny forminy vlastní FH1 a FH2 (formin homology) domény. FH1 je na prolin bohatá, mimo jiné zprostředkuje interakce s profilinem – proteinem vázajícím se na aktinové monomery a modulující tak elongaci a depolymeraci mikrofilament, FH2 se váže na (+) konec mikrofilamentu, kromě těchto dvou domén je možné nalézt i další jiné, již specifické.

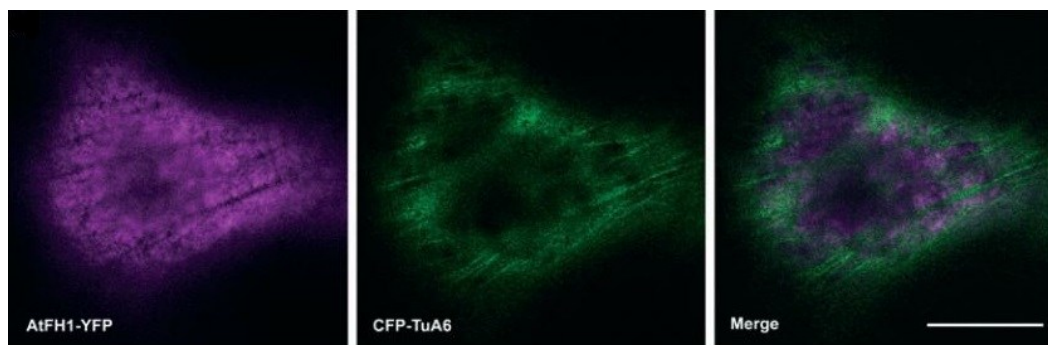
U rostlin nacházíme forminy třídy I a II obecně a třídy III u mechů a plavuní. Sekvence forminů třídy I prozrazuje možnou transmembránovou doménu (Banno a Chua, 2000; Cvrčková, 2000), třídy II doménu se schopností vázat se na membránu periferně (Cvrčková *et al.*, 2004).

Při zaměření se na funkce FH1 a FH2 domén *AtFH1*, forminu třídy I nalezeného v huseníčku, bylo zjištěno, že samotná FH2 doména se chová jako čepičkující protein, blokuje elongaci na (+) konci a soupeří o vazebné místo s jiným známým čepičkujícím proteinem CP (Capping Protein), v přítomnosti FH1 domény se tato blokáce umírňuje na pouhé snížení míry elongace. FH1 zprostředkovává nukleaci z aktin-profilinového komplexu, zřejmě je schopna se vázat na mikrofilamentum z boku a má tak i svazující funkci (Michelot *et al.*, 2005).

AtFH1 také propojuje cytoskelet v cytoplasmě s prostorem apoplastu. Použití zkráceného proteinu ukázalo, že má *AtFH1* poblíž svého N konce extracelulární doménu. FRAP metodou bylo zjištěno, že je celý protein jen velmi málo mobilní a k zajištění této imobility postačuje malá na prolin a serin bohatá část extracelulární domény (Martinière *et al.*, 2011), svým SPPPP motivem podobná extesinu, extracelulárnímu proteinu (Banno a Chua, 2000).

Při over-expresi *AtFH1* došlo ke změnám ve struktuře aktinového cytoskeletu – v případě tabákové (*Nicotiana benthamiana*) listové epidermis se namísto dlouhých aktinových kabelů objevila hustá neuspořádaná síť jednotlivých mikrofilament. Tato disturbance způsobila i snížení pohyblivosti GA, kterou na aktinovém cytoskeletu závisí (Martinière *et al.*, 2011). V tabákových pylových láčkách over-exprese *AtFH1* také zapříčinila pomnožení aktinových filament oproti WT, navíc byly pylové láčky v mnoha případech defektní, což poukazuje na porušenou exocytózu a následně chybnou tvorbu buněčné stěny (Cheung, 2004).

Fluorescenčně značený *AtFH1* je na plasmatické membráně lokalizován difuzně, ovšem jsou patrné proužky bez signálu, které pak odpovídají lokalizaci fluorescenčně značených kortikálních mikrotubulů. Při depolymerizaci aktinu latrunkulinem B nenastaly žádné pozorovatelné změny, při depolymerizaci kortikálních mikrotubulů pomocí oryzalinu proužkování zmizelo. Vznik *AtFH1* membránových domén tedy nepodléhá aktinovému cytoskeletu (Obrázek 5) (Martinière *et al.*, 2011). Z výše popsaných pozorování vidíme, že je spíše naopak struktura aktinové sítě závislá na stavu, v jakém se nachází *AtFH1* v buňce a zřejmě existuje asociace *AtFH1* s mikrotubuly.

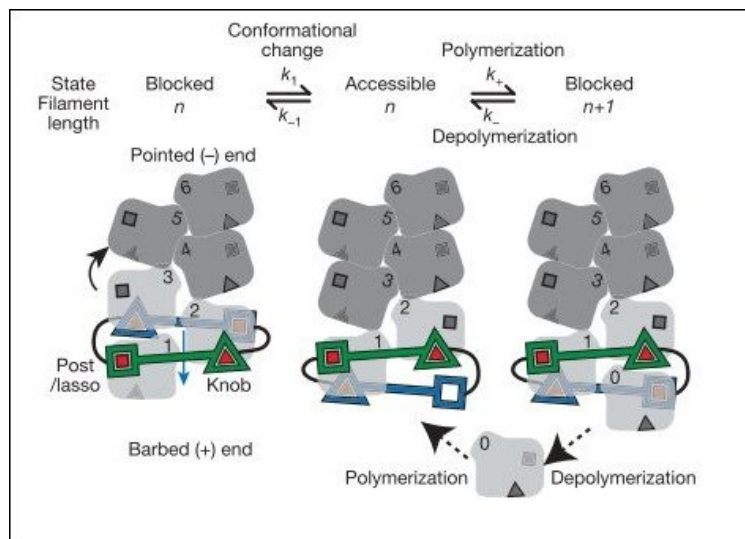


Obrázek 5: lokalizace fluorescenčně značeného *AtFH1* na membráně (fialová) a kortikálních mikrotubulů (zelená) jsou komplementární (Martinière *et al.*, 2011).

U forminu *AtFH4* je interakce zároveň s aktinem a mikrotubuly lépe prostudovaná. Tento formin vlastní GOE doménu, usazenou v oblasti mezi FH1 a transmembránovou doménu. Její funkce byla dlouho záhadou, až dokud se nezjistilo, že se proteinové konstrukty s vloženou GOE doménou váží k mikrotubulům *in vitro* a kompletní *AtFH4* pak i *in vivo*. FH2 doména zde nukleuje aktin. Model navržený v této studii předpokládá ukotvení rostoucích mikrofilament k mikrotubulům a plasmatické membráně (Deeks *et al.*, 2010).

Některé živočišné a kvasinkové forminy vyvolávají svou čepičkující/mikrofilamenta elongující činností na mikrofilamenta tah a tato činnost je ovlivňována i vnějšími zdroji tahové síly. Tyto forminy jsou charakterizovány jako procesující (neboli kráčivé) čepičkující proteiny, v dimeru se navážou na (+) konec mikrofilameta, ten obejmou jakousi sponou vytvořenou FH2 hemidoménami (Obrázek 6), která dovoluje připojení forminů k (+) konci, chrání ho tak před

jinými čepičkujícími proteiny, ale zároveň umožňuje jeho elongaci, tím že kráčením uvolňuje (+) konec k navázání dalších podjednotek (Zigmond *et al.*, 2003; Otomo *et al.*, 2005).



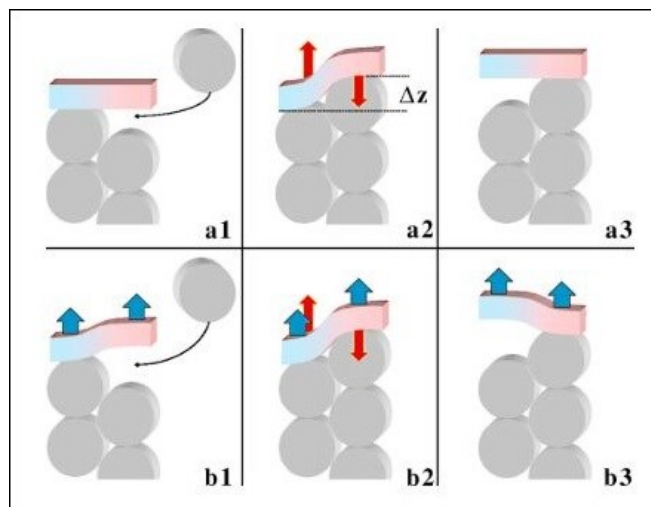
Obrázek 6: model dynamiky (+) konce aktinového filamenta pod působením FH2 domény procesujícího forminu (Otomo *et al.*, 2005)

Myšší formin *mDia1* (Diaphanous1) podle matematického modelu kráčí díky svým elastickým vlastnostem, kdy připojení aktinového monomeru způsobí elastickou deformaci spony a ta od (+) konce oddálí druhou část hemidimeru a udělá tak prostor nové podjednotce (Obrázek 7). Model předpokládá schopnost forminu vyvíjet tah a zvyšovat tak míru elongace mikrofilament (Kozlov a Bershadsky, 2004). V pozdějším pokusu byl *mDia1* umístěn do proudové komůrky – zařízení v němž je formin ukotven k podkladu a kolem něj proudí roztok, který tak táhne vznikající aktinové vlákno a vyvolává tah na jeho spojení s forminem. Ukázalo se, že při proudění opravdu dochází ke zvýšení míry elongace, navíc tento formin působí proti depolymerizaci volných (+) konců zapříčiněné profilinem (Jégou *et al.*, 2011; Jégou, Carlier a Romet-Lemonne, 2013). Se zvyšující se silou tahu se snižuje citlivost ke koncentraci profilinu v roztoku, na které běžně závisí míra depolymerace volných (+) konců (Jégou, Carlier a Romet-Lemonne, 2013).

Studie kvasinkového (*Schizosaccharomyces pombe*) procesujícího forminu Cdc12 (Cell division cycle12), použila jinou metodu vyvolání tahu na aktinové vlákno a na něj napojený formin. Jedná se o soustavu dvou kuliček, na jedné je připojen formin a na druhé jsou hlavy myosinového motoru Myo2 (Myosin-2). Formin nukleuje a elonguje vlákno, které je později zachyceno myosinovými motory a přitahováno až do splynutí obou kuliček, což napodobuje splývání prekurzorů kontraktálního prstence zásadního pro dělení buněk kvasinky. V případě forminu Cdc12 došlo při působení tahu k snížení míry elongace, k tomuto efektu stačí je velmi

malá působící tahová síla, tak malá, že ani nenapíná dotyčné aktinové vlákno. Mechanosensitivním prvkem je podle všeho FH1 doména Cdc12c. Ta podle předpokladu v této konfiguraci vypadá jako řetízek natažený mezi kotvící částí forminu a FH2 doménou vázající mikrofilamentum. Při působícím tahu se tento řetízek také natahuje, čímž se mění jeho vzdálenost od FH2 domény, které “podává” aktin-profilinové jednotky, a také se natahováním mohou odhalovat na prolin bohaté úseky a tím regulovat aktivitu FH1 domény (Vavylonis *et al.*, 2006; Zimmermann *et al.*, 2017). V tomto případě lze uvažovat důvod pro snížení míry elongace – pokud je třeba, aby se připojené prekurzory kontraktálního prstence přiblížily a splynuly, nesmí se vlákno mezi nimi nadále prodlužovat (Zimmermann *et al.*, 2017).

Výše zmíněné příklady z jiných říší, než je ta rostlinná, mohou poskytovat inspiraci pro výzkum mechanosensitivních vlastností rostlinných forminů. Aktuálně byl nalezen procesující formin i u huseníčku. Tento formin třídy II zvaný AtFH14 má prokazatelnou svazkující a nukleující aktivitu, čepičkuje (+) konec mikrofilamentu, dokonce o něj soupeří s jiným čepičkujícím proteinem ABP29 (Actin Binding Protein 29) a za přítomnosti profilinu vlákno elonguje (Ren *et al.*, 2016). Zda i on působí na vlákno tahem a na tah jakkoliv reaguje, zůstává otázkou dalšího studia.



Obrázek 7: stavy, kterými prochází spona forminu při elongaci aktinového vlákna se zohledněním vlivu elastických deformací. $\Delta z = 2,75$ nm - relativní vzdálenost, o kterou se vzdálí hemidimery, červené šipky znázorňují elastickou sílu způsobenou deformací proteinu, modré šipky tahovou sílu, kterou působí hemidimer na mikrofilamentum (Kozlov, Bershadsky, 2004).

Forminy představují propojení napříč celým BS-PM-C kontinuem, propojují extracelulární prostory s membránou a cytoskeletem. Zřejmě jsou místem, kde se setkává mikrotubulární cytoskelet s aktinovým. Nahlédnutí do světa živočišných buněk nabízí přímou souvislost s vnímáním mechanických podnětů.

4.2.2 IQD

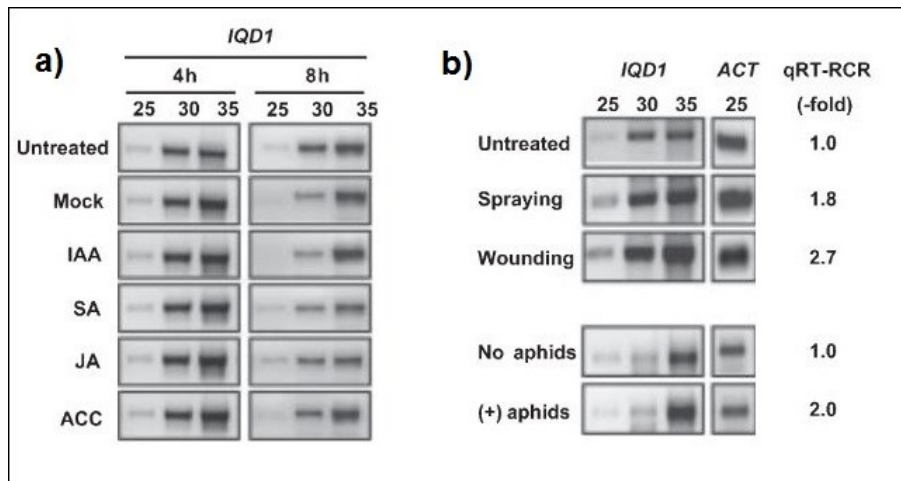
IQD (IQ67 Domain) je rodina proteinů interagujících s CaM, rozsáhlost rodiny ilustruje počet členů u několika vybraných rostlin - u huseníčku 33 členů (Abel, Savchenko a Levy, 2005), 35 u čínského zelí (*Brassica rapa* ssp. *Pekinensis*) (Yuan *et al.*, 2019), 29 u rýže (*Oryza sativa*) (Abel, Savchenko a Levy, 2005), 29 u bambusu (*Phyllostachys edulis*) (Chen *et al.*, 2017), 40 u topolu (*Populus trichocarpa*) (Ma *et al.*, 2014) a dokonce 67 u soji (*Glycine max*) (Feng *et al.*, 2014).

Společným znakem všech těchto proteinů je přítomnost jedné či více kopií IQ67 domény, jež je zodpovědná za vazbu CaM k IQD proteinům (Abel, Savchenko a Levy, 2005). Co se týče vlivu Ca^{2+} iontů na tuto vazbu, testované *AtIQD5* a *AtIQD20* proteiny a CaM asociovaly i v jejich nepřítomnosti, zdá se však, že je míra asociace zvětšena pokud Ca^{2+} ionty v mediu jsou (Abel, Savchenko a Levy, 2005; Mitra *et al.*, 2019). V případě *AtIQD1* je pak vazba proteinu s CaM na Ca^{2+} v mediu naprosto závislá (Levy *et al.*, 2005).

Rozsáhlá studie z roku 2017 ukázala, že jednotlivé IQD proteiny z huseníčku exprimované v tabákových listech jsou různě lokalizované na plasmatické membráně, v okolí jádra, přímo v jádře a bez výjimky na mikrotubulech. Over-exprese některých IQD proteinů se projevila na fenotypu dále studovaných rostlin huseníčku. IQD11 a IQD16 byly na kortikálních mikrotubulech lokalizovány podobně a jejich over-exprese způsobila elongaci epidermálních buněk i samotných nadzemních orgánů, u nichž byla pozorována též spiralizace jedním směrem. Over-exprese IQD14, který byl vybrán jako kontrola pro svůj odlišný způsob lokalizace na kortikálních mikrotubulech oproti IQD11 a IQD16, pak zapříčinila pouze stáčení orgánů bez jejich elongace. Jednotliví členové rodiny také různým způsobem rekrutují CaM do buňky a mohou tak různě vstupovat do vápníkové signalizace v buňce (Bürstenbinder *et al.*, 2017).

Z důvodu velkého množství funkčně redundantních proteinů není snadné získat *null* mutanty s fenotypovým projevem. Mutanti huseníčku v IQD5 však vykazují pozměněný tvar epidermálních buněk. Ve srovnání s WT mají méně mělkých laloků a jsou celkově kulatější a to jak u děloh, tak i u pravých listů (Mitra *et al.*, 2019). Mutace v IQD5 má vliv na organizaci a dynamiku kortikálních mikrotubulů (Liang *et al.*, 2018) a podle letošní studie je fenotyp důsledkem redukované depozice celulózy do buněčné stěny (Mitra *et al.*, 2019). Jak již bylo výše zmíněno, IQD5 asociuje s CaM2 z huseníčku a obsazení kortikálních mikrotubulů CaM2 je přítomností IQD5 přímo podmíněné. Navíc bylo zjištěno, že zvýšená koncentrace Ca^{2+} působí na epidermální buňky podobně jako mutace v genu pro IQD5 a jedná se tak zřejmě o demonstraci vlivu vápníkové signalizace závislé na CaM na morfogenezi epidermálních buněk. (Mitra *et al.*, 2019).

IQD proteiny také figurují v obraně před herbivory. Bylo zjištěno, že IQD1, též prokazatelně vázající CaM, má u huseníčku vliv na syntézu glukosinolátů – látek s pesticidními účinky, které při poškození buněk hydrolizují a uvolňují těkavé látky nepříjemné herbivorům. Over-exprese genu IQD1 způsobila disregulaci syntézy glukosinolátů u huseníčku. Housenky kovolesskele cizokrajného (*Trichoplusia ni*) žeroucí na těchto rostlinách byly signifikantně menší a vážily méně než ty, které žraly na WT a jiných mutantních rostlinách s nefunkčním IQD1. Při snaze zjistit, zda je exprese IQD1 ovlivněna některým z fytohormonů, které vedou k hromadění některých glukosinolátů, se ukázalo, že je na nich nezávislá, ale za to reaguje svým zvýšením na kontrolní podmínky – postřik čistou vodou (Obrázek 8). Zvýšená exprese byla pozorována i při napadení semenáčků mšicemi, kde také dochází k mechanickému podráždění (Levy *et al.*, 2005). IQD1 je doposud jediný z genů IQD rodiny s přímo doloženou souvislostí s mechanorecepcí, jak ale výše zmíněné práce ukazují, IQD proteiny jednoznačně působí v rámci BS-PM-C kontinua a integrují do něj vápníkovou signalizaci.

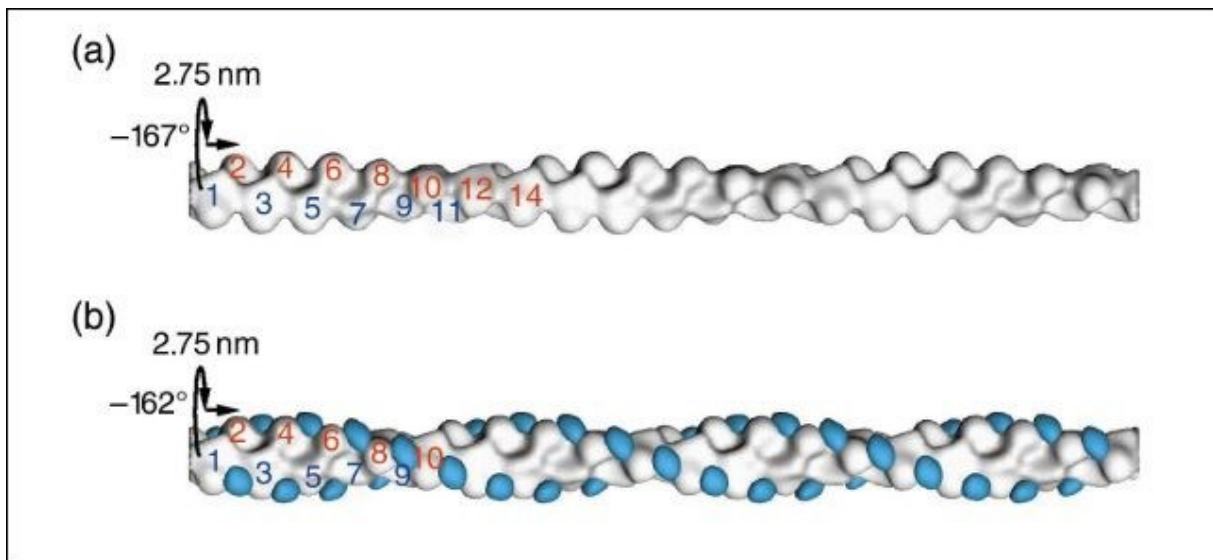


Obrázek 8: a) semikvantitativní RT-PCR analýza ukazující stav exprese IQD1 mRNA v nadzemních částech – u neošetřených rostlin, rostlin postříkaných pouze vodou a dále roztoky různých fytohormonů. b) semi- a kvantitativní RT-PCR analýza ukazující stav a řádovou změnu v expresi IQD1 mRNA a mRNA pro aktinovou podjednotku v nadzemních částech rostlin po různých mechanických stimulech, čísla nad sloupci značí počet cyklů (Levy *et al.*, 2005).

4.3 DALŠÍ PROTEINY SOUVISEJÍCÍ S MECHANORECEPCÍ

4.3.1 ADF/COFILIN

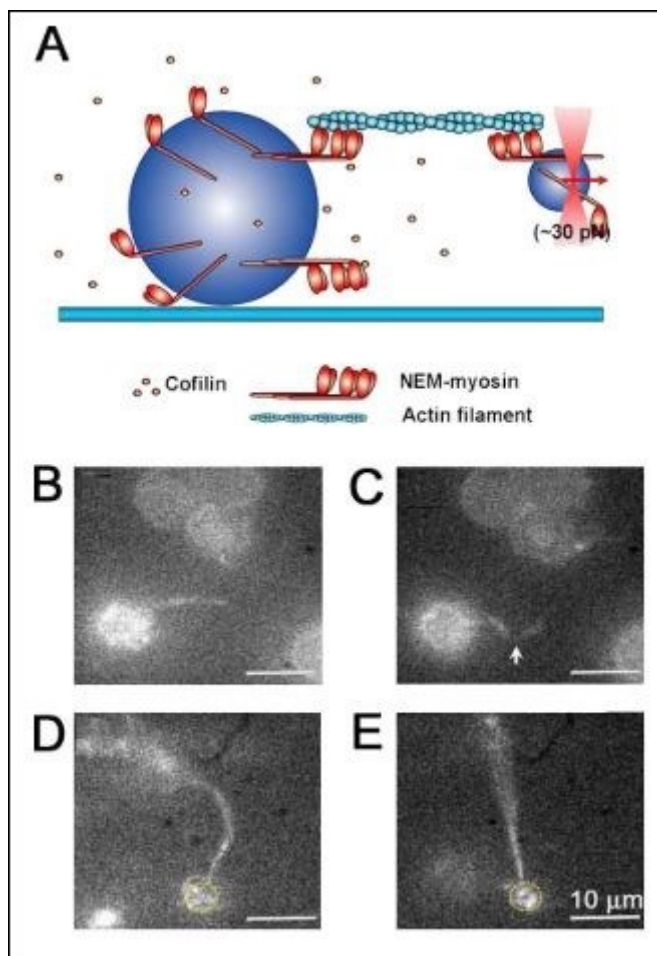
ADF/Cofilin (Actin Depolmerizing Factor/Cofilin) je rodina eukaryotních aktin vázajících proteinů (Bamburg, McGough a Ono, 1999). Vazba ADF/Cofilinu na mikrofilamentum způsobuje změnu v jeho torzních vlastnostech – vlákno se více spiralizuje aniž by se však zkracovalo (Obrázek 9) (Mcgough *et al.*, 1997) a v místech, kde je hranice mezi spiralizovanější částí vlákna a ADF/Cofilinem neovlivněnou částí, dochází ke zlomům, resp. ke stříhání vlákna cofilinem (Yu *et al.*, 2009). Další z vlastností ADF/Cofilinu je zvýšení flexibility vlákna, jež je vysvětlováno snížením vazebných interakcí aktinové podjednotky 2, která váže ADF/Cofilin, s ostatními aktinovými podjednotkami (Yu *et al.*, 2009). ADF/Cofilin též způsobuje depolymerizaci obou konců mikrofilamenta. Váže se preferenčně na ADP- a ADP-Pi-aktinové podjednotky a tak se uvažovalo hlavně o jeho depolymeračním efektu na (-) konec aktinového vlákna a zvýšení míry depolymerace pomocí stříhání vláken a vytváření více (-) konců. Ukažalo se však, že ve spolupráci s CP (Capping Protein), depolymeruje i (+) konec. CP čepičkuje (+) konec mikrofilamenta a znemožňuje tak jeho další polymerizaci, nemohou přibývat nové ATP-aktinové podjednotky a staré postupně disociují až na ADP-aktin, na který se naváže i ADF/Cofilin, CP odpadne a (+) konec také depolymeruje (Wioland *et al.*, 2017).



Obrázek 9: model efektu cofilinu na aktinové filamentum (Bamburg, McGough a Ono, 1999).

Zajímavá je údajná funkce ADF/Cofilinu jako mechanosensoru. Ve studii z roku 2011 byla využita metoda optické pinzety, kdy byla jednotlivá mikrofilamenta pomocí myosinu připojena oběma konci ke kuličkám – jedné větší ukotvené k podkladu a druhé menší mobilní, se kterou bylo pohybováno optikou pinzety. Při vyvíjení tahu na vlákno taháním za menší kuličku se stříhání cofilinem opožďovalo, či téměř vůbec nenastávalo a čím větší byl tah, tím spíše ke

stříhání nedošlo (Obrázek 10). Dále se ukázalo, že fluorescenčně značený cofilin preferenčně asociuje s povolenými vlákny oproti napnutým. Autoři tento fenomén diskutují jako možný důsledek změny torze při napnutí vlákna. Cofilin, jak je zmíněno výše, mění helikální strukturu vlákna a je pravděpodobné, že cofilinem změněná spiralizace zvýhodňuje přilehlá místa k vazbě dalších cofilinových jednotek, pokud by tomu tak bylo, počáteční vazba by byla díky přirozené fluktuaci tvaru mikrofilamentu, které se různě ohýbá a natahuje. Tato fluktuace může být při mechanickém natažení výrazně snížena a znemožňovat tak vazbu “prvních” cofilinů (Hayakawa, Tatsumi a Sokabe, 2011).



Obrázek 10: Schéma metody využívající optickou pinzetu a kuličky s myosinem. B snímek před započítím pokusu. C snímek 16 vteřin po začátku, je vidět ustřížené vlákno (šipka). V D a E je na vlákno působeno tahovou silou a ke stříhání nedošlo (Hayakawa, Tatsumi a Sokabe, 2011).

V letošní studii zabývající se podobnou problematikou byla mikrofilamenta umístěna v komůrce s několika vstupy, kterými do zařízení různě silně proudily roztoky mimo jiné i s cofilinem. Mikrofilamenta byla připevněna k podložce buď jedním svým koncem, nebo oběma, přičemž se předpokládalo, že na vlákna připevněna ve dvou bodech budou v průběhu navazování cofilinu působit torzní síly. Byla pozorována vyšší míra stříhání filament připevněných na dvou místech oproti těm, která byla ukotvená jen v jednom bodě. V dalším

experimentu byla aktinová vlákna pomocí proudění ohýbána a výzkumníci zjistili, že stříhání je ohybem podpořeno. Co se týče působení tahu, který také vyvíjel na vlákna proud, tak se zdá, že na stříhání neměl žádný vliv, či jej dokonce v některých případech mírně indukoval. Dále cofilin aktivně stříhal propojená zesíťovaná aktinová filamenta. Jelikož jsou mikrofilamenta stříhána v místě hranice mezi cofilinem okupovanou a volnou částí vlákna, zvyšování stříhací aktivity torzí je možný způsob, jak zajistit stříhání krátkých filament, která by jinak byla velmi rychle saturována a ke stříhání by na homogenně pokrytém vlákně již nedošlo (Wioland, Jegou a Romet-Lemonne, 2019). Rozdílné výsledky v ohledu působení tahu na cofilinovou aktivitu mohou být způsobeny použitím různých metod, obě studie se však shodují na pozitivním vlivu torze na stříhání aktinu.

Všechny výše zmíněné publikace o ADF/Cofilinu byly prováděny na proteinech pocházejících z živočichů a z jednobuněčných organismů. U rostlin je ADF/Cofilin intenzivně studován v pylové láčce, kde byla u *AtADF7* zjištěna stříhací aktivita a jeho vliv na dynamiku aktinových kabelů vyskytujících se po bocích láčky (Zheng *et al.*, 2013). V epidermálních buňkách hypokotylu huseníčku *ADF4* a *ADF1* také stříhají filamenta (Henty *et al.*, 2011; Henty-Ridilla *et al.*, 2014). Podobné studie ukazující mechanosensorické schopnosti aktin-ADF/Cofilinového komplexu u rostlin zatím neexistují.

V případě ADF/Cofilinu lze nalézt důkazy o snížení jeho aktin-depolymerizující aktivity pomocí Ca^{2+} . *In vitro* pokusy s *ZmADF3* z kukuřice ukázaly, že je fosforylován v místě Ser6 proteinovou kinázou a aktivita této kinázy je v přítomnosti vápníku vyšší. Fosforylovaný *ZmADF3* pak méně váže G- i F- aktin (Smertenko *et al.*, 1998).

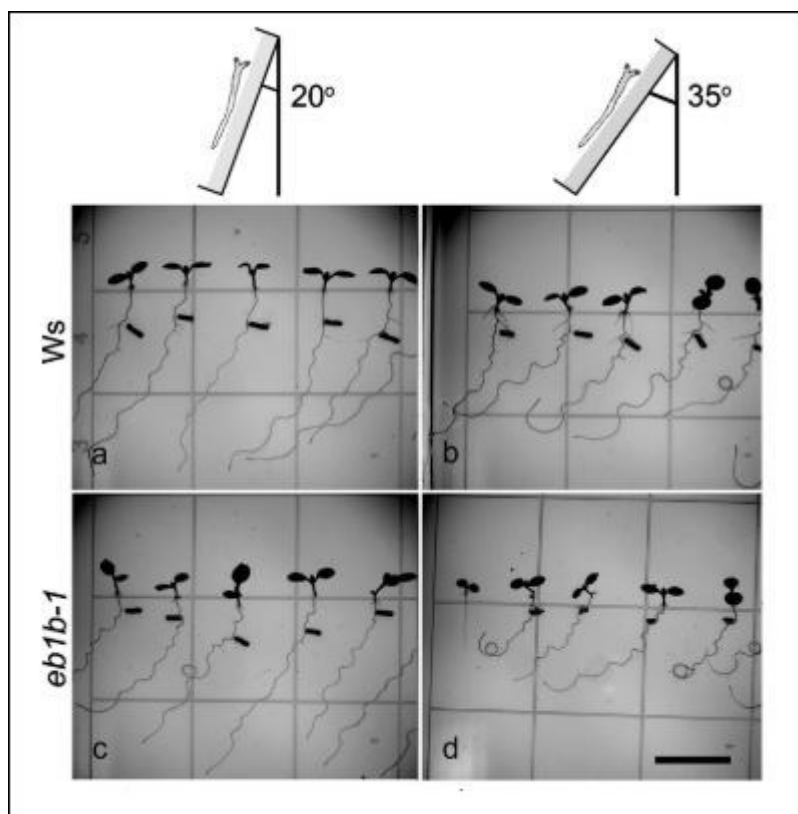
U epidermálních buněk huseníčku bylo zjištěno, že při doteku jehlou dochází k nárazovému zvýšení extracelulárního a snížení intracelulárního pH, to je podmíněno funkční vápníkovou signalizací (Monshausen *et al.*, 2009). Aktivita ADF/Cofilinu by měla být inhibována právě nižším než neutrálním pH (Bernstein *et al.*, 2000) a to by tak mohlo mít vliv na ADF/Cofilinovou aktivitu a možná na změny pozorovatelné ve struktuře aktinu při nanoindentčních experimentech (viz kapitola 4.1.3 Aktinový cytoskelet) (Hardham, Takemoto a White, 2008). U pylových láček lilie (*Lilium longiflorum*) se ADF vyskytuje v místě subapikální zásadité zóny, kde zřejmě ovlivňuje dynamiku k této zóně přiléhajícího aktinového prstence (Lovy-wheeler *et al.*, 2006).

Samotný aktinový cytoskelet tak může být místem mechanorecepce, kdy napětí F-aktinu ovlivňuje jeho interakce, objevují se spekulace spojující tuto vlastnost aktinu s gravirepcí (Tatsumi *et al.*, 2013). Nabízí se propojení mechanosensitivních kanálů s cytoskeletem pomocí Ca^{2+} signalizace.

4.3.2 EB1

EB1 (End Binding1) je protein asociovaný s mikrotubuly (MAPs) vázající se na (+) konec mikrotubulu. Studie ukazují jeho roli ve stabilizaci mikrotubulů, či přímo podpoře jejich polymerizace. Je detekován jako součást různých mikrotubulárních struktur napříč fázemi buněčného cyklu – preprofázický prstenec, dělicí vřeténko během mitózy, fragmoplast, kortikální mikrotubuly (Morrison *et al.*, 1998; Chan *et al.*, 2003; Bisgrove *et al.*, 2008).

Mutace ve variantě genu EB1b poukazuje na možnou spojitost s mechanorepcepcí kořenových pletiv. Při inserci T-DNA do genu pro EB1b a následném snížení jeho exprese došlo ve srovnání s WT rostlinami k výraznému stáčení hlavního kořene semenáčku doleva a vytváření levotočivých smyček (Obrázek 11). Stáčení se navíc umocňovalo s větším úhlem naklonění původně vertikálně stojící agarové misky, s nímž se zvyšovala i míra mechanického podnětu a zároveň gravitropismus zůstal téměř neovlivněn. Mutanti vykazovali též defekty v gravitropické odpovědi – trvalo jim déle zareagovat na změnu orientace misky oproti WT (Bisgrove *et al.*, 2008; Squires a Bisgrove, 2013).



Obrázek 11: WT a mutantní rostlinky huseníčku pěstované na agarových miskách pod různým úhlem (Gleeson, Squire a Bisgrove, 2012).

Ukazuje se také, že etiolované hypokotyly mají deformované buňky a šroubovicovitě se otáčejí kolem své osy (Sedbrook *et al.*, 2014).

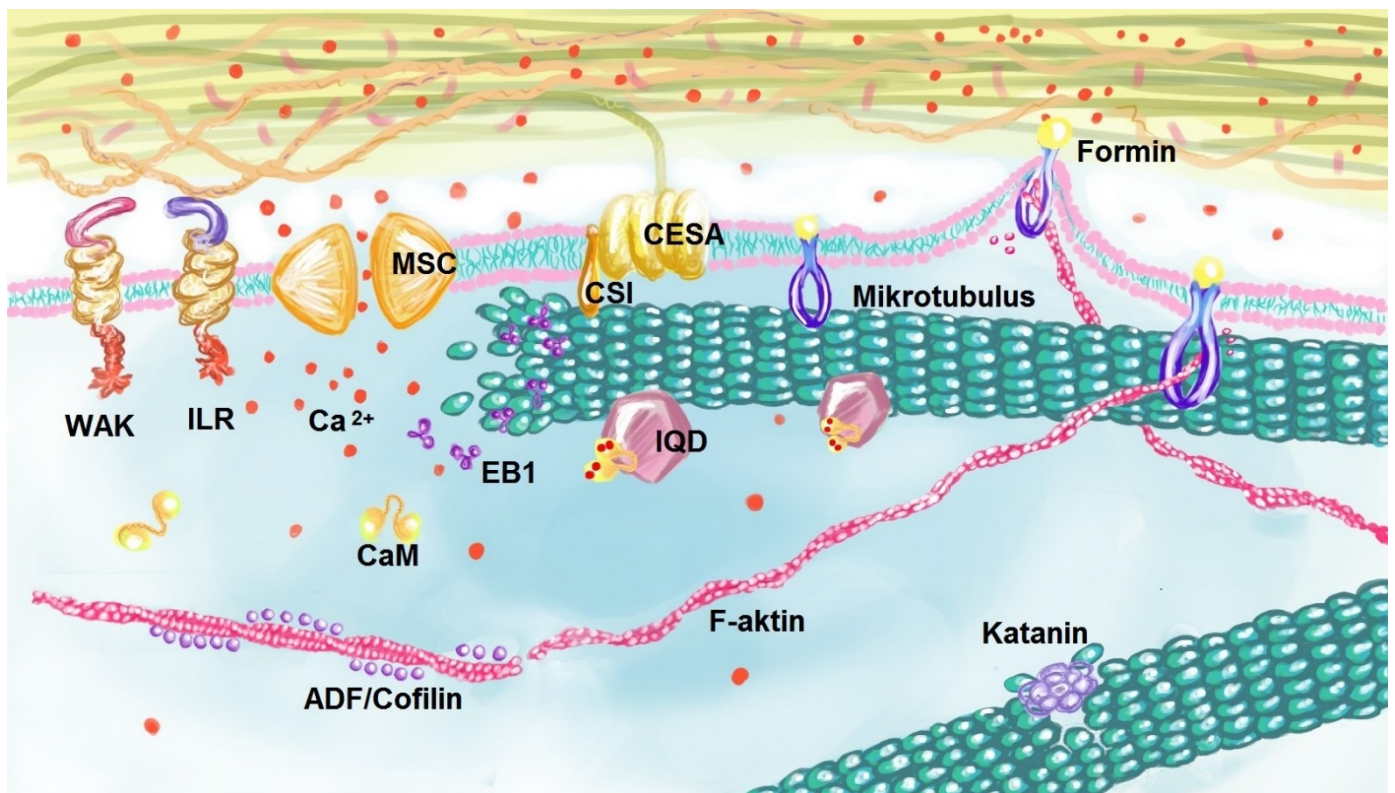
Pohled na samotné buňky a fenotyp mutantních semenáčků by mohl naznačovat defekty v dynamice či struktuře kortikálních mirotubulů, což by ovlivnilo směr elongace buňky, v případě preprofázického prstence i směr dělení buněk a může tedy ovlivňovat tvar buněk a otáčení celého kořene určitým směrem. Tato úvaha ale není podpořena žádným pozorováním, naopak mikrotubulární cytoskelet mutantů, jak se zdá, není významně odlišná od soustavy WT rostlin (Moulines *et al.*, 2018).

Vypadá to, že EB1 může v odpovědi na mechanický stimul fungovat jako její negativní regulátor. Pro toto tvrzení hovoří i výsledky experimentu s dvojitým mutantem v genu pro EB1b a TCH3. Mutanti v TCH3 vytvářeli smyčky a stáčeli své kořínky ještě o něco méně než kontrola, avšak dvojití mutanti vykazovali fenotyp mírou projevů na půl cesty mezi tch3 a eb1b. Analýza potomstva u segregující populace ukázala, že tch3 je mutace recesivní. V případě, že by EB1b nebyl součástí mechanoreceptivního mechanismu, neměla by mít recesivní mutace tch3 na fenotyp vliv. Projev mutace eb1b by mohl být dokonce důsledkem disregulace exprimovaného TCH3 (Gleeson, Squires a Bisgrove, 2012). EB1 tak zřejmě nestojí na počátku mechanorecepce, ale může ji regulovat. Přesný mechanismus efektu EB1 může spočívat v jeho schopnosti zprostředkovávat vazbu jiných proteinů vázajících (+) konec.

5 ZÁVĚR

Má práce shrnuje současné poznatky o strukturách účastnících se mechanorecepce u rostlin. Stěžejním konceptem je kontinuum buněčné stěny, plasmatické membrány a cytoskeletu. Tyto struktury jsou navzájem propojené signálními drahami i fyzicky (Obrázek 12). Kromě studií přímo o rostlinných proteinech jsem využila i poznatky o jejich homolzích u živočichů a hub, jejichž role v mechanoreceptci je prozkoumána lépe.

Experimentální výzkum mechanorecepce je znesnadněn všudypřítomností mechanických podnětů a množstvím zúčastněných struktur a jejich interakcemi. Celá rostlina je v přírodě (ale i v květináči) neustále podrobována mechanickým podnětům, jako kontroly jsou v laboratorních podmínkách však často voleny rostliny, na které žádné vnější podněty nepůsobí. Použití naprosto nestimulovaných rostlin může nepochybně pomoci odhalit struktury účastnící se mechanorecepce, ale je otázkou, jak moc sensitivita rostlin a například zjištěné hodnoty exprese odpovídají skutečnosti v přírodě.



Obrázek 12: Schéma zahrnující výše zmiňované mechanorecepční struktury a proteiny. Schéma nerozlišuje jednotlivé proteiny a jejich funkce kódované různými členy genových rodin, slouží spíše pro přehled umístění a interakcí struktur.

Dalším důležitým aspektem zkoumání molekulárních mechanismů, který je třeba brát na zřetel, je izolovanost jevů v *in vitro* pokusech. Je třeba si uvědomovat, že zjištění získána *in vitro*, speciálně pak v pokusech s pouhými molekulami, mohou *in vivo*, např. díky proteinovým interakcím, vypadat docela jinak.

Poznání molekulárních mechanismů mechanorecepce u rostlin zdaleka není vyčerpáno. Např. navrhovaná role vápníku v BS-PM-C kontinuu není úplně jasná. IQD proteiny představují jedno z možných propojení, neboť vážou cytoskelet i CaM a to ať už CaM s navázaným vápníkem, či bez něj. Intenzivnější zkoumání IQD proteinů započalo poměrně nedávno, jejich množství a vzájemná redundance funkcí naznačují důležitost těchto proteinů pro buňku, právě proto však nebude snadné stanovit přesné vztahy.

Ani znalosti o tom, co se děje při přenosu podnětu z buněčné stěny na membránu, nejsou dostačující. Transmembránové proteiny formují fyzicky propojují buněčnou stěnu, plasmatickou membránu i cytoskelet, není ale jasné, jakým mechanismem by byla změna na buněčné stěně přenášena dál. V živočišných a houbových buňkách jsou známy procesující

forminy, které v důsledku tahu aktinového vlákna regulují jeho polymeraci, u rostlin byl nedávno procesující formin zjištěn také, ale mechanosenzitivní vlastnosti čekají na objevení.

U cytosolických proteinů, jako ADF/Cofilin, jehož stříhání mikrofilament je regulováno mechanickými podněty, a EB1, který čepičkuje mikrotubuly a reguluje mechanoreceptci semenáčků, zase není úplně jasné kam v BS-PM-C kontinuu zapadají, možná propojení jsou spíše spekulativní.

S pokrokem molekulárních metod jsou objevováni další členové BS-PM-C kontinua a jejich role. Pro vytvoření celistvého modelu molekulárních mechanismů mechanorecepce je třeba hledat mezi jednotlivými rolemi souvislosti a spojení. Jedná se zřejmě o velmi delikátně regulovaný a interagující systém s neoddělitelnými přesahy do dalších pochodů v buňce.

6 POUŽITÁ LITERATURA

- Abel, S., Savchenko, T. a Levy, M. (2005) 'Genome-wide comparative analysis of the IQD gene families in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*', *BMC Evolutionary Biology*, 5, pp. 1–25. doi: 10.1186/1471-2148-5-72.
- Bamburg, J. R., McGough, A. a Ono, S. (1999) 'Putting a new twist on actin: ADF/cofilins modulate actin dynamics', *Trends in Cell Biology*, 9(9), pp. 364–370. doi: 10.1016/S0962-8924(99)01619-0.
- Banno, H. a Chua, N. H. (2000) 'Characterization of the *Arabidopsis* formin-like protein AFH1 and its interacting protein', *Plant and Cell Physiology*, 41(5), pp. 617–626. doi: 10.1093/pcp/41.5.617.
- Bass, R. B. *et al.* (2002) 'Crystal Structure of *Escherichia coli* MscS, a Voltage-Modulated and Mechanosensitive Channel Author(s): Randal B. Bass, Pavel Strop, Margaret Barclay and Douglas C. Rees Source':, *Science*, 298(5598), pp. 1582–1587. Available at: <http://science.sciencemag.org/>.
- Bernstein, B. W. *et al.* (2000) 'Intracellular pH modulation of ADF/cofilin proteins', *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 47(4), pp. 319–336. doi: 10.1002/1097-0169(200012)47:4<319::AID-CM6>3.0.CO;2-I.
- Berquand, A. *et al.* (2014) 'Subcellular and supracellular mechanical stress prescribes cytoskeleton behavior in *Arabidopsis* cotyledon pavement cells', *eLife*, 3, pp. 1–20. doi: 10.7554/elife.01967.
- Bisgrove, S. R. *et al.* (2008) 'The Microtubule Plus-End Binding Protein EB1 Functions in Root Responses to Touch and Gravity Signals in *Arabidopsis*', *the Plant Cell Online*, 20(2), pp. 396–410. doi: 10.1105/tpc.107.056846.
- Body, M. J. A. *et al.* (2019) 'Caterpillar Chewing Vibrations Cause Changes in Plant Hormones and Volatile Emissions in *Arabidopsis thaliana*', *Frontiers in Plant Science*, 10(June), pp. 1–14. doi: 10.3389/fpls.2019.00810.
- Braam, J. a Davis, R. W. (1990) 'Rain-, wind-, and touch-induced expression of calmodulin and calmodulin-related genes in *Arabidopsis*', *Cell*, 60(3), pp. 357–364. doi: 10.1016/0092-8674(90)90587-5.
- Branco, R. *et al.* (2017) 'Quantifying the plant actin cytoskeleton response to applied pressure using nanoindentation', *Protoplasma*. *Protoplasma*, 254(2), pp. 1127–1137. doi: 10.1007/s00709-016-0984-9.
- Brutus, A. *et al.* (2010) 'A domain swap approach reveals a role of the plant wall-associated kinase 1 (WAK1) as a receptor of oligogalacturonides', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(20), pp. 9452–9457. doi: 10.1073/pnas.1000675107/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1000675107.
- Burgess, J. a Northcote, D. H. (1967) 'A function of the preprophase band of microtubules in *Phleum pratense*', *Planta*, 75(4), pp. 319–326. doi: 10.1007/BF00387355.

- Bürstenbinder, K. *et al.* (2017) 'The IQD Family of Calmodulin-Binding Proteins Links Calcium Signaling to Microtubules, Membrane Subdomains, and the Nucleus', *Plant Physiology*, 173(March), pp. 1692–1708. doi: 10.1104/pp.16.01743.
- Carrasco, A. *et al.* (1998) 'High affinity RGD-binding sites at the plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* links the cell wall', *The Plant Journal*, 16(1), pp. 63–71.
- Chan, J. *et al.* (2003) 'EB1 reveals mobile microtubule nucleation sites in *Arabidopsis*', *Nature Cell Biology*, 5(11), pp. 967–971. doi: 10.1038/ncb1057.
- Chehab, E. W. *et al.* (2012) 'Arabidopsis touch-induced morphogenesis is jasmonate mediated and protects against pests', *Current Biology*. Elsevier Ltd, 22(8), pp. 701–706. doi: 10.1016/j.cub.2012.02.061.
- Chen, D. *et al.* (2017) 'Genome-Wide Identification and Expression Analysis of the HD-Zip Gene Family in Moso Bamboo (*Phyllostachys edulis*)', *Journal of Plant Growth Regulation*. Nature Publishing Group, 36(2), pp. 323–337. doi: 10.1007/s00344-016-9642-x.
- Cheung, A. Y. (2004) 'Overexpression of an *Arabidopsis* Formin Stimulates Supernumerary Actin Cable Formation from Pollen Tube Cell Membrane', *the Plant Cell Online*, 16(1), pp. 257–269. doi: 10.1105/tpc.016550.
- Curtis, M. A. (1834) 'Enumeration of plants around Wilmington', *N. C. Boston Journ. Nat. Hist*, 1, pp. 82–141.
- Cvrčková, F. (2000) 'Are plant formins integral membrane proteins?', *Genome Biology*, 1(1), p. research001.1-research001.7. doi: 10.1186/gb-2000-1-1-research001.
- Cvrčková, F. *et al.* (2004) 'Formin homology 2 domains occur in multiple contexts in angiosperms', *BMC Genomics*, 5, pp. 1–18. doi: 10.1186/1471-2164-5-44.
- Darwin, C. R. (1875a) 'Chapter XIII. *Dionaea Muscipula*.', in *Insectivorous plants*. London: John Murray, pp. 286–320. Available at: http://darwin-online.org.uk/converted/pdf/1875_Insectivorous_F1217.pdf.
- Darwin, C. R. (1875b) 'Chapter I. *Drosera rotundifolia*, or the common Sun-dew', in *Insectivorous plants*. London: John Murray, pp. 1–18. Available at: http://darwin-online.org.uk/converted/pdf/1875_Insectivorous_F1217.pdf.
- Decreux, A. *et al.* (2006) 'In vitro characterization of the homogalacturonan-binding domain of the wall-associated kinase WAK1 using site-directed mutagenesis', *Phytochemistry*, 67(11), pp. 1068–1079. doi: 10.1016/j.phytochem.2006.03.009.
- Decreux, A. a Messiaen, J. (2005) 'Wall-associated kinase WAK1 interacts with cell wall pectins in a calcium-induced conformation', *Plant and Cell Physiology*, 46(2), pp. 268–278. doi: 10.1093/pcp/pci026.
- Deeks, M. J. *et al.* (2010) 'The plant formin AtFH4 interacts with both actin and microtubules, and contains a newly identified microtubule-binding domain', *Journal of Cell Science*, 123(8), pp. 1209–1215. doi: 10.1242/jcs.065557.

- Delteil, A. *et al.* (2016) 'Several wall-associated kinases participate positively and negatively in basal defense against rice blast fungus', *BMC Plant Biology*. *BMC Plant Biology*, 16(1), pp. 1–10. doi: 10.1186/s12870-016-0711-x.
- Denoux, C. *et al.* (2008) 'Activation of defense response pathways by OGs and Flg22 elicitors in Arabidopsis seedlings', *Molecular Plant*, 1(3), pp. 423–445. doi: 10.1093/mp/ssn019.
- Edelmann, H. G. (2018) 'Graviperception in maize plants: is amyloplast sedimentation a red herring?', *Protoplasma*. *Protoplasma*, 255, pp. 1877–1881. doi: 10.1007/s00709-018-1272-7.
- Ent, F. Van Den *et al.* (2002) 'F-actin-like filaments formed by plasmid segregation protein ParM', *The EMBO journal*, 21(24), pp. 6935–6943.
- Feng, L. *et al.* (2014) 'The IQD gene family in soybean: Structure, phylogeny, evolution and expression', *PLoS ONE*, 9(10). doi: 10.1371/journal.pone.0110896.
- Fernandez, A. G. *et al.* (2005) 'COBRA, an Arabidopsis Extracellular Glycosyl-Phosphatidyl Inositol-Anchored Protein, Specifically Controls Highly Anisotropic Expansion through Its Involvement in Cellulose Microfibril Orientation', *The Plant Cell*, 17(June 2005), pp. 1749–1763. doi: 10.1105/tpc.105.031732.1.
- Friml, J. *et al.* (2002) 'Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in Arabidopsis', *Nature*, 415(February 2002), pp. 806–809.
- Fromm, J. a Eschrich, W. (1988) 'Transport processes in stimulated and non-stimulated leaves of Mimosa pudica - II. Energesis and transmission of seismic stimulations', *Trees*, 2(1), pp. 18–24. doi: 10.1007/BF00196975.
- Gleeson, L., Squires, S. and Bisgrove, S. R. (2012) 'The microtubule associated protein END BINDING 1 represses root responses to mechanical cues', *Plant Science*. Elsevier Ireland Ltd, 187, pp. 1–9. doi: 10.1016/j.plantsci.2012.01.010.
- Grant, G. *et al.* (1973) 'Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model', *FEBS Letters*, 32(1), pp. 195–198.
- Gross, P. *et al.* (1993) 'Translocation of cytoplasm and nucleus to fungal penetration sites is associated with depolymerization of microtubules and defence gene activation in infected, cultured parsley cells.', *The EMBO journal*, 12(5), pp. 1735–1744. doi: 10.1002/j.1460-2075.1993.tb05821.x.
- Gus-Mayer, S. *et al.* (1998) 'Local mechanical stimulation induces components of the pathogen defense response in parsley.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(July), pp. 8398–8403. doi: 10.1073/pnas.95.14.8398.
- Hamant, O. *et al.* (2008) 'Developmental Patterning by Mechanical Signals in Arabidopsis', *Science*, 322(5908), pp. 1650–1655.
- Hamilton, E. S. a Haswell, E. S. (2017) 'The Tension-sensitive Ion Transport Activity of MSL8 is Critical for its Function in Pollen Hydration and Germination', *Plant and Cell Physiology*, 58(7), pp. 1222–1237. doi: 10.1093/pcp/pcw230.

- Hardham, A. R., Jones, D. A. a Takemoto, D. (2007) 'Cytoskeleton and cell wall function in penetration resistance', *Current Opinion in Plant Biology*, 10(4), pp. 342–348. doi: 10.1016/j.pbi.2007.05.001.
- Hardham, A. R., Takemoto, D. a White, R. G. (2008) 'Rapid and dynamic subcellular reorganization following mechanical stimulation of Arabidopsis epidermal cells mimics responses to fungal and oomycete attack', *BMC Plant Biology*, 8(63), pp. 1-14. doi: 10.1186/1471-2229-8-63.
- Hasezawa, S. *et al.* (2010) 'Myosin-dependent endoplasmic reticulum motility and F-actin organization in plant cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(15), pp. 6894–6899. doi: 10.1073/pnas.0911482107.
- Haswell, E. S. *et al.* (2008) 'Two MscS Homologs Provide Mechanosensitive Channel Activities in the Arabidopsis Root', *Current Biology*, 18(10), pp. 730–734. doi: 10.1016/j.cub.2008.04.039.
- Haswell, E. S. a Meyerowitz, E. M. (2006) 'MscS-like proteins control plastid size and shape in Arabidopsis thaliana', *Current Biology*, 16(1), pp. 1–11. doi: 10.1016/j.cub.2005.11.044.
- Hayakawa, K., Tatsumi, H. a Sokabe, M. (2011) 'Actin filaments function as a tension sensor by tension-dependent binding of cofilin to the filament', *Journal of Cell Biology*, 195(5), pp. 721–727. doi: 10.1083/jcb.201102039.
- He, Z., Fujiki, M. a Kohorn, B. D. (1996) 'A Cell Wall-associated, Receptor-like Protein Kinase *', *The Journal of Biochemical Chemistry*, 271(33), pp. 19789–19793.
- Henty-Ridilla, J. L. *et al.* (2014) 'ACTIN DEPOLYMERIZING FACTOR4 Regulates Actin Dynamics during Innate Immune Signaling in Arabidopsis', *The Plant Cell*, 26(1), pp. 340–352. doi: 10.1105/tpc.113.122499.
- Henty, J. L. *et al.* (2011) 'Arabidopsis Actin Depolymerizing Factor4 Modulates the Stochastic Dynamic Behavior of Actin Filaments in the Cortical Array of Epidermal Cells', *The Plant Cell*, 23(10), pp. 3711–3726. doi: 10.1105/tpc.111.090670.
- Hervieux, N. *et al.* (2016) 'A Mechanical Feedback Restricts Sepal Growth and Shape in Arabidopsis', *Current Biology*. Elsevier Ltd, 26(8), pp. 1019–1028. doi: 10.1016/j.cub.2016.03.004.
- Ikushima, T. a Shimmen, T. (2005) 'Mechano-sensitive orientation of cortical microtubules during gravitropism in azuki bean epicotyls', *Journal of Plant Research*, 118(1), pp. 19–26. doi: 10.1007/s10265-004-0189-8.
- Iwaya, N. *et al.* (2012) 'Effect of Ca²⁺ on the microtubule-severing enzyme p60-katanin Insight into the substrate-dependent activation mechanism', *the FEBS Journal*, 279, pp. 1339–1352. doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08528.x.
- Jacques, E., Verbelen, J. P. and Vissenberg, K. (2013) 'Mechanical stress in Arabidopsis leaves orients microtubules in a "continuous" supracellular pattern', *BMC Plant Biology*, 13(1). doi: 10.1186/1471-2229-13-163.
- Jaffe, M. J. (1973) 'Thigmomorphogenesis: The response of plant growth and development to mechanical stimulation', *Planta*, 114, pp. 143–157. doi: 10.1007/BF00387472.

- Jégou, A. *et al.* (2011) 'Individual actin filaments in a microfluidic flow reveal the mechanism of ATP hydrolysis and give insight into the properties of profilin', *PLoS Biology*, 9(9). doi: 10.1371/journal.pbio.1001161.
- Jégou, A., Carlier, M. F. and Romet-Lemonne, G. (2013) 'Formin mDia1 senses and generates mechanical forces on actin filaments', *Nature Communications*, 4(May), pp. 1–7. doi: 10.1038/ncomms2888.
- Jenkins, C. *et al.* (2002) 'Genes for the cytoskeletal protein tubulin in the bacterial genus *Prostheco bacter*', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(26), p. 1704. Available at: papers2://publication/uuid/F3A89BB2-7DB1-49B6-A88A-A297B6EFA284.
- Kamano, S. *et al.* (2015) 'Transmembrane Topologies of Ca²⁺-permeable Mechanosensitive Channels MCA1 and MCA2 in *Arabidopsis thaliana*', *Journal of Biological Chemistry*, 290(52), pp. 30901–30909. doi: 10.1074/jbc.M115.692574.
- Knepper, C., Savory, E. A. a Day, B. (2011) 'Arabidopsis NDR1 Is an Integrin-Like Protein with a Role in Fluid Loss and Plasma Membrane-Cell Wall Adhesion', *Plant Physiology*, 156, pp. 286–300. doi: 10.1104/pp.110.169656.
- Ko, C., Merkle, T. a Neuhaus, G. (1999) 'Characterisation of a novel gene family of putative cyclic nucleotide- and calmodulin-regulated ion channels in *Arabidopsis thaliana*', *The Plant Journal*, 18(1), pp. 97–104.
- Ko, J. *et al.*, (2004) 'Plant Body Weight-Induced Secondary Growth in *Arabidopsis* and Its Transcription Phenotype Revealed by Whole-Transcriptome Profiling', *Plant Physiology*, 135(2), pp. 1069–1083. doi: 10.1104/pp.104.038844.
- Kobayashi, I. a Hakuno, H. (2003) 'Actin-related defense mechanism to reject penetration attempt by a non-pathogen is maintained in tobacco BY-2 cells.', *Planta*, 217(2), pp. 340–5. doi: 10.1007/s00425-003-1042-3.
- Kozlov, M. M. a Bershadsky, A. D. (2004) 'Processive capping by formin suggests a force-driven mechanism of actin polymerization', *Journal of Cell Biology*, 167(6), pp. 1011–1017. doi: 10.1083/jcb.200410017.
- Lee, D., Polisensky, D. H. a Braam, J. (2005) 'Genome-wide identification of touch- and darkness-regulated *Arabidopsis* genes: A focus on calmodulin-like and XTH genes', *New Phytologist*, 165(2), pp. 429–444. doi: 10.1111/j.1469-8137.2004.01238.x.
- Levina, N. *et al.* (1999) 'Protection of *Escherichia coli* cells against extreme turgor by activation of MscS and MscL mechanosensitive channels: identification of genes required for MscS activity', *The EMBO Journal*, 18(7), pp. 1730–1737. doi: 10.1093/emboj/18.7.1730.
- Levy, M. *et al.* (2005) 'Arabidopsis IQD1, a novel calmodulin-binding nuclear protein, stimulates glucosinolate accumulation and plant defense', *Plant Journal*, 43(1), pp. 79–96. doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02435.x.

- Li, S. *et al.* (2012) 'Cellulose synthase interactive protein 1 (CS11) links microtubules and cellulose synthase complexes', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(1), pp. 185–190. doi: 10.1073/pnas.1118560109.
- Liang, H. *et al.* (2018) 'The microtubule-associated protein IQ67 DOMAIN5 modulates microtubule dynamics and pavement cell shape', *Plant Physiology*, 177(4), pp. 1555–1568. doi: 10.1104/pp.18.00558.
- Liu, Z., Persson, S. a Sánchez-Rodríguez, C. (2015) 'At the border: the plasma membrane-cell wall continuum', *Journal of Experimental Botany*, 66(6), pp. 1553–1563. doi: 10.1093/jxb/erv019.
- Louveaux, M., Julien, J.-D., *et al.* (2016) ' Cell division plane orientation based on tensile stress in *Arabidopsis thaliana* ', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(30), pp. E4294–E4303. doi: 10.1073/pnas.1600677113.
- Louveaux, M., Rochette, S., *et al.* (2016) 'The impact of mechanical compression on cortical microtubules in *Arabidopsis*: a quantitative pipeline', *Plant Journal*, 88(2), pp. 328–342. doi: 10.1111/tpj.13290.
- Lovy-wheeler, A. *et al.* (2006) 'Oscillatory Increases in Alkalinity Anticipate Growth and May Regulate Actin Dynamics in Pollen Tubes of Lily', *The Plant Cell*, 18(September), pp. 2182–2193. doi: 10.1105/tpc.106.044867.
- Lü, B. *et al.* (2007) 'Intracellular localization of integrin-like protein and its roles in osmotic stress-induced abscisic acid biosynthesis in *Zea mays*', *Protoplasma*, 232(1–2), pp. 35–43. doi: 10.1007/s00709-007-0278-3.
- Lü, B. *et al.* (2012) 'AT14A mediates the cell wall-plasma membrane-cytoskeleton continuum in *Arabidopsis thaliana* cells', *Journal of experimental botany*, 63(11), pp. 4061–4069. doi: 10.1093/jxb/err313.
- Lynch, T. M. a Lintilhac, P. M. (1997) 'Mechanical signals in plant development: A new method for single cell studies', *Developmental Biology*, 181(2), pp. 246–256. doi: 10.1006/dbio.1996.8462.
- Ma, H. *et al.* (2014) 'Genome-wide identification and expression analysis of the IQD gene family in *Populus trichocarpa*', *Plant Science*. Elsevier Ireland Ltd, 229, pp. 96–110. doi: 10.1016/j.plantsci.2014.08.017.
- Marthur, J., Marthur, N. a Hülskramp, M. (2002) 'Simultaneous Visualization of Peroxisomes and Cytoskeletal Elements Reveals Actin and Not Microtubule-Based Peroxisome Motility in Plants', *Plant Physiology*, 128(March), pp. 1031–1045. doi: 10.1104/pp.011018.1.
- Martinière, A. *et al.* (2011) 'Building bridges: Formin1 of *Arabidopsis* forms a connection between the cell wall and the actin cytoskeleton', *Plant Journal*, 66(2), pp. 354–365. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04497.x.
- Mcgough, A. *et al.* (1997) 'Cofilin Changes the Twist of F-Actin : Implications for Actin Filament Dynamics and Cellular Function', *The Journal of Cell Biology*, 138(4), pp. 771–781.

- McNally, F. J. a Vale, R. D. (1993) 'Identification of katanin, an ATPase that severs and disassembles stable microtubules.', *Cell*, 75, pp. 419–429. Available at: <http://www.wormbase.org/db/misc/paper?name=WBPaper00013558>.
- Mensuali-Sodi, A. *et al.* (2006) 'Ethylene response to mechanical stress perturbation of *Salvia splendens* L. potted plants', *Acta Horticulturae*, 723, pp. 421–425.
- Michelot, A. *et al.* (2005) 'The Formin Homology 1 Domain Modulates the Actin Nucleation and Bundling Activity of Arabidopsis FORMIN1', *the Plant Cell Online*, 17(8), pp. 2296–2313. doi: 10.1105/tpc.105.030908.
- Mitra, D. *et al.* (2019) 'Microtubule-associated protein IQ67 DOMAIN5 regulates morphogenesis of leaf pavement cells in *Arabidopsis thaliana*', *Journal of experimental botany*, 70(2), pp. 529–543. doi: 10.1093/jxb/ery395.
- Monshausen, G. B. *et al.* (2009) 'Ca²⁺ Regulates Reactive Oxygen Species Production and pH during Mechanosensing in Arabidopsis Roots', *the Plant Cell Online*, 21(8), pp. 2341–2356. doi: 10.1105/tpc.109.068395.
- Monshausen, G. B. a Gilroy, S. (2009) 'Feeling green: mechanosensing in plants', *Trends in Cell Biology*, 19(5), pp. 228–235. doi: 10.1016/j.tcb.2009.02.005.
- Monshausen, G. B. a Haswell, E. S. (2013) 'A force of nature: Molecular mechanisms of mechanoperception in plants', *Journal of Experimental Botany*, 64(15), pp. 4663–4680. doi: 10.1093/jxb/ert204.
- Morrison, E. E. *et al.* (1998) 'EB1, a protein which interacts with the APC tumour suppressor, is associated with the microtubule cytoskeleton throughout the cell cycle', *Oncogene*, 17(26), pp. 3471–3477. doi: 10.1038/sj.onc.1202247.
- Moulines, A. T. *et al.* (2018) 'EB1 contributes to microtubule bundling and organization, along with root growth, in *Arabidopsis thaliana*', *Biology Open*, 7(8), p. bio030510. doi: 10.1242/bio.030510.
- Nakagawa, Y. *et al.* (2007) 'Arabidopsis plasma membrane protein crucial for Ca²⁺ influx and touch sensing in roots', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(9), pp. 3639–3644. doi: 10.1073/pnas.0607703104.
- Nakano, M. *et al.* (2011) 'Determination of structural regions important for Ca²⁺ uptake activity in arabidopsis MCA1 and MCA2 expressed in yeast', *Plant and Cell Physiology*, 52(11), pp. 1915–1930. doi: 10.1093/pcp/pcr131.
- Narasimhulu, S. B. a Reddy, A. S. N. (1998) 'Characterization of Microtubule Binding Domains in the Arabidopsis Kinesin-like Calmodulin Binding Protein', *The Plant Cell*, 10(June), pp. 957–965. doi: 10.1105/tpc.10.6.957
- Oparka, K. J., Prior, D. A. M. a Crawford, J. W. (1994) 'Behaviour of plasma membrane, cortical ER and plasmodesmata during plasmolysis of onion epidermal cells', *Plant, Cell and Environment*, 17, pp. 163–171.

- Orozco-Cardenas, M. a Ryan, C. A. (1999) 'Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(11), pp. 6553–6557. doi: 10.1073/pnas.96.11.6553.
- Otomo, T. *et al.* (2005) 'Structural basis of actin filament nucleation and processive capping by a formin homology 2 domain', *Nature*, 433(7025), pp. 488–494. doi: 10.1038/nature03251.
- Pfeffer, W. (1873) *Physiologische Untersuchungen*. Leipzig: Wilhelm Engelmann.
- Picton, C., Klee, C. B. and Cohen, P. (1980) 'Phosphorylase Kinase from Rabbit Skeletal Muscle Identification of the Calmodulin-Binding Subunits', *European Journal of Biochemistry*, 111(2), pp. 553–561. doi: 10.1111/j.1432-1033.1980.tb04971.x.
- Pont-Lezica, R. F., McNally, J. G. a Pickard, B. G. (1993) 'Wall-to-membrane linkers in onion epidermis : some hypotheses', *Plant, Cell and Environment*, 16, pp. 111–123.
- Ren, H. *et al.* (2016) 'A Processive Arabidopsis Formin Modulates Actin Filament Dynamics in Association with Profilin', *Molecular Plant*. Elsevier Ltd, 9(6), pp. 900–910. doi: 10.1016/j.molp.2016.03.006.
- Richter, P., Strauch, S. M. a Lebert, M. (2019) 'Disproval of the Starch-Amyloplast Hypothesis?', *Trends in Plant Science*. Elsevier Ltd, 24(4), pp. 291–293. doi: 10.1016/j.tplants.2019.02.008.
- Roblin, G. (1982) 'Movements, Bioelectrical Events and Proton Excretion Induced in the Pulvini of *Mimosa pudica* L. by a Period of Darkness', *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 108(4), pp. 295–304. doi: 10.1016/s0044-328x(82)80176-1.
- Sedbrook, J. C. *et al.* (2014) 'The Microtubule Plus-End Tracking Proteins SPR1 and EB1b Interact to Maintain Polar Cell Elongation and Directional Organ Growth in Arabidopsis', *The Plant Cell Online*, 26(11), pp. 4409–4425. doi: 10.1105/tpc.114.131482.
- Shi, L. *et al.* (2011) 'Actin filaments and microtubules of Arabidopsis suspension cells show different responses to changing turgor pressure', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Elsevier Inc., 405(4), pp. 632–637. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.01.081.
- Sistrunk, M. L. *et al.* (2007) 'Arabidopsis TCH3 Encodes a Novel Ca²⁺ Binding Protein and Shows Environmentally Induced and Tissue-Specific Regulation', *The Plant Cell*, 6(11), p. 1553. doi: 10.2307/3869943.
- Smertenko, A. P. *et al.* (1998) 'Ser6 in the maize actin-depolymerizing factor, ZmADF3, is phosphorylated by a calcium-stimulated protein kinase and is essential for the control of functional activity', *The Plant Journal*, 14(2), pp. 187–193.
- Smith, J. W. a Cheresch, D. A. (1990) 'Integrin (αvβ3)-Ligand Interaction Identification of a heterodimeric RGD binding site on the vitronectin receptor', *The Journal of Biochemical Chemistry*, 265(4), pp. 2168–2172.
- Sobue, K. a Itoh, K. (1987) 'Cytosynalin : A Mr 35, 000 cytoskeleton-interacting and calmodulin-binding protein', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(April),

pp. 1916–1920.

Squires, S. a Bisgrove, S. (2013) 'The Microtubule-Associated Protein END BINDING1b, Auxin, and Root Responses to Mechanical Cues', *Journal of Plant Growth Regulation*, 32(4), pp. 681–691. doi: 10.1007/s00344-013-9333-9.

Tatsumi, H. *et al.* (2013) 'Mechanosensitive channels are activated by stress in the actin stress fibres, and could be involved in gravity sensing in plants', *Plant Biology*, 16(SUPPL.1), pp. 18–22. doi: 10.1111/plb.12095.

Toyota, M. *et al.* (2007) 'Cytoplasmic Calcium Increases in Response to Changes in the Gravity Vector in Hypocotyls and Petioles of Arabidopsis Seedlings', *Plant Physiology*, 146(2), pp. 505–514. doi: 10.1104/pp.107.106450.

Uyttewaal, M. *et al.* (2012) 'Mechanical stress acts via Katanin to amplify differences in growth rate between adjacent cells in Arabidopsis', *Cell*, 149(2), pp. 439–451. doi: 10.1016/j.cell.2012.02.048.

Vavylonis, D. *et al.* (2006) 'Model of formin-associated actin filament elongation', *Molecular Cell*, 21(4), pp. 455–466. doi: 10.1016/j.molcel.2006.01.016.

Volkov, A. G. *et al.* (2007) 'Kinetics and Mechanism of Dionaea muscipula Trap Closing', *Plant Physiology*, 146(2), pp. 694–702. doi: 10.1104/pp.107.108241.

Vorherr, T. *et al.* (1990) 'Interaction of Calmodulin with the Calmodulin Binding Domain of the Plasma Membrane Ca²⁺ Pump', *Biochemistry*, 29(2), pp. 355–365. doi: 10.1021/bi00454a008.

Wagner, T. A. a Kohorn, B. D. (2001) 'Wall-Associated Kinases Are Expressed throughout Plant Development and Are Required for Cell Expansion', *the Plant Cell Online*, 13(2), pp. 303–318. doi: 10.1105/tpc.13.2.303.

Wang, Y. *et al.* (2011) 'CML24 is Involved in Root Mechanoresponses and Cortical Microtubule Orientation in Arabidopsis', *Journal of Plant Growth Regulation*, 30(4), pp. 467–479. doi: 10.1007/s00344-011-9209-9.

Watillon, B. *et al.* (1993) 'A Calcium / Calmodulin-Binding Serine / Threonine Protein Kinase Homologous to the Mammalian Type Calcium / Calmodulin-Dependent Protein Kinase 1s Expressed in Plant Cells', *Plant Physiology*, 101(4), pp. 1381–1384.

Wightman, R. *et al.* (2013) 'SPIRAL2 determines plant microtubule organization by modulating microtubule severing', *Current Biology*. The Authors, 23(19), pp. 1902–1907. doi: 10.1016/j.cub.2013.07.061.

Wioland, H. *et al.* (2017) 'ADF/Cofilin Accelerates Actin Dynamics by Severing Filaments and Promoting Their Depolymerization at Both Ends', *Current Biology*, 27(13), pp. 1956–1967.e7. doi: 10.1016/j.cub.2017.05.048.

Wioland, H., Jegou, A. a Romet-Lemonne, G. (2019) 'Torsional stress generated by ADF/cofilin on cross-linked actin filaments boosts their severing', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(7), pp. 2595–2602. doi: 10.1073/pnas.1812053116.

- Yoder, T. L. *et al.* (2002) 'Amyloplast Sedimentation Dynamics in Maize Columella Cells Support a New Model for the Gravity-Sensing Apparatus of Roots', *Plant Physiology*, 125(2), pp. 1045–1060. doi: 10.1104/pp.125.2.1045.
- Yu, Z. *et al.* (2009) 'Cofilin Increases the Bending Flexibility of Actin Filaments: Implications for Severing and Cell Mechanics', *Journal of Molecular Biology*, 377(2), pp. 364–377. doi: 10.1016/j.jmb.2008.05.055.Cofilin.
- Yuan, J. *et al.* (2019) 'Genome-wide analysis of the Chinese cabbage IQD gene family and the response of BrIQD5 in drought resistance', *Plant Molecular Biology*. Springer Netherlands, 99(6), pp. 603–620. doi: 10.1007/s11103-019-00839-5.
- Zheng, H. Q. a Staehelin, A. L. (2002) 'Nodal Endoplasmic Reticulum, a Specialized Form of Endoplasmic Reticulum Found in Gravity-Sensing Root Tip Columella Cells', *Plant Physiology*, 125(1), pp. 252–265. doi: 10.1104/pp.125.1.252.
- Zheng, Y. *et al.* (2013) 'Arabidopsis actin-depolymerizing factor7 Severs Actin Filaments and Regulates Actin Cable Turnover to Promote Normal Pollen Tube Growth', *The Plant Cell*, 25(9), pp. 3405–3423. doi: 10.1105/tpc.113.117820.
- Zhu, J. K. *et al.* (1993) 'Enrichment of vitronectin- and fibronectin-like proteins in NaCl-adapted plant cells and evidence for their involvement in plasma membrane-cell wall adhesion', *Plant Journal*, 3(5), pp. 637–646. doi: 10.1111/j.1365-313X.1993.00637.x.
- Zhu, X. *et al.* (2013) 'Aequorin-based luminescence imaging reveals stimulus- and tissue-specific Ca²⁺ dynamics in arabidopsis plants', *Molecular Plant*, 6(2), pp. 444–455. doi: 10.1093/mp/sst013.
- Zigmond, S. H. *et al.* (2003) 'Formin Leaky Cap Allows Elongation in the Presence of Tight Capping Proteins', *Current Biology*, 13(20), pp. 1820–1823. doi: 10.1016/j.cub.2003.09.057.
- Zimmermann, D. *et al.* (2017) 'Mechanoregulated inhibition of formin facilitates contractile actomyosin ring assembly', *Nature Communications*. Springer US, 8(1), pp. 1–12. doi: 10.1038/s41467-017-00445-3.