

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Biologie



Michal Moulík

Funkce RAB GTPáz a SNARE proteinů v transportních drahách navazujících na
Golgiho aparát v odpovědi na abiotický stres u rostlin

Functions of RAB GTPases and SNARE proteins in post-Golgi trafficking
pathways in response to abiotic stress in plants

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: RNDr. Michal Hála, Ph.D.

Praha 2018

Prohlášení

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

V Praze, 9. 5. 2018

.....

Michal Moulík

Poděkování

Rád bych poděkoval svému školiteli, RNDr. Michalu Hálovi, Ph. D., za cenné rady a ochotnou pomoc v průběhu psaní tohoto textu. Dále chci poděkovat své rodině a v neposlední řadě též přítelkyni za vytvoření zázemí, trpělivost a velkou podporu.

Abstrakt

Rostliny jakožto sesilní organismy nemají možnost úniku před abiotickými či biotickými stresovými faktory. Vyvinuly si proto celou řadu morfologických, biochemických a fyziologických přizpůsobení snižujících negativní vlivy těchto faktorů. Velmi důležitou roli v adaptaci na abiotický stres hraje membránový transport. Ve své bakalářské práci jsem se zaměřil na dvě významné rodiny proteinů zúčastněné v tomto transportu, konkrétně na RAB GTPázy a SNARE proteiny. V první části je charakterizován fenomén stresu a popsány strategie, jak se rostliny vyrovnávají s působením stresorů, zejména produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) a autofágie. Následující kapitola se zabývá úvodem do membránového transportu u rostlin. Ve zbytku práce charakterizují RAB GTPázy a SNARE proteiny a popisují mechanismus jejich fungování. Cílem klíčových částí těchto kapitol je shrnout současné poznatky o funkcích RAB GTPáz a SNARE proteinů v drahách návazných na Golgiho aparát při odpovědi na abiotické stresory, respektive na sekundární oxidativní stres.

Klíčová slova: rostliny, abiotický stres, membránový transport, sekrece, endocytóza, vakuola, RAB GTPázy, SNARE proteiny

Abstract

Plants as sessile organisms are strongly affected by abiotic and biotic stress factors. Thus, they have developed an array of morphological, biochemical and physiological adaptations to reduce the negative effects of these factors. The membrane trafficking, among others, plays very important role in adaptation to abiotic stress. In my bachelor thesis I have focused on two important protein families involved in this trafficking, namely on RAB GTPases and SNARE proteins. In the first part, the phenomenon of stress is characterized and the strategies how plants cope with the effect of stressors are described, especially the production of reactive oxygen species (ROS) and autophagy. Following chapter deals with an introduction to the membrane trafficking in plants. In the rest of the thesis, I characterize RAB GTPases and SNARE proteins and provide contemporary insight in the mechanism of their function. The aim of the key parts of these chapters is to summarize current knowledge of RAB GTPases' and SNARE proteins' functions in post-Golgi trafficking pathways during response to abiotic stressors or secondary oxidative stress.

Key words: plants, abiotic stress, membrane trafficking, secretion, endocytosis, vacuole, RAB GTPases, SNARE proteins

Obsah

1. Úvod	1
2. Fenomén stresu a odpověď rostlin na něj	2
2.1. Stresové faktory a stres	2
2.1.1. Solný stres	2
2.1.2. Osmotický stres	3
2.1.3. Mechanický stres	4
2.2. Vyrovnání se rostlin se stresory	5
2.2.1. Produkce ROS	5
2.2.2. Autofágie	6
3. Membránový transport v rostlinách.....	7
3.1. Úvod	7
3.2. Kompartmenty v transportu navazujícím na Golgiho aparát	8
3.3. Základní a specializované dráhy transportu, zapojené proteiny.....	8
4. RAB GTPázy.....	11
4.1. Úvod	11
4.2. Zapojení RAB GTPáz do odpovědi na abiotický stres.....	14
4.2.1. RAB2/RABB	14
4.2.2. RAB5/RABF	15
4.2.3. RAB6/RABH.....	16
4.2.4. RAB7/RABG.....	17
4.2.5. RAB11/RABA.....	20
5. SNARE proteiny.....	22
5.1. Úvod	22
5.2. Zapojení SNARE proteinů do odpovědi na abiotický stres.....	24
5.2.1. Qa-SNARE proteiny.....	24
5.2.2. Qb-SNARE proteiny	26
5.2.3. Qc-SNARE proteiny.....	26
5.2.4. SNAP25-like proteiny	28
5.2.5. R-SNARE proteiny.....	29
6. Diskuse a závěr.....	30
7. Citovaná literatura	33

Seznam použitých zkratek

ABA	kyselina abscisová (abscisic acid)
ATP	adenosintrifosfát (adenosine triphosphate)
BaMV	z angl. bamboo mosaic virus
CAM	z angl. crassulacean acid metabolism
ER	endoplasmatické retikulum (endoplasmic reticulum)
ESCRT	z angl. endosomal sorting complex required for transport
GA	Golgiho aparát (Golgi apparatus)
GAP	z angl. GTPase activating protein
GDF	z angl. GDI displacement factor
GDI	z angl. GDP dissociation inhibitor
GDP	guanosindifosfát (guanosine diphosphate)
GEF/GEP	výměnný faktor (guanine nucleotide exchange factor/protein)
GFP	zelený fluorescenční protein (green fluorescent protein)
GTP	guanosintrifosfát (guanosine triphosphate)
MV	methylviologen (methyl viologen)
MVB	z angl. multivesicular body
NADP ⁺	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)
NHX	Na ⁺ /H ⁺ přenašeč (Na ⁺ /H ⁺ antiporter)
NPSN	z angl. novel plant SNARE
NSF	z angl. N-ethylmaleimide sensitive fusion protein
OX	nadměrná exprese/nadměrně exprimující (overexpression/overexpressing)
PEG	polyethylenglykol (polyethylene glycol)
PM	plasmatická membrána (plasma membrane)
PVC	prevakuolární kompartment (prevacuolar compartment)
<i>QQS</i>	z angl. Qua-Quine Starch
ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
SNAP	z angl. soluble NSF attachment protein
SNARE	z angl. soluble NSF attachment protein receptor
TGN	z angl. <i>trans</i> -Golgi network
TOR	z angl. target of rapamycin
TRAPP	z angl. transport protein particle
VAMP	z angl. vesicle-associated membrane protein
VHA	vakuolární H ⁺ -ATPáza (vacuolar H ⁺ -ATPase)
WT	divoký typ (wild type)

1. Úvod

Téměř veškerá lidská strava a živočišná krmiva pocházejí přímo či nepřímo z rostlin. Je proto velmi důležité pochopit mechanismy působení faktorů, které negativně ovlivňují růst rostlin a snižují výtěžek hospodářských plodin. Zejména v posledních letech nabývá studium působení stresorů na rostliny na významu jak v základním, tak též v aplikovaném výzkumu. Jednou z hlavních příčin vzrůstajícího zájmu o tuto problematiku jsou změny životního prostředí nastávající po celém světě. Mezi ně patří zejména větší výkyvy teplot a srážek, jež mohou být krátkodobé a nečekané, jindy naopak dlouhodobé. Tyto faktory mohou též souviset s dalšími negativními jevy, například se zasolením půdy. Další velmi významnou příčinou je neustále rostoucí lidská populace. V době psaní tohoto textu čítá lidstvo dle stránky <http://www.worldometers.info/world-population/> lehce přes 7,6 miliardy lidí. Existuje několik projekcí Organizace spojených národů (OSN), jak bude vypadat další vývoj, nicméně shoda panuje v tom, že minimálně dalších několik desítek let bude lidská populace narůstat. S tím se přirozeně zvyšuje množství potravin nezbytné k uspokojení jejich potřeb, a tedy též snaha připravit plodiny schopné nasytit vzrůstající poptávku i přes zhoršení podmínek pro pěstování.

Cílem této bakalářské práce je shrnout poznatky o zapojení RAB GTPáz a SNARE proteinů do odpovědi na působení abiotických stresorů v drahách navazujících na Golgiho aparát (GA). Shrnuty jsou též aktuální znalosti o funkcích těchto proteinových rodin v odpovědi na oxidativní stres, neboť tento typ stresu může úzce souviset s vlivem abiotických stresových faktorů. Pochopení funkcí RAB GTPáz a SNARE proteinů a vzájemných interakcí mezi nimi i dalšími buněčnými komponentami může vést ke komplexnějšímu porozumění toho, jak působení abiotických stresorů mění membránový transport v buňce, a tedy jak přesně na ně rostlina reaguje. Tyto poznatky jsou velmi důležitou prerekvizitou pro realizaci snah o vytvoření rostlin, jež budou schopny lépe snášet nepříznivé podmínky prostředí. Takovéto rostliny mají potenciál vyřešit či minimálně výrazně omezit problémy se zajištěním stravy pro rostoucí lidskou populaci nejen po stránce kvantitativní, ale též kvalitativní. V závěru práce se pokusím shrnout, zda jsou genetické úpravy související se změnou úrovně exprese RAB GTPáz a SNARE proteinů či s expresí těchto proteinů z jiných druhů (typicky odolnějších) v rostlinách schopné zvýšit jejich toleranci k abiotickým stresorům, či zda je nutné při této snaze hledat jiné molekulární hráče.

2. Fenomén stresu a odpověď rostlin na něj

2.1. Stresové faktory a stres

Stresové faktory neboli stresory bývají definovány jako nepříznivé vlivy vnějšího prostředí, které závažným způsobem ohrožují rostlinu. **Stres** lze definovat jako fyziologický stav rostliny, která reaguje na působení stresorů aktivací obranných mechanismů. Jejich cílem je obnovení rovnovážného stavu, tzv. homeostáze (Pavlová 2005).

Stres můžeme dělit na základě různých hledisek. Jedním z nich je rozdělení podle délky a intenzity působení na intenzivní, avšak typicky krátkodobý stres akutní a déle trvající stres chronický, který však mívá menší intenzitu. Nejčastěji se používá dělení podle charakteru působících stresorů na stres biotický a abiotický. Do biotického stresu spadá především herbivorie, vzájemné interakce mezi rostlinami (zejména konkurence) a působení patogenů. Abiotické stresory lze rozdělit na fyzikální a chemické. Do prvně jmenované skupiny spadá mechanické poškození, nadměrné ozáření či působení nízkých nebo vysokých teplot. Mezi stresory chemické se řadí nedostatek živin, sucho či naopak nadbytek vody, nízké pH, přítomnost toxických kovů v půdě či nadbytek iontů různých solí (Buchanan *et al.* 2015). Solný a osmotický stres jsou níže charakterizovány, neboť právě tyto dva stesy představují stále aktuálnější problém a zabývá se jimi většina studií analyzujících abiotický stres. Stručně popsán je i mechanický stres, jenž velmi úzce souvisí s růstem buněk a potažmo i celé rostliny. Sekundárním oxidativním stresem se zabývá kapitola 2.2.1. níže.

2.1.1. Solný stres

Solný stres představuje jedno z nejvýznamnějších ohrožení v zemědělské produkci. Roli v zasolování půdy mohou hrát přirozené procesy, například výpar vody v aridních oblastech, zvětrávání určitých typů matečných hornin či přímé zasolování pobřežních oblastí moří a oceánů. Zejména v poslední době je však často na vině lidská činnost. Jmenovat lze nevhodně nastavené umělé zavlažování půdy vedoucí k akumulaci iontů obsažených ve vodě či solení silnic při zimní údržbě. Salinitou je dnes ohroženo zhruba 7 % povrchu souše a zavlažované zemědělské plochy představují 58 % sekundárně zasolené půdy (Li *et al.* 2014). Očekává se, že se budou tato čísla nadále zvyšovat, a problémy se zasolením půdy se tak stanou ještě výraznějšími.

Solný stres je způsobený nadbytkem určitých iontů v půdě. Dle práce Munns & Tester (2008) je půda definována jako zasolená, pokud je elektrická vodivost jejího výluhu rovna alespoň 4 dS/m. Tato vodivost odpovídá zhruba koncentraci 40 mM chloridu sodného. Nejčastěji se

v půdě vyskytují právě sodné kationty a chloridové anionty vznikající z této soli. Vedle nich jsou hojné také ionty SO_4^{2-} , Mg^{2+} či Ca^{2+} . Sodné ionty nepatří mezi esenciální živiny většiny suchozemských rostlin a obsah těchto iontů v nich není za běžných podmínek příliš vysoký. Toxicita sodných iontů spočívá v nahrazení draselných iontů v různých strukturách, které vede k narušení jejich fungování. Například více než 50 enzymů je aktivováno draselnými ionty, zatímco sodné ionty nejsou schopné tuto roli vykonávat. Chloridové ionty bývají pro rostlinu méně škodlivé než sodné, neboť chlor hraje roli v celé řadě buněčných procesů, shrnuto v Tester and Davenport (2003).

Rozlišují se dvě fáze solného stresu, fáze osmotická a iontová neboli iontově toxická. Při působení soli nejprve nastupuje fáze osmotická, která je rychlá a výrazně omezuje růst rostliny. Tato fáze je způsobena zejména osmotickým efektem soli v půdě, ionty se při ní v pletivech ve vyšší míře neakumulují (Munns & Tester 2008). Probíhající buněčné a metabolické procesy jsou podobné jako u rostlin vystavených suchu (viz kapitola 2.1.2.). Iontová fáze nastává při překročení schopnosti buňky sekvestrovat nadbytečné ionty z cytoplazmy, důsledkem je pak nahromadění jejich toxického množství. Při této fázi solného stresu dochází k posunu rovnováh metabolických dějů, což vede k urychlení nástupu senescence zejména starších částí rostlin (Munns & Tester 2008). Doba trvání těchto fází ani přechod mezi nimi nejsou obecně definovány, záleží na konkrétním rostlinném druhu i na koncentraci působících solí. Při působení solného stresu dochází zejména ke změnám exprese genů či enzymové aktivity proteinů. Například Suzuki *et al.* zaznamenali při déle trvajícím solném stresu (100mM NaCl) v mangrovové rostlině *Bruguiera sexangula* zvýšení aktivity některých enzymů zapojených do glykolýzy, konkrétně fosfofruktokinázy a pyruvátkinázy (Suzuki *et al.* 2005). Tyto enzymy přispívají ke zvýšení katabolismu glukózy, jež umožňuje dostatečné zásobení energií při působení solného stresu (Suzuki *et al.* 2005).

2.1.2. Osmotický stres

Osmotický stres představuje stav nedostatku či nedostupnosti vody a často souvisí s výše charakterizovaným solným stresem. Pro rostliny je nezbytný dostatečný turgor (tlak plasmatické membrány (PM) na buněčnou stěnu), jenž úzce souvisí s obsahem vody v buňce. Hnací silou pohybu vody je tzv. vodní potenciál, označovaný Ψ_w . Tato veličina udává rozdíl mezi chemickým potenciálem vody, jež je složkou určité soustavy, a čisté vody, jejíž potenciál je konvenčně považován za nulový. Vodní potenciál je v rostlinách typicky záporný a má několik složek – potenciál osmotický, tlakový, gravitační a matriční (Pavlová 2005). Rozpuštěné látky, tzv. soluty, vodní potenciál snižují a zároveň platí, že voda se pohybuje z míst

s vyšším do míst s nižším vodním potenciálem. Reálná rychlost pohybu vody je silně ovlivněna též propustností prostředí (například pletiva či PM), kterým voda prochází. Veličina charakterizující tuto vlastnost prostředí se nazývá vodní permeabilita (L_p) (Pavlová 2005). Za normální situace je koncentrace solutů v cytoplasmě větší než vně buňky, voda tedy proniká přes semipermeabilní PM do buňky a zvyšuje turgor. Tento gradient může být narušen přítomností osmoticky aktivních látek vně buňky, nejčastěji ionty či organickými látkami (Buchanan *et al.* 2015). Nedostatek vody pro rostlinu může být způsoben též výrazným výparem vody při nedostatku srážek, jmenovat lze i nevhodný půdní profil či mráz.

Omezená dostupnost vody se navenek projevuje vadnutím rostliny a též uvnitř buňky dochází k řadě změn. Narušené jsou některé metabolické dráhy, například fotosyntéza či proteosyntéza, transport látek, správná funkce enzymů a v neposlední řadě růst buňky, shrnuto v Munns & Tester (2008). Osmotický stres představuje výrazný selekční tlak, rostliny si proto vyvinuly celou řadu mechanismů zmírňujících jeho působení. Mezi tyto mechanismy patří zejména tzv. CAM metabolismus (z angl. crassulacean acid metabolism). Jedná se o specifický druh fotosyntézy vyskytující se typicky u sukulentů. Tyto rostliny otevírají průduchy a přijímají CO_2 zejména v noci, přes den jsou kvůli omezení ztrát vody průduchy uzavřené (Buchanan *et al.* 2015). Mezi důležité mechanismy patří též přizpůsobení kořenového systému, tvorba silné kutikuly či produkce osmoprotektivních látek (Pavlová 2005). Řada prací se zabývá zapojením rostlinného hormonu kyseliny abscisové (ABA) do odpovědi na osmotický stres, shrnuto v Fujita *et al.* (2011). Bylo objeveno mnoho dalších molekulárních mechanismů ovlivňujících toleranci k osmotickému stresu. Sem spadá i zapojení různých SNARE a RAB proteinů, jimž se podrobněji věnuje tato práce.

2.1.3. Mechanický stres

Mechanický stres lze rozdělit na interní (důležitý pro růst, působí na úrovni buněk a pletiv) a externí (způsoben vnějšími faktory). Tento stres je detekován přímo v cytoplasmě, kde dochází k mechanické změně konformace proteinů. Důsledkem je pak narušení jejich vazebných či enzymatických schopností. Mezi reakce buňky na mechanický stres patří zejména reorientace kortikálních mikrotubulů vedoucí ke zvýšení pevnosti buněk a následně celých rostlinných orgánů (Hamant *et al.* 2008, Uyttewaal *et al.* 2012). Mechanickou pevnost dodává též lignifikace sekundární buněčné stěny (například v pletivu zvaném sklerenchym) či epidermis díky silnější primární buněčné stěně na vnější straně buněk (Pavlová 2005). Reakcí buněk na tento typ stresu je také exprese TOUCH genů, například genů pro tzv. kalmodulin-like proteiny (Braam & Davis 1990). Celkem zhruba 2,5 % všech genů je v *Arabidopsis thaliana* indukováno

mechanickými podněty (Lee *et al.* 2005). V kořenech bylo pozorováno po mechanické stimulaci uvolnění adenosintrifosfátu (ATP) do mimobuněčného prostoru, tedy ATP zřejmě funguje též jako mimobuněčný signál (Jeter *et al.* 2004, Weerasinghe *et al.* 2009).

2.2. Vyrovnání se rostlin se stresory

Rostliny na rozdíl od živočichů nemají možnost při působení stresorů opustit původní místo a vyhledat si místo příhodnější. Značný význam tak mají mechanismy umožňující jim se s podmínkami prostředí efektivně vyrovnat přímo v daném místě. K těmto mechanismům patří zejména velká regenerační schopnost či plasticita růstu, vývoje a metabolismu.

Citlivost ke stresorům se liší nejen mezi rozdílnými druhy rostlin, ale též v rámci jedné rostliny mezi jejími různými pletivy či fázemi ontogeneze. Rozlišují se dvě základní strategie resistance, avoidance a tolerance. Avoidance je vzhledem ke stresoru pasivní způsob vyhnutí se jeho působení. Tolerance pak představuje aktivní proces, který je spojen se spuštěním stresové odpovědi (Pavlová 2005). Ve stresové odpovědi lze nalézt několik obecných charakteristik. Dvě z nich, produkce reaktivních forem kyslíku (ROS, z angl. reactive oxygen species) a autofágie, jsou níže charakterizovány.

2.2.1. Produkce ROS

Vznik ROS je sekundárním efektem působení široké škály stresorů, mezi něž se řadí sucho, intenzivní světlo, působení vysokých i nízkých teplot či patogenů. Významným faktorem zvyšujícím produkci ROS je také přítomnost těžkých kovů (Sytar *et al.* 2013). ROS způsobují oxidativní stres řadící se mezi stresy sekundární, neboť vyplývá z důsledků stresu primárního (Pérez-Pérez *et al.* 2012). Mezi ROS můžeme zařadit singletní kyslík ($^1\text{O}_2$), dále superoxidový anionradikál (O_2^-), perhydroxylový radikál ($\text{HO}_2\cdot$), peroxid vodíku (H_2O_2) či nejreaktivnější hydroxylový radikál ($\text{OH}\cdot$), shrnuto v Buchanan *et al.* (2015).

Významnými producenty ROS jsou mitochondrie, peroxisomy a u rostlin též chloroplasty. Za běžného stavu se ve fotosystému I přenáší elektron na NADP^+ a způsobuje jeho redukci na NADPH. Při přetížení řetězce však dochází při tzv. Mehlerově reakci ke vzniku superoxidového anionradikálu. Přírodním vedlejším produktem činnosti fotosystému II je singletní kyslík (Gill & Tuteja 2010). V mitochondriích rostlinných buněk funguje tzv. alternativní oxidáza. Tato oxidáza pomáhá zajišťovat stálý tok řetězcem vedoucí ke snížené mitochondriální produkci ROS (Maxwell *et al.* 1999). Hlavními producenty ROS v mitochondriích jsou komplex I, ubiquinon a komplex III (Gill & Tuteja 2010).

ROS jsou pro buňku toxické a ovlivňují celou řadu procesů a struktur. Mohou působit přeměny v existujících proteinech (porušují jejich hlavní i postranní řetězce) či narušovat funkce membrán peroxidací nenasycených mastných kyselin v lipidech (Mirzaei *et al.* 2012). V neposlední řadě mohou reagovat s DNA a způsobovat mutace. Rostliny si proto vytvořily celou řadu mechanismů snižujících jejich negativní vliv. Tyto mechanismy lze rozdělit na enzymatické (významné enzymy jsou superoxid dismutasa, katalasa či askorbát peroxidasa) a na neenzymatické, například působení glutathionu, askorbátu, antokyanů či karotenoidů, shrnuto v Sytar *et al.* (2013).

Je důležité podotknout, že ROS nejsou pro rostliny pouze škodlivé, nýbrž zajišťují i důležité funkce, zejména obranu a signalizaci. ROS v nízkých koncentracích fungují jako sekundární poslové umožňující buňce přizpůsobit se podmínkám prostředí (Pérez-Pérez *et al.* 2012). ROS hrají důležitou roli v boji s patogeny i v regulaci apikálního růstu. Oxidativní stres také představuje významný krok vedoucí k autofágii (Michaeli *et al.* 2016, Scherz-Shouval *et al.* 2007).

2.2.2. Autofágie

Autofágie je v eukaryotech hlavní a velmi konzervovanou drahou zajišťující obrat poškozených proteinů a organel. Může sloužit jak k hromadné degradaci látek poškozených působením stresorů, tak může být velmi selektivní a regulovat buněčné procesy i při příhodných podmínkách (Michaeli *et al.* 2016). Rozlišují se dvě základní autofagické dráhy, makroautofágie a mikroautofágie. Lépe prozkoumaná je makroautofágie, která začíná formací izolační membrány, tzv. fagoforu. Konce fagoforu se pak spojují a vzniká tzv. autofagosom, dvoumembránový váček obsahující materiál určený k degradaci. Autofagosom následně fúzuje s lytickou vakuolou a dochází k degradaci v něm obsaženého materiálu (Il Kwon & Park 2008). Mikroautofágie představuje proces pohlcení cytoplasmatického materiálu přímo vakuolou prostřednictvím invaginace tonoplastu. Tento proces vede ke vzniku autofagických tělísek uvnitř vakuoly a bývá využit pro degradaci zásobních proteinů během klíčení či vývojové senescence (Il Kwon & Park 2008).

Proteiny zapojené do autofágie se dají rozdělit do několika funkčních skupin. Jmenovat lze například ATG1 komplex, který funguje jako důležitý regulátor autofágie a který je sám negativně regulován kinázou TOR (z angl. target of rapamycin). Tato kináza se v buňce podílí na integraci nutričních a energetických podnětů. Ukazuje se, že ROS vedou k inaktivaci TOR kinázy, a tedy k aktivaci autofágie, shrnuto v Michaeli *et al.* (2016). Objevují se též důkazy, že do regulace autofágie je i u rostlin zapojen komplex ESCRT (z angl. endosomal sorting

complex required for transport). Například složka tohoto komplexu FREE1 reguluje autofágii usnadněním fúze autofagosomu s vakuolou (Gao *et al.* 2015). Kulich *et al.* dále ukázali, že poutací komplex exocyst obsahující podjednotku EXO70B1 je v *A. thaliana* zapojen do regulace autofágie (Kulich *et al.* 2013).

Autofágie je základní mechanismus umožňující zásobení živinami při jejich snížené dostupnosti. Pro rostliny s defektní autofagickou drahou je typický výskyt listových chloróz a nižší míra přežívání při nedostatku uhlíku i dusíku (Kulich *et al.* 2013). Autofágie je zapojena do buněčného růstu a diferenciaci, podílí se i na formování kořenových vlásků a prodlužování kořenů. Kwon *et al.* ukázali, že protein RABG3b v *A. thaliana* skrze zvýšení autofagické aktivity přispívá k hypersenzitivní odpovědi, specifické formě programované buněčné smrti (Kwon *et al.* 2013). Tento protein zřejmě funguje v procesu maturace autofagozómu (Kwon *et al.* 2013). Autofágie má tedy dvojí roli – na jedné straně může vést k buněčné smrti, na straně druhé k přežití buňky. Obě tyto funkce musí být přesně regulovány a závisí též na vývojovém stádiu, buněčném typu či stimulech, jimž je rostlina vystavena (Il Kwon & Park 2008).

3. Membránový transport v rostlinách

3.1. Úvod

Eukaryotická buňka je funkčně kompartmentovaná a membránový transport hraje velmi významnou roli v doručování široké škály látek mezi membránovými kompartmenty, PM a mimobuněčným prostorem (Kanazawa & Ueda 2017). Membránový transport rostlin sdílí řadu vlastností s ostatními eukaryoty, nalezneme v něm však také jistá specifika. Buňky v rostlinách se nemohou přemísťovat, rostlinné orgány tak získávají tvar orientovaným buněčným dělením a regulovaným růstem buněk. Pro obě tyto funkce je nezbytná cílená sekrece proteinů. Přechod na souš a vznik mnohobuněčnosti jsou zřejmě u zelených rostlin zodpovědné za dramatickou diverzifikaci transportních drah dále od GA. Tato diverzifikace je též spojena s velkou expanzí komponent účastnících se těchto drah. Příkladem může být expanze SNARE proteinů skupiny SYP1 či RAB GTPáz skupiny RAB11/RABA v suchozemských rostlinách (Kanazawa & Ueda 2017).

Membránový transport obecně začíná tříděním materiálu a tvorbou transportního váčku na donorové membráně. Toto je zprostředkováno SAR/ARF GTPázami a komplexy obalových

proteinů jako klatrin, COPI či COPII. Vzniklý váček je po oddělení od donorové membrány transportován k membráně cílové, k níž je připojen specifickými RAB GTPázami a jejich efekty. V závěrečném kroku transportní dráhy váček s touto membránou fúzuje. Tato fúze je zprostředkována SNARE proteiny, shrnuto v Ebine & Ueda (2009) a Jürgens (2004).

3.2. Kompartmenty v transportu navazujícím na Golgiho aparát

V transportních drahách návazných na GA patří mezi dobře strukturně definované kompartmenty *trans*-Golgi network (TGN), multivesicular body (MVB) (též označováno prevacuolar compartment (PVC)) a dva typy vakuol (Park & Jürgens 2012).

TGN – Jedná se o tubulovesikulární kompartment, který je často úzce asociován s cisternami GA. Představuje hlavní místo třídění proteinů určených k exocytóze. U rostlin funguje TGN, nebo určitá jeho část, jako časný endosom (Dettmer 2006). Integrita a morfologie TGN je udržována různými faktory, podíl mají například SNARE proteiny skupiny SYP4 (Uemura *et al.* 2012a).

PVC/MVB – Jedná se o kompartment obsahující intralumenární váčky formované lokálními invaginacemi membrány. PVC přenáší proteiny vytríděné v TGN směrem k vakuole a funkčně odpovídá pozdnímu endosomu u živočichů (Tse *et al.* 2004). PVC nakonec fúzuje s tonoplastem a vnitřní váčky jsou uvolněny k degradaci (Park & Jürgens 2012).

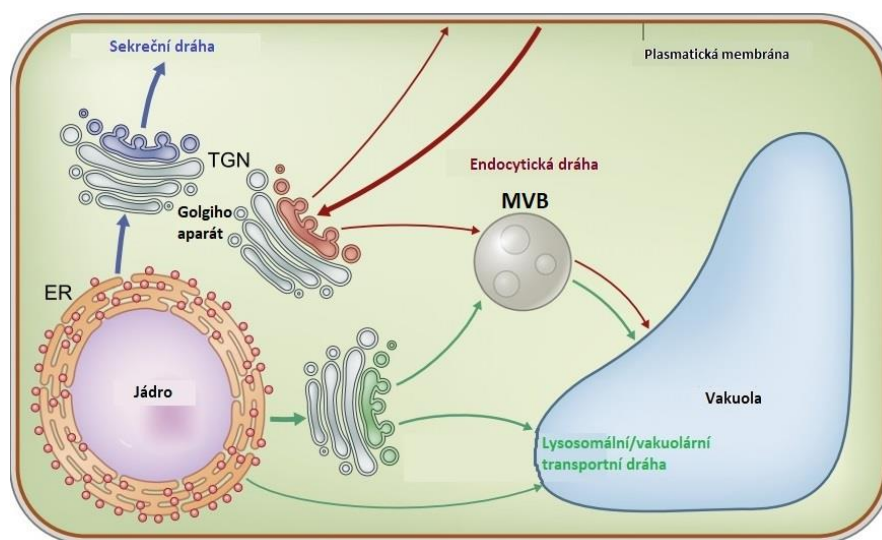
Vakuoly – Rostlinné vakuoly se liší tvarem, velikostí, funkcí i obsahem. Rozlišují se dva základní typy vakuol: vakuoly skladující proteiny, které slouží mj. jako zdroj energie pro klíčení, a vakuoly lytické. Jejich hlavní funkcí je degradace proteinů či skladování odpadních a toxických látek, shrnuto v Peixoto *et al.* (2017). Na funkci vakuol se podílí celá řada faktorů, například Kolb *et al.* (2015) objevili význam proteinu FYVE1 v biogenezi vakuoly.

Buněčná deska (též označováno buněčná destička) – Jedná se o přechodný membránový kompartment vznikající při cytokinezi rostlinné buňky. Buněčná deska vzniká především homotypickou fúzí váčků odvozených od GA/TGN. Doručení těchto váčků do roviny dělení je zajištěno dynamickým mikrotubulárním útvarem zvaným fragmoplast (Park & Jürgens 2012).

3.3. Základní a specializované dráhy transportu, zapojené proteiny

Membránový transport rostlin zahrnuje tři základní dráhy: dráhu sekreční, endocytickou a dráhu směřující do vakuoly, viz obrázek 1. Sekreční dráha je zodpovědná za transport nově syntetizovaných proteinů typicky z endoplasmatického retikula (ER) skrze GA do PM či

mimobuněčného prostoru. Tato dráha je považována za základní transportní dráhu v interfázové buňce (Kanazawa & Ueda 2017). Endocytická dráha zprostředkuje transport z PM do organel. První touto organelou je časný endosom, u rostlin tedy TGN (Dettmer 2006). Zde je materiál tříděn a může být recyklován zpět na PM (například auxinové přenašeče PIN1 a PIN2 či transportér boru BOR1), anebo je transportován do vakuoly a degradován. Signálem pro endocytózu proteinů z PM s cílem degradace je jejich ubiquitinace (Park & Jürgens 2012). Důležitou roli v endocytické dráze hraje klatrin, nicméně v rostlinách zřejmě též existuje na klatrinu nezávislý typ endocytózy (Onelli *et al.* 2008). Transport do vakuoly zahrnuje více odlišně regulovaných drah. Jejich součástí může být MVB, jiná dráha je zřejmě nezávislá na GA (Kanazawa & Ueda 2017). Pro transport do vakuoly potřebují nově syntetizované rozpustné proteiny na svém N- či C-konci vakuolární třídící sekvenci. Třídící mechanismy membránových proteinů jsou prozkoumány výrazně méně, shrnuto v Park & Jürgens (2012).



Obrázek 1: Tři základní dráhy membránového transportu: sekreční dráha, endocytická dráha a dráha směřující do lysosomu/vakuoly. Upraveno podle Kanazawa & Ueda (2017).

Kromě transportních drah společných všem eukaryotům existují také dráhy rostlinně specifické. Jednou z nich je membránový transport do rozhraní mezi rostlinou a mikroorganismem. Rozlišují se tři typy těchto membrán: membrána symbiosomu (symbiosome membrane) obalující bakterie rodu *Rhizobium* v symbiose s rostlinami čeledi Fabaceae, periarbuskulární membrána obklopující arbuskul formovaný mykorhizní houbou a extrahaustoriální membrána obklopující haustorium tvořené vláknitými patogenními mikroorganismy, shrnuto v Kanazawa & Ueda (2017). Ukazuje se, že sekreční dráha je nezbytná pro správnou tvorbu symbiosomů,

při tvorbě arbuskulů je tato dráha dočasně přesměrována do periarbuskulární membrány (Pumplin *et al.* 2012).

Rostlinně specifickou drahou je též transport do buněčné desky. Pro biogenezi buněčné desky je důležitý poutací komplex TRAPP II (z angl. transport protein particle II), při její maturaci hraje významnou roli poutací komplex exocyst (Fendrych *et al.* 2010, Rybak *et al.* 2014). Fúze doručených váčků je zajištěna syntaxinem (tj. jedním ze SNARE proteinů) KNOLLE/SYP111, jenž je specifický pro cytokinezi (Lauber *et al.* 1997). Ukazuje se, že dochází k přesměrování sekreční dráhy a recyklaci materiálu z endocytózy do formující se buněčné desky (Kanazawa & Ueda 2017).

Dalším jevem souvisejícím s membránovým transportem je asymetrická lokalizace proteinů v PM. Některé proteiny jsou distribuovány rovnoměrně po celém povrchu PM, řada proteinů však musí být pro správnou funkci lokalizována asymetricky (například auxinové přenašeče z rodiny PIN). V případě proteinu PIN1 se ukázalo, že jeho polární distribuce nevychází pouze ze směrované sekrece, nýbrž též z endocytózy a cílené recyklace zprostředkované proteinem GNOM, aktivačním faktorem ARF GTPázy (Kleine-Vehn *et al.* 2008). Polární lokalizace různých proteinů je dosahováno více rozdílnými mechanismy. Extrémní příklad směrovaného transportu do specifické oblasti PM představuje růst kořenových vlásků či pylové láčky. Zde se předpokládá významná role poutacího komplexu exocyst a RAB GTPáz skupiny RABA/RAB11 (Park & Jürgens 2012).

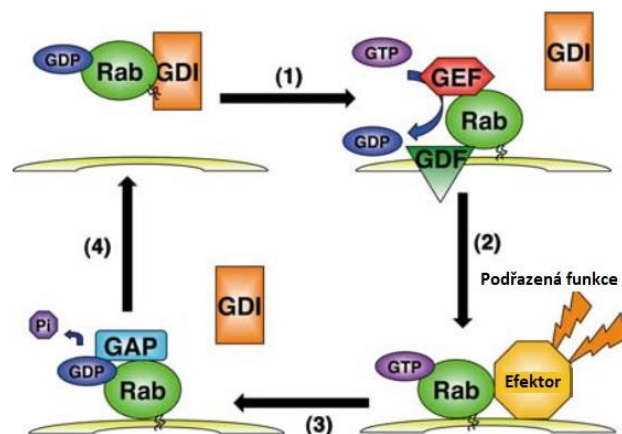
Proteinových rodin či skupin účastnících se membránového transportu je mnoho. Jmenovat lze SAR, ARF a RAB GTPázy s jejich interaktory, obalové proteinové komplexy COPI, COPII či klatrin, heterotetramerní adaptorové proteiny, proteiny příbuzné dynaminu, různé třídící signály a receptory, SNARE proteiny, Sec1/Munc18 proteiny nebo poutací komplexy TRAPP, VFT/GARP, C-VPS, exocyst či retromerní komplex, shrnuto v Jürgens (2004) a Park & Jürgens (2012). Vzhledem k rozsahu této práce bylo nutné vybrat a popsat pouze některé z nich. První zvolenou skupinou jsou RAB GTPázy. Tyto proteiny představují značně diverzifikovanou rodinu malých GTPáz a fungují jako hlavní zprostředkovatelé směrování váčků k cílové membráně. Druhou popisovanou skupinou jsou SNARE proteiny. Jedná se o velmi početnou skupinu proteinů hrajících nesmírně důležitou roli při fúzi membrán. Mnoho studií ukazuje na široké spektrum jejich funkcí, z nichž některé jsou specifické pro rostliny.

4. RAB GTPázy

4.1. Úvod

Velmi významnou skupinou proteinů zapojených do váčkového transportu jsou RAB GTPázy. Tato skupina proteinů je příbuzná Ras GTPázám hrajícím roli v buněčné signalizaci v kvasinkách a živočiších (Vernoud *et al.* 2003). Proteiny RAB představují největší rodinu malých GTPáz příbuzných Ras GTPázám a název této skupiny byl vytvořen dle její identifikace v cDNA knihovnách mozku potkana (*rat brain*) (Touchot *et al.* 1987). Vedle malých GTPáz se v buňce vyskytují také heterotrimerické guanosintrifosfát (GTP)-vázající proteiny. Ukázalo se, že jejich α -podjednotka je příbuzná malým GTPázám (Agarwal *et al.* 2009). Konzervovanou funkcí RAB GTPáz (společně s asociovanými efekty) je podíl na tvorbě váčků a jejich směrování i vázání k cílové membráně (Ebine & Ueda 2009). Zapojení RAB GTPáz společně se SNARE proteiny do váčkového transportu je schematicky znázorněno na obrázku 3 (viz kapitola 5.1.).

RAB GTPázy fungují jako molekulární přepínače závislé na nukleotidu GTP a jeho hydrolyze na GDP (guanosindifosfát). Aktivní GTP-vázající a inaktivní GDP-vázající forma mezi sebou mohou vzájemně přecházet (Ebine & Ueda 2009). Aktivace proteinů RAB probíhá výměnou vázaného GDP za GTP, která je katalyzována specifickými enzymy označovanými jako výměnné faktory (GEF/GEP, z angl. guanine nucleotide exchange factor/protein). Aktivita těchto proteinů vede též ke změně lokalizace RAB GTPáz – jejich forma se mění z cytosolické na membránově vázanou (Agarwal *et al.* 2009) Tato aktivní forma skrze specializované domény interaguje s efektorovými proteiny a spouští pestrou škálu jejich funkcí. Pro ukončení těchto funkcí je nutné, aby GTP na RAB proteinu bylo hydrolyzováno. Účinná hydrolyza GTP je podporována proteiny označovanými jako GTPase activating protein (GAP). Po inaktivaci je GDP-vázající forma RAB GTPázy oddělena od membrány pomocí proteinu zvaného RAB GDP dissociation inhibitor (RAB GDI) a zůstává v cytosolu do dalšího GTPázového cyklu, shrnuto v Ebine & Ueda (2009). Oddělení RAB GTPázy od RAB GDI je zprostředkováno proteinem zvaným GDI displacement factor (GDF) (Dirac-Svejstrup *et al.* 1997). Schéma těchto procesů je znázorněno na obrázku 2.



Obrázek 2: Schematický model cyklu RAB GTPázy. RAB protein je aktivován pomocí GEF (1), následuje ustavení komplexu RAB-efektor (2). GAP hydrolyzuje GTP na RAB proteinu (3), GDP-vázající protein RAB oddělen od membrány pomocí GDI (4). Upraveno podle Ebine & Ueda (2009).

Proteiny RAB mají typicky okolo 200 aminokyselinových zbytků a vyznačují se vysokou sekvenční podobností. Všechny RAB proteiny obsahují pět konzervovaných domén, z toho čtyři (G1, G3, G4 a G5) slouží k vázání a hydrolýze GTP, doména G2 k vázání efektorů, shrnuto v Agarwal *et al.* (2009). Biologické funkce těchto proteinů výrazně závisí na posttranslačních modifikacích. Oblast jejich C-konce je značně proměnlivá, nicméně téměř vždy zahrnuje konzervovaný motiv obsahující dva cysteinové zbytky. Právě tyto zbytky jsou místem isoprenylace (přenesení geranylgeranylové isoprenové jednotky), která je nezbytná pro vázání RAB GTPáz k membráně (Ebine & Ueda 2009). Proměnlivá oblast C-konce RAB GTPáz se podílí také na jejich vnitrobuněčné lokalizaci (Moshkov & Novikova 2008).

U rostlin jsou RAB GTPázy značně diverzifikovány (například v *A. thaliana* bylo identifikováno 57 těchto proteinů) a řada z nich plní rostlinně specifické funkce. Velmi významným takovýmto proteinem je ARA6. Tento protein je mj. charakteristický absencí výše zmíněného cysteinového motivu na C-konci. Pro jeho vazbu k membráně a správnou lokalizaci je důležitá myristoylace a palmitoylace. Tyto modifikace probíhají na N-konci proteinu ARA6 a jsou umožněny přítomností specifických aminokyselinových motivů (Ueda *et al.* 2001). Fylogenetické analýzy navrhuji rozdělení RAB GTPáz do podrodin na základě jejich lokalizace či funkce v membránovém transportu. U *A. thaliana* rozlišujeme osm podrodin RAB proteinů, označovaných RABA, RABB, RABC, RABD, RABE, RABF, RABG a RABH. Tyto skupiny ve smyslu homologie korespondují s RAB proteiny u živočichů či kvasinek v tomto pořadí: RAB11, RAB2, RAB18, RAB1, RAB8, RAB5, RAB7 a RAB6 (Rutherford & Moore 2002). Proteiny RABA tvoří nejpočetnější skupinu RAB GTPáz (26 členů z celkem 57 RAB GTPáz u *A. thaliana*) a hrají důležitou roli v transportu mezi TGN a PM, případně vakuolou (Asaoka

et al. 2013a). Skupina RABB je lokalizována zejména na GA a interaguje s proteiny obsaženými v jeho matrix. RABC GTPázy jsou prozkoumány hůře, předpokládá se však jejich role v kontrole endocytické dráhy. Funkce proteinů skupiny RABD je v anterográdním transportu mezi ER a GA i v transportu v rámci GA (Rutherford & Moore 2002). Tyto proteiny jsou dle fylogenetických analýz příbuzné skupině RABE. Členové podrodiny RABE fungují v sekretorické dráze mezi GA a PM a transkripce některých z nich je kontrolována etylénem, shrnuto v Moshkov & Novikova (2008). Skupina RABF hraje roli v endocytóze a transportu do vakuoly a zahrnuje mj. významný rostlinně specifický protein ARA6 (Uemura & Ueda 2014). Proteiny RABG regulují zejména fúzi váčků odvozených od pozdního endosomu s vakuolou. Řada studií, například George & Parida (2011), ukazuje na jejich značnou konzervovanost i mezi nepříbuznými organismy. Relativně velký počet proteinů ve skupině RABG zřejmě reflektuje diverzifikaci rostlinných vakuol a s nimi asociovaných transportních drah (Uemura & Ueda 2014). Podrodina RABH hraje roli zřejmě v retrográdním transportu skrze membrány GA. Je důležitá též pro transport z GA do ER nezávislý na obalovém proteinu COPI (Moshkov & Novikova 2008).

RAB GTPázy plní v rostlinách celou řadu funkcí buněčných, fyziologických i vývojových. Ukazuje se jejich role ve fytochromové signalizaci, diferenciaci svěřacích buněk průduchů, v ustanovení a udržení polarity ve špičce kořenových vlásků i pylové láčky či při tvorbě kořenových hlízek u čeledi Fabaceae, shrnuto v Agarwal *et al.* (2009). Řada publikací ukazuje roli RAB proteinů v odpovědi na podmínky prostředí, například Mirzaei *et al.* ukázali v rýži (*Oryza sativa*) zvýšenou expresi čtyř RAB proteinů (RAB2a, RAB7, RAB7a a RAB11C) v odpovědi na sucho (Mirzaei *et al.* 2012). Kwon *et al.* ukázali, že protein RABG3b v *A. thaliana* reguluje skrze pozitivní roli v autofágii programovanou buněčnou smrt při odpovědi na působení stresorů i během vývojových procesů (Kwon *et al.* 2013). Funkcím RAB GTPáz při působení abiotického stresu se podrobně věnuje kapitola 4.2. níže. Role v biotickém stresu byla zkoumána například v práci Huang *et al.* (2016). Autoři ukázali, že protein NbRABG3f v *Nicotiana benthamiana* hraje klíčovou roli v akumulaci BaMV (z angl. bamboo mosaic virus) uvnitř buňky. BaMV zřejmě využívá protein NbRABG3f k formování váčků z membrány GA (Huang *et al.* 2016).

4.2. Zapojení RAB GTPáz do odpovědi na abiotický stres

Řazení proteinů v této kapitole vychází ze systému užívaného zejména u živočichů a kvasinek, neboť toto označování bylo užito ve většině níže citovaných prací. Pro upřesnění je za lomítkem vždy uvedeno též označení dané skupiny proteinů běžné pro rostliny. Pořadí je následující: RAB2/RABB, RAB5/RABF, RAB6/RABH, RAB7/RABG a RAB11/RABA. Některé ze skupin zmíněných v kapitole 4.1. zde nejsou zahrnuty, neboť nebyla nalezena práce zabývající se jejich zapojením do abiotického či oxidativního stresu. Proteiny z *A. thaliana* jsou řazeny předně, následují je proteiny dalších rostlinných druhů.

4.2.1. RAB2/RABB

SsRAB2 – Protein SsRAB2 z trávy *Sporobolus stapfianus* byl zkoumán ve studii O'Mahony & Oliver (1999). Autoři ukázali, že bazální transkripce genu kódujícího tento protein je nízká. Množství transkriptu SsRAB2 však začalo stoupat během vysychání rostlin při relativním obsahu vody menším než 87 %. Maximální akumulace tohoto transkriptu bylo dosaženo při relativním obsahu vody mezi 77 % a 11 %, pak jeho množství začalo opět klesat. Během prvních šesti hodin následné rehydratace zůstala úroveň transkripce oproti dehydratovanému stavu téměř nezměněná. K jejímu výraznějšímu zvýšení došlo zhruba po 12 hodinách a podobné výsledky byly zaznamenány v listech i kořenech. SsRAB2 tedy hraje roli v přípravě na dehydrataci i v zotavení z ní. Zvýšení transkripce SsRAB2 může korelovat s poškozením membrány při vysychání a následné rehydrataci. Může indikovat též posílení reparačních procesů, zejména zvýšení transportu proteinů a lipidů (O'Mahony & Oliver 1999).

LtRAB2 – Protein LtRAB2 z jílku mámivého (*Lolium temulentum*) byl zkoumán ve studii Dombrowski *et al.* (2008). Autoři zaznamenali nízkou transkripci genu kódujícího tento protein za kontrolních podmínek, ve shodě s prací O'Mahony & Oliver (1999). Působení 500mM NaCl však vedlo k postupné akumulaci jeho transkriptu po dobu 24 hodin. Dombrowski *et al.* (2008) ukázali podobné úrovně exprese genu kódujícího protein LtRAB2 a stresového genu *P5CS*. Oba tyto geny vykazaly zvýšenou transkripci při působení vyšší koncentrace NaCl (>300 mM), chladu (4 °C) a sucha (tři dny bez zálivky). Jiné stresory, např. 12,87% polyethylenglykol (PEG) či teplota 40 °C, expresi těchto genů nezvýšily (Dombrowski *et al.* 2008). LtRAB2 je zřejmě zapojen do regulace stresových odpovědí souvisejících s nedostatkem vody. Tato hypotéza je podpořena též zvýšenou expresí genu pro LtRAB2 během desikace provázející zrání semen (Dombrowski *et al.* 2008). Proti ní ovšem hovoří fakt, že osmotický stres simulovaný aplikací PEG transkripci genu kódujícího LtRAB2 nezvýšil. Vysvětlením může být nízká aplikovaná

koncentrace PEG (12,87 %), která nemusela být pro pozorovatelné zvýšení transkripce dostatečná.

4.2.2. RAB5/RABF

ARA6 – Ebine *et al.* ukázali, že rostlinně specifický protein ARA6 (označovaný též RABF1) reguluje v *A. thaliana* formaci SNARE komplexu zahrnujícího R-SNARE protein VAMP727 a Qa-SNARE protein SYP121 (Ebine *et al.* 2011, 2012). ARA6 hraje specifickou roli v transportu z endosomů do PM a funguje též v dráze regulující odpověď na solný stres. Mutantní rostliny v genu pro ARA6 (*ara6*) vykazovaly hypersenzitivitu k 50mM NaCl. Rostliny nadměrně exprimující (OX) gen kódující fúzní protein ARA6^{Q93L}-GFP (konstitutivně aktivní ARA6 fúzovaný se zeleným fluorescenčním proteinem (GFP)) naopak vykazovaly větší toleranci ke 100mM NaCl (Ebine *et al.* 2011).

Ebine *et al.* v další studii ukázali, že transgenní rostliny exprimující tento fúzní protein ARA6^{Q93L}-GFP vykazují větší toleranci také k osmotickému stresu (sorbitol o koncentraci 200 mM) než WT (Ebine *et al.* 2012). Konstitutivně aktivní protein ARA6 v odpovědi na solný stres tvoří agregáty ve specializovaných subdoménách PM (Ebine *et al.* 2011). Tyto subdomény mohou představovat rozhraní (interface) zodpovědné za vnímání či detoxifikaci osmotického a solného stresu (Ebine *et al.* 2012).

Tsutsui *et al.* ukázali, že protein ARA6 je nezbytný pro homeostázi škrobu a glukózy (Tsutsui *et al.* 2015). Mutantní rostliny *ara6* vykazovaly mnohonásobně zvýšenou transkripci genu Quaque Starch (*QQS*), který hraje roli v udržování správné hladiny škrobu. Tyto rostliny pak měly menší obsah škrobu a vyšší obsah glukózy. Rostliny *ara6* jsou zřejmě kvůli narušené homeostázi glukózy a škrobu defektní v osmotickém přizpůsobení cytoplasmy. Tato skutečnost může vysvětlit jejich hypersenzitivitu k NaCl i sorbitolu ve studiích Ebine *et al.* (2011, 2012). Mechanismus působení mutace genu *ARA6* není přesně znám, uvažuje se o narušení funkcí dalších transkripčních regulátorů genu *QQS* (Tsutsui *et al.* 2015).

Délku kořenů při působení 100mM NaCl u různých linií *A. thaliana* zkoumali Yin *et al.* (2017). Autoři zaznamenali při působení soli u rostlin nadměrně exprimujících gen *ARA6* i u linií ARA6^{Q93L} (exprimuje konstitutivně aktivní ARA6) a ARA6^{S47N} (exprimuje dominantně negativní ARA6) delší kořeny o 37,1 %, 35,1 %, respektive 37,1 % než u WT (z angl. wild type). Mutantní rostliny *ara6* vykazovaly při této koncentraci NaCl stejnou délku kořenů jako WT. Délka kořenů u linie ARA6^{Δ1-29} (neschopnost N-myristoylace proteinu ARA6) byla též srovnatelná s WT. Tolerance k solnému stresu tak zřejmě souvisí s N-myristoylací proteinu ARA6, podobně jako u produktu genu tolerance k soli *SOS3* (Ishitani *et al.* 2000). Yin *et al.* též

zjistili, že akumulace transkriptu *ARA6* stoupá v průběhu stárnutí rostlin a protein *ARA6* negativně reguluje expresi markerových genů senescence *SAG12* a *SENI* (Yin *et al.* 2017). Při výzkumu temnotou indukované senescence byl po čtyřech dnech zaznamenán vyšší obsah chlorofylu u linie *ARA6* OX než u WT (Yin *et al.* 2017). Protein *ARA6* je tak negativním regulátorem temnotou indukované senescence, jeho zvýšená exprese zřejmě vede k větší ochraně chlorofylu před degradací.

McRAB5b – Transkripce genu kódujícího protein McRAB5b (blízký homolog *ARA6*) z halofytní rostliny kosmatce krystalového (*Mesembryanthemum crystallinum*) byla zvýšena po aplikaci 400mM NaCl (Bolte *et al.* 2000). Ke stimulaci exprese stačily pouhé dvě hodiny, úroveň transkripce se však zvyšovala po celých 72 hodin trvání experimentu. Protein McRAB5b je zřejmě zahrnut do solným stresem indukovaného zvýšení váčkového transportu do vakuoly či apoplastu. Zajímavé bylo též zjištění, že protein McRAB5b částečně dimerizuje a v podobě dimeru ztrácí schopnost vázat GTP. Přejchod mezi monomery a dimerem tedy může hrát regulační roli (Bolte *et al.* 2000).

MiRAB5 – Liu *et al.* zkoumali protein MiRAB5 z mangovníku indického (*Mangifera indica*) (Liu *et al.* 2014). Nízká teplota (4 °C) vedla ve stonku po 72 hodinách ke čtyřnásobnému zvýšení transkripce genu *MiRAB5*. Působení 300mM NaCl vyvolalo v listech napřed snížení exprese tohoto genu, po 48 hodinách však byla jeho exprese 22x větší než v kontrolním stavu. Zvýšený obsah odpovídajícího mRNA transkriptu byl po 48 hodinách působení 300mM NaCl pozorován též ve stonku. Aplikace 30% PEG vedla k více než šestnásobnému zvýšení transkripce v listech po 24 hodinách. Ve stonku bylo zaznamenáno největší množství transkriptu *MiRAB5* po 48 hodinách. Protein MiRAB5 je tedy zřejmě zapojen do odpovědi na chlad a solný i osmotický stres (Liu *et al.* 2014).

ScRAB – Protein ScRAB v rostlině jojoba kalifornská (*Simmondsia chinensis*) byl zkoumán ve studii Mizrahi-Aviv *et al.* (2002). Tento protein vykázal největší homologii ke skupině RAB5. V kultivovaném stonku kontrolních rostlin byl zaznamenán 2,5x větší obsah transkriptu *ScRAB* než ve stonku rostlin vystavených 150mM NaCl. Výsledek je tak opačný než u proteinu McRAB5b (Bolte *et al.* 2000). Tyto rozdíly mohou odrážet specifický metabolismus různých rostlinných druhů či odlišnou regulaci metabolických drah v kultivovaných rostlinných orgánech (Mizrahi-Aviv *et al.* 2002).

4.2.3. RAB6/RABH

OsRAB6a – Yang & Zhang ukázali roli rýžového (*O. sativa*) proteinu OsRAB6a v udržování homeostáze železa (Yang & Zhang 2016). Při nedostatku železa byla zaznamenána zvýšená

transkripce genu *OsRAB6a* ve stonku i v kořenech. U rostlin *OsRAB6a* OX byl pozorován při vystavení nedostatku železa větší růst, vyšší obsah železa i chlorofylu než u WT. U rostlin s redukovanou expresí *OsRAB6a* bylo v těchto parametrech naopak dosaženo vždy menších hodnot než u rostlin WT. Rostliny *OsRAB6a* OX akumulovaly více železa a zinku v semenech a vykazovaly výrazněji zvýšené exprese genů souvisejících s nedostatkem železa (*OsNAS1*, *OsNAS2*, *OsIRT1* a *OsIRO2*). Yang & Zhang též u těchto rostlin pozorovali delší hlavní kořen i tři nejdelší adventivní kořeny. Dá se předpokládat, že větší kořenový systém je schopen lépe zajistit příjem železa při jeho nedostatku. Protein OsRAB6a tedy pozitivně reguluje fyziologické i morfologické procesy asociované s příjmem železa (Yang & Zhang 2016).

4.2.4. RAB7/RABG

AtRAB7 – Mazel *et al.* zaznamenali zvýšení transkripce genu kódujícího protein AtRAB7 (AtRABG3e) v *A. thaliana* při působení vyšších koncentrací H₂O₂ či při solném stresu, naopak zranění či chlad jeho expresi nezvýšily (Mazel *et al.* 2004). U rostlin *AtRAB7* OX byla zaznamenána rychlejší endocytóza a tyto rostliny byly tolerantnější k působení 200mM NaCl než WT. Při dlouhodobějším působení 100mM NaCl některé transgenní rostliny dokonce kvetly, u rostlin WT kvetení zaznamenáno nebylo. Transgenní rostliny přijímaly více iontů Na⁺, které byly sekvestrovány do vakuoly, a obsahovaly menší množství ROS. Nižší sensitivita těchto rostlin byla pozorována i k 500mM sorbitolu. Po odstranění vlivu sorbitolu se rostliny WT na rozdíl od transgenních rostlin nebyly schopné zotavit. Zvýšenou odolnost rostlin *AtRAB7* OX lze vysvětlit rychlejší endocytózou, lokalizací Na⁺ do vakuoly či menší produkcí ROS zřejmě díky omezení aktivity NADPH oxidázy (Mazel *et al.* 2004).

OsRAB7 – Nahm *et al.* zaznamenali stimulaci transkripce rýžového (*O. sativa*) genu *OsRAB7* při působení různých abiotických stresorů (Nahm *et al.* 2003). Slabý nárůst jeho exprese byl pozorován při působení 150mM NaCl, zvyšování nastalo i po exogenní aplikaci 100μM ABA. Vystavení chladu (4 °C) vedlo po 24 hodinách ke zřetelně větší transkripci, než byla její bazální úroveň. Nedostatek vody vyvolal mohutný nárůst transkripce genu *OsRAB7* již po dvou hodinách. Protein OsRAB7 byl lokalizován do tonoplastu, předpokládá se tedy jeho role v transportu do vakuoly (Nahm *et al.* 2003).

Peng *et al.* následně předložili přímý důkaz, že zvýšená exprese genu *OsRAB7* vede k vyšší toleranci k solnému stresu (Peng *et al.* 2014). Podobné důkazy o zvýšení tolerance k působení soli byly zaznamenány též při nadměrné expresi genu *AtRAB7* v *A. thaliana* (Mazel *et al.* 2004) i genu *PgRAB7* v *Nicotiana tabacum* (Agarwal *et al.* 2008). Peng *et al.* zkoumali reakci WT a rostlin *OsRAB7* OX při vystavení 200mM NaCl (Peng *et al.* 2014). Transgenní rostliny

vykázaly při této koncentraci soli četnější postranní kořeny a jejich větší délku. Po dvanáctidenním vystavení soli měly tyto rostliny většinou zelené listy, naopak téměř všechny netransgenní rostliny uhynuly. Po odstranění vlivu soli se rostliny *OsRAB7* OX dokázaly zotavit, WT však nikoliv. U transgenních rostlin byl při působení soli také zaznamenán výrazně větší nárůst obsahu prolinu než u WT (Peng *et al.* 2014). Tento fakt a zaznamenaná akcelerace váčkového transportu u rostlin se zvýšenou expresí *OsRAB7* tak mohou být vysvětlením jejich vyšší tolerance k solnému stresu. Exprese genu *OsRAB7* v bakteriích *Escherichia coli* vedla také ke zvýšení jejich tolerance k chladu (20 °C), vyšší teplotě (52 °C) i působení NaCl (koncentrace 1000 mM). Tato zvýšená tolerance byla zřejmě založena na obdobném mechanismu jako u rostlin (Peng *et al.* 2011).

PgRAB7 – Zvýšená transkripce genu *PgRAB7* v dochanu klasnatém (*Pennisetum glaucum*) byla zaznamenána při suchu, nízkých teplotách (4 °C) i po aplikaci 250mM NaCl (Agarwal *et al.* 2008). Listové disky T₀ generace transgenního tabáku (*N. tabacum*) exprimujícího protein PgRAB7 vykazovaly po vystavení různým koncentracím NaCl (100, 200 a 300 mM) výrazně vyšší obsah chlorofylu než WT. Též u T₁ generace transgenních rostlin byl růst ve srovnání s WT při aplikaci 100mM, 200mM i 300mM NaCl postižen méně. Transgenní rostliny po třiceti dnech dosáhly vyšších hodnot v počtu i délce kořenů, v listové ploše i čerstvé hmotnosti než WT. Vyšších hodnot ve všech těchto parametrech dosáhly transgenní rostliny též po aplikaci 400mM manitolu. Nárůst tolerance transgenních rostlin může být vysvětlen zaznamenaným zvýšením transportu proteinů do vakuoly či ochrannými/opravnými mechanismy v endomembránovém systému (Agarwal *et al.* 2008).

Tripathy *et al.* zaznamenali u rýže (*O. sativa*) exprimující gen *PgRAB7* při působení NaCl (koncentrace 100, 200 a 400 mM) vyšší klíčivost a větší obsah chlorofylu v listových discích než u WT (Tripathy *et al.* 2017). Transgenní rostliny akumulovaly méně Na⁺ v kořenech i listech a dokázaly udržet integritu vakuoly a intaktní grana v chloroplastech i při působení 200mM NaCl. Při aplikaci této koncentrace NaCl netransgenní rostliny neplodily vůbec, transgenní rostliny o 33-53 % méně než při kontrolních podmínkách. U těchto rostlin byla též zaznamenána o 344 % vyšší úroveň čisté fotosyntézy než u WT. Po vystavení suchu na dvanáct dní vykázaly vyšší hodnoty v obou těchto parametrech opět transgenní rostliny. Exprese *PgRAB7* v rýži změnila úroveň transkripce celé řady jejích přirozených genů, zvýšila například množství mRNA transkriptu *OsRAB7* či genů zahrnutých do detoxifikace ROS. Zvýšená tolerance transgenní rýže může být vysvětlena sekvestrací Na⁺ do intaktních vakuol či menší akumulací ROS díky působení antioxidantů. Roli může hrát také vyšší fotosyntetická aktivita díky chloroplastům s nepoškozenými grany (Tripathy *et al.* 2017).

PjRAB7 – George & Parida zkoumali gen kódující protein PjRAB7 z naditce jehnědokvětého (*Prosopis juliflora*) z čeledi Fabaceae, stromu velmi odolného k abiotickému stresu (George & Parida 2011). Gen *PjRAB7* je zřejmě zapojen do odpovědi na abiotický stres, neboť jeho transkripce v semenáčcích naditce byla silně indukována aplikací 500mM NaCl. Ukázaly se velké rozdíly v toleranci k solnému stresu (150mM NaCl) mezi transgenním tabákem (*N. tabacum*) exprimujícím gen *PjRAB7* a WT. Transgenní tabák byl působením soli poškozen výrazně méně a akumuloval signifikantně větší množství Na⁺ než WT. Zvýšení tolerance u transgenního tabáku je možné vysvětlit sekvestrací Na⁺ do vakuoly, která snižuje jeho negativní vliv v cytosolu a zároveň usnadňuje příjem vody (George & Parida 2011).

AhRAB7 – Sui *et al.* studovali protein AhRAB7 (AhRABG3b) v podzemnici olejné (*Arachis hypogaea*) (Sui *et al.* 2012). Autoři odhalili mírné zvýšení exprese genu kódujícího tento protein po aplikaci 20% PEG a 100μM ABA. Výraznější nárůst jeho exprese byl zaznamenán po 48 hodinách působení chladu (4 °C), nejvyšší vzestup transkripce (až 35x) byl pozorován po aplikaci 250mM NaCl. Po sedmi dnech působení 200mM NaCl a též 20% PEG měly rostliny *AhRAB7* OX normální vzhled, WT rostliny však vykazovaly zřejmé známky vadnutí. Exprese genu *AhRAB7* v *E. coli* též vedla ke zvýšení tolerance k různým koncentracím NaCl, NaHCO₃ i PEG. Tyto poznatky ukazují, že protein AhRAB7 je zřejmě zapojen do odpovědi na abiotický stres.

Sui *et al.* v následné studii zkoumali pomocí analýzy RNA-seq (též RNA sequencing) změny exprese genů mezi rostlinami *A. hypogaea* *AhRAB7* OX a rostlinami WT při působení solného stresu (Sui *et al.* 2017). Ze 164 genů, jejichž exprese se signifikantně změnila při působení 250mM NaCl v transgenních rostlinách oproti rostlinám WT, bylo 110 genů známých jako responsivní na solný stres. Jednalo se například o geny kódující tzv. late embryogenesis abundant (LEA) proteiny, aquaporin TIP, peroxidázu či proteinfosfatázu 2C. Protein AhRAB7 zřejmě zvyšuje toleranci k solnému stresu díky své roli v signálních drahách zahrnujících fosfatidylinositol, Ca²⁺ a ABA. Tyto faktory se podílí na regulaci exprese transkripčních faktorů a efektorových proteinů důležitých pro odstranění ROS či fluidizaci membrán (Sui *et al.* 2017).

TaRAB7 – Liu *et al.* zkoumali úroveň transkripce genu *TaRAB7* z pšenice seté (*Triticum aestivum*) při působení houbového patogena *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* a abiotických stresorů (Liu *et al.* 2012). Při působení 20% PEG6000 vzrostla transkripce genu *TaRAB7* již po dvou hodinách, třináctinásobného zvýšení bylo dosaženo po dvanácti hodinách. Působení 200mM NaCl vedlo též po dvanácti hodinách k téměř dvanáctinásobnému zvýšení množství mRNA transkriptu tohoto genu. Podobných výsledků s nižším maximem po tomtéž časovém úseku bylo dosaženo při působení chladu (4° C). GTPáza TaRAB7 může hrát roli v regulaci

exprese genů důležitých pro přizpůsobení se podmínkám prostředí, tj. může být součástí bazální rezistence ke stresorům (Liu *et al.* 2012).

AIRAB7 – Protein spadající do skupiny RAB7 byl izolován též z halofytní trávy *Aeluropus lagopoides* (Rajan *et al.* 2015). Mírně zvýšená exprese genu *AIRAB7* byla zaznamenána při působení sucha a 20 μ M ABA, tedy tento gen zřejmě hraje určitou roli v odpovědi na abiotické stresory. Aplikace 250mM NaCl však nevedla k signifikantnímu zvýšení akumulace transkriptu *AIRAB7*. Studovaná koncentrace soli totiž zřejmě nepředstavuje pro tuto halofytní rostlinu stresovou situaci. Autoři též ukázali, že buňky *E. coli* exprimující gen pro protein AIRAB7 vykazovaly ve srovnání s kontrolními buňkami lepší růst a větší množství kolonií na médiích obsahujících 500mM NaCl, 400mM manitol či 20 μ M ABA (Rajan *et al.* 2015).

4.2.5. RAB11/RABA

Skupina RABA1 – Asaoka *et al.* zkoumali v *A. thaliana* proteiny RABA1 (největší podskupina RAB11/RABA proteinů), zejména protein RABA1b (Asaoka *et al.* 2013a). Proteiny RABA1 vykazovaly podobnou lokalizaci jako R-SNARE proteiny VAMP721/722 operující v sekretorické dráze (Sun *et al.* 2013). Konstitutivně aktivní forma proteinu RABA1b byla pozorována na PM. Z těchto poznatků se tedy dá usuzovat, že protein RABA1b funguje v transportu mezi TGN a PM. Růst čtyřnásobných mutantů v genech kódujících proteiny RABA1a až RABA1d byl překvapivě velmi narušen již při aplikaci NaCl o koncentraci 15 mM. Většina těchto rostlin zahynula ve stádiu děloh a jejich čerstvá hmotnost byla 5x nižší než u rostlin WT. Ještě výrazněji byl narušen růst rostlin exprimujících dominantně negativní protein RABA1b^{S27N}. Ostatní členové skupiny RABA1 tedy zřejmě dokážou částečně nahradit ztrátu proteinů RABA1a až RABA1d, ale nejsou schopni potlačit efekt dominantně negativního proteinu RABA1b^{S27N}.

Asaoka *et al.* však zjistili, že studovaní čtyřnásobní mutanti obsahují obdobné množství Na⁺ jako WT (Asaoka *et al.* 2013b). Akumulace Na⁺ ve vakuolách byla u obou linií rostlin též velmi podobná. Tito studovaní mutanti tedy nejsou defektní v příjmu a vnitrobuněčné distribuci Na⁺. Proteiny skupiny RABA1 jsou tak zřejmě obsaženy ve více nepřímé odpovědi na solný stres. Uvažovat lze regulaci iontové homeostáze, transport Cl⁻ či jiných iontů, změny lipidového složení membrán nebo podíl na lokalizaci auxinového přenašeče PIN (Asaoka *et al.* 2013b). Růst čtyřnásobných mutantů ani rostlin exprimujících dominantně negativní protein RABA1b^{S27N} nebyl narušen aplikací 30mM sorbitolu (Asaoka *et al.* 2013a). Hypersensitivita tedy zřejmě není způsobena zvýšenou osmolaritou, nýbrž vysokou koncentrací iontů.

OsRAB11 – Kim *et al.* zjistili, že transkripce genu *OsRAB11* v rýži (*O. sativa*) je zvýšena působením soli, sucha i chladu (Kim *et al.* 2017). Transgenní rostliny *A. thaliana* exprimující dominantně negativní protein OsRAB11(S28N) měly při působení 100mM NaCl kořeny dosahující pouze 50 % délky kořenů rostlin WT. Rostliny nadměrně exprimující protein OsRAB11 s neporušenou funkcí naopak měly zhruba 1,4x delší kořeny než WT. Autoři dále ukázali, že dominantně negativní protein OsRAB11(S28N) nenaruší při působení soli expresi genů pro Na⁺/H⁺ antiportery SOS1, AtNHX1 a AtNHX2. Narušena však byla jejich správná lokalizace do PM, respektive tonoplastu. Je možné, že exprese dominantně negativního proteinu OsRAB11(S28N) vede k poškození dráhy proteinů skupiny RABA1, která je důležitá mj. pro lokalizaci Na⁺/H⁺ antiporterů do PM (Asaoka *et al.* 2013a). V transportu do vakuoly zřejmě funguje podobný mechanismus, konkrétně však charakterizován nebyl (Kim *et al.* 2017).

Son *et al.* zkoumali roli proteinu OsRAB11 v transportu a1 podjednotky V-ATPázy (OsVHA-a1) do vakuoly (Son *et al.* 2013). Tato podjednotka přímo interagovala s GTP-vázající formou proteinu OsRAB11 a jeho GAP, OsGAP1. Při působení solného stresu (100mM NaCl) jsou oba tyto proteiny důležité pro změnu lokalizace OsVHA-a1 z TGN do PVC a následně do vakuoly. Rostliny s poškozeným proteinem OsGAP1 či dominantně negativním proteinem OsRAB11(S28N) vykazovaly při aplikaci 100mM NaCl kratší kořeny a menší čerstvou hmotnost. Klíčivost semen rostlin exprimujících dominantně negativní protein OsRAB11(S28N) byla signifikantně snížena působením již 75mM NaCl. Pro toleranci k solnému stresu je tedy zřejmě důležitý vakuolární transport OsVHA-a1, v němž hrají důležitou roli proteiny OsRAB11 a OsGAP1. Správná lokalizace OsVHA-a1 pak umožňuje sekvestraci nadbytečných iontů Na⁺ do vakuoly (Son *et al.* 2013).

CPRABA5e – Karim *et al.* zkoumali v *A. thaliana* protein CPRABA5e lokalizovaný do stromatu a thylakoidů chloroplastů (Karim *et al.* 2014). Mutantní rostliny v genu pro tento protein vykazovaly opožděné klíčení oproti WT. Obsah chlorofylu i čerstvá hmotnost však byly s rostlinami WT srovnatelné. Mutanti překvapivě nebyli citlivější k působení chladu, sucha ani soli. Aplikací 10μM bengálské červeně (produkuje singletní kyslík) však byla prokázána větší citlivost mutantů k oxidativnímu stresu. Také se ukázalo, že teplota 4 °C vyvolala u mutantních rostlin změny v ultrastruktuře chloroplastu. U rostlin WT tyto změny na strukturální úrovni zaznamenány nebyly (Karim *et al.* 2014). Je možné, že změněná struktura chloroplastů může vést k odlišné úrovni fotosyntézy u mutantů. Při jiném experimentálním designu by tedy mohly být zřetelné rozdíly mezi WT a mutantními rostlinami v toleranci k chladu.

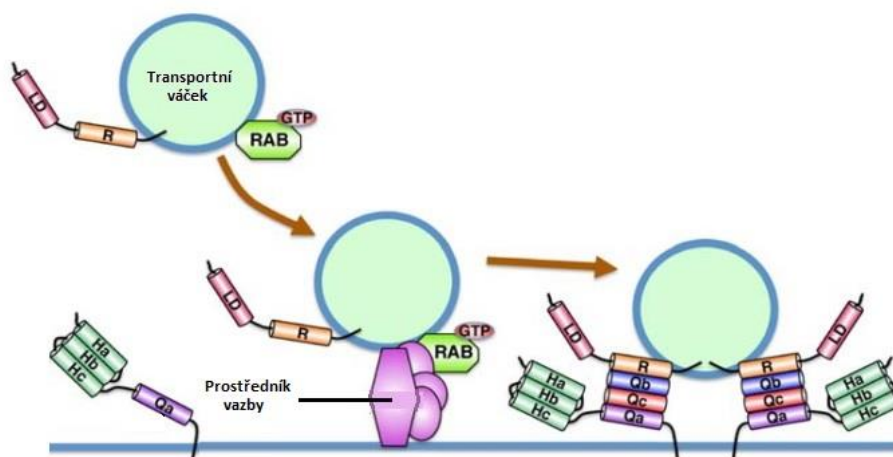
5. SNARE proteiny

5.1. Úvod

Mezi proteiny zapojenými do váčkového transportu zaujímají významné místo proteiny SNARE (z angl. soluble NSF (N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein) attachment protein receptor). Tyto s membránami asociované proteiny jsou konzervovány od kvasinek až k vyšším rostlinám a savcům. Vedle zajištění fúze membrán pomáhají SNARE proteiny také cílit váčky do místa jejich určení (Uemura & Ueda 2014). Mezi jednotlivými SNARE proteiny je mnoho rozdílů jak ve velikosti, tak ve struktuře. Všichni členové však sdílí společný strukturní motiv, tzv. SNARE doménu, která přispívá k interakci mezi těmito proteiny. SNARE doména se nachází v jejich cytoplasmatické části, skládá se z 60 až 70 aminokyselin a má strukturu tzv. α -helixu (Weimbs *et al.* 1997, Wesolowski & Paumet 2010). Vzhledem k těmto společným vlastnostem se soudí, že interakce mezi různými členy rodiny SNARE probíhá podle společného mechanismu.

Existuje několik možných způsobů dělení SNARE proteinů, nejčastěji se používají klasifikace funkční a strukturní. Dle prvně jmenované klasifikace lze rozlišit t-SNARE proteiny asociované s cílovou membránou a v-SNARE proteiny asociované s membránou váčku (Söllner *et al.* 1993). Častěji se však používá klasifikace strukturní, neboť při homotypické membránové fúzi je obtížné určit, který kompartment představuje transportní váček a který cílovou membránu. Strukturní klasifikace dělí rodinu SNARE do skupin Q-SNARE a R-SNARE na základě přítomnosti glutaminového (Q), respektive argininového (R) polárního zbytku v centru SNARE domény (Fasshauer *et al.* 1998). Mezi těmito klasifikacemi platí obecně vztah, že Q-SNARE představují t-SNARE proteiny a R-SNARE pak v-SNARE proteiny (Fasshauer *et al.* 1998). Q-SNARE proteiny lze na základě sekvenční homologie dále rozdělit na tři základní skupiny – Qa-, Qb- a Qc-SNARE proteiny. Specifickou skupinu Q-SNARE proteinů pak představují tzv. SNAP25-like proteiny, které obsahují v jednom polypeptidovém řetězci zároveň Qb-SNARE i Qc-SNARE motiv (Ebina & Ueda 2009, Fasshauer *et al.* 1998). R-SNARE proteiny mohou být dále rozděleny na základě absence/přítomnosti tzv. longin domény v oblasti N-konce na krátké VAMPs (z angl. vesicle-associated membrane proteins), označované též „brevins“, a dlouhé VAMPs neboli „longins“. Pro rostlinné R-SNARE je typická absence krátkých VAMPs, namísto toho rostliny využívají specifickou sestavu dlouhých VAMPs (Ebina & Ueda 2009). Přesné počty genů kódujících SNARE proteiny v rostlinách nejsou známy. Zřejmé však je, že v *A. thaliana* je kódováno více než 60 SNARE proteinů (Sanderfoot 2007).

SNARE proteiny zřejmě obecně představují molekulární konstrukce, které se samovolně uspořádávají do tzv. coiled-coil struktury. Tento mechanismus přibližuje membrány do takové blízkosti, jež umožní jejich fúzi. Funkční SNARE komplex je tvořen čtyřmi SNARE proteiny, vždy po jednom z každé skupiny R-SNARE, Qa-, Qb- a Qc-SNARE; při účasti SNAP25-like proteinu se však komplex skládá pouze ze tří molekul SNARE, shrnuto v Ebine & Ueda (2009). Každá organela v endomembránovém transportu obsahuje konkrétní sestavu SNARE proteinů. Schopnost tvořit interakce mezi specifickými Q-SNARE a R-SNARE proteiny nejspíše ve spolupráci s dalšími mechanismy (regulovanými např. RAB GTPázami) udílí specifitu fúzi membrán (Ebine & Ueda 2009, Hachez *et al.* 2014). Schéma tohoto mechanismu je stručně znázorněno na obrázku 3. Po dokončení fúze membrán je SNARE komplex opět rozpojen. Děje se tak za účasti řady faktorů, například ATPázy NSF ve spojení s jejími kofaktory zvanými SNAPs (z angl. soluble NSF attachment proteins). Po tomto rozpojení jsou SNARE proteiny recyklovány zpět do původního kompartmentu (Zhao *et al.* 2015).



Obrázek 3: Model obecného mechanismu váčkové vazby a fúze. Znázorněno je zapojení RAB GTPáz s jejich efektry a SNARE proteinů. H-autoinhibiční doména Qa-SNARE, složená ze tří helixů (Ha, Hb, Hc), LD – Longin doména. Upraveno podle Ebine & Ueda (2009).

Základní funkce SNARE proteinů je známa již dlouhou dobu. Řada studií však ukazuje, že paleta jejich funkcí je mnohem pestřejší. Jmenovat lze podíl na otevírání a zavírání průduchů (Leshem *et al.* 2010) či kontrolu funkce iontových kanálů (Nisa *et al.* 2017, Sun *et al.* 2013). SNARE komplex, který se skládá z VAM3/SYP22 (Qa-), ZIG/VTI11 (Qb-), SYP51 (Qc-) a VAMP727 (R-SNARE), je zapojen do biogeneze vakuoly, vakuolárního transportu, zrání semen či stonkového gravitropismu (Ebine *et al.* 2008, Yano *et al.* 2003). Kromě role v odpovědi na abiotický stres, pojednané v kapitole 5.2., ukazuje řada publikací na jejich silné zapojení do resistance k patogenům (Bao *et al.* 2012, Liu *et al.* 2016, Sharma *et al.* 2016).

5.2. Zapojení SNARE proteinů do odpovědi na abiotický stres

Řazení proteinů v této kapitole vychází ze strukturního dělení SNARE proteinů, pořadí je následující: Qa-, Qb-, Qc-SNARE proteiny, následně SNAP25-like proteiny a nakonec R-SNARE proteiny. Pokud byly v dané skupině zkoumány proteiny z *A. thaliana*, jsou opět řazeny předně, následují je proteiny dalších rostlinných druhů.

5.2.1. Qa-SNARE proteiny

Skupina SYP4 – Skupina SYP4 v *A. thaliana* zahrnuje proteiny SYP41, SYP42 a SYP43 (Uemura *et al.* 2004). Uemura *et al.* zjistili, že z dvojitých mutantů v genech kódujících proteiny skupiny SYP4 byli nejvíce postiženi mutanti *syp42syp43*. Tito mutanti vykazovali rychlejší senescenci, menší vzrůst a měli kratší kořeny (Uemura *et al.* 2012a). Ukázalo se, že nadměrná exprese fúzního proteinu GFP-SYP41 (protein SYP41 fúzovaný s GFP) může zvrátit poškození způsobené mutací *syp42syp43*, proteiny skupiny SYP4 tedy zřejmě mají částečně se překrývající funkce. Tyto proteiny byly lokalizovány na TGN a hrají roli v regulaci váčkového transportu navazujícího na GA (zejména sekreční dráhy a dráhy směřující do vakuoly). Jsou také velmi důležité pro udržování správné morfologie GA a TGN (Uemura *et al.* 2012a).

Uemura *et al.* v další studii zkoumali odpověď dvojitých mutantů *syp42syp43* na abiotický stres (Uemura *et al.* 2012b). NaCl o koncentraci 75 mM růst těchto mutantů velmi omezila, aplikace 100mM NaCl pak vedla k zastavení jejich růstu po vývoji děloh. Růst WT byl narušen také, avšak signifikantně méně. Proteiny SYP4 se mohou podílet na lokalizaci NHX5 a NHX6 (vnitrobuněčné Na⁺/H⁺ antiportery 5 a 6). Jejich správná lokalizace je zřejmě důležitá pro toleranci k solnému stresu (Uemura *et al.* 2012b). Též při osmotickém stresu (sorbitol v koncentracích 150 mM a 200 mM) se ukázal narušený růst mutantů *syp42syp43*. Proteiny SYP4 tvoří komplex s VTI12 (Qb-), SYP61 (Qc-) a YKT6 (R-SNARE) (Chen *et al.* 2005, Sanderfoot *et al.* 2001). Konkrétní funkce tohoto SNARE komplexu není známa, spekuluje se o jeho podílu na fúzi váčků odvozených z *trans* cisteren GA s TGN či fúzi TGN s váčky odvozenými z MVB/PVC. Již dříve se ukázalo, že protein SYP61 zapojený do tohoto SNARE komplexu hraje roli v odpovědi na abiotický stres (Zhu *et al.* 2002).

SYP22/VAM3 – Protein SYP22, označovaný též VAM3, je lokalizován na tonoplastu a membráně PVC (Uemura *et al.* 2004). Hamaji *et al.* v *A. thaliana* ukázali, že při působení 200mM NaCl se v buňkách objevuje mnoho malých membránových váčků, které se pohybují okolo centrální vakuoly (Hamaji *et al.* 2009). Tyto struktury zřejmě obsahují sodné ionty a mohou hrát roli v odpovědi na solný stres. Mutantní rostliny v genu pro SYP22 vykazovaly

větší toleranci k solnému stresu (200mM NaCl). Důležité je zjištění, že zatímco obsah Na⁺ ve stonku je menší u mutantních rostlin než u WT, v kořenech byla zaznamenána situace opačná. Důsledkem je zvýšená tolerance stonku mutantních rostlin k solnému stresu. Odlišná akumulace Na⁺ v podzemní a nadzemní části rostlin je způsobena rozdíly v distribuci proteinu AtNHX1 (Na⁺/H⁺ antiporter 1). V kořenech bylo pozorováno větší množství tohoto proteinu u mutantních rostlin než u WT, ve stonku byla situace dle očekávání opačná. Dá se předpokládat podobný mechanismus vysvětlující zvýšenou odolnost mutantů v genu pro SYP22 jako u proteinů skupiny AtVAMP7C (Leshem *et al.* 2006). Mutace SYP22 tedy může inhibovat fúzi váčků obsahujících H₂O₂ s vakuolou, a tím ji chránit (Hamaji *et al.* 2009).

NtSYP121/NtSYR1 – Leyman *et al.* ukázali, že tabákový (*N. tabacum*) protein NtSYP121, označovaný též NtSYR1, hraje roli v senzitivě svěřacích buněk průduchů k ABA (Leyman *et al.* 1999). Další studie pak potvrdila lokalizaci NtSYP121 na PM bez zřetelných rozdílů mezi buněčnými typy (Leyman *et al.* 2000). Působení 20μM ABA vedlo k více než desetinásobnému zvýšení množství proteinu NtSYP121 v PM. Aplikace 10μM auxinu, 10μM kinetinu ani 1μM kyseliny gibberelové však zvýšení jeho množství v PM nevyvolaly. Aplikace 300mM NaCl způsobila transientní zvýšení úrovně exprese proteinu NtSYP121 se stejnou kinetikou jako poškození listu nůžkami. Ukázalo se, že exogenní aplikace 50μM kyseliny jasmonové i 1mM kyseliny salicylové vede též ke zvýšení exprese tohoto proteinu, působení nízké teploty (4 °C) však nikoliv. Solný stres a mechanické poškození listu zprostředkují stimulaci exprese genu *NtSYP121* odlišnými drahami. U mutantů s narušenou syntézou či signální kaskádou ABA byl po tomto poškození zaznamenán stejný vzestup transkripce genu *NtSYP121* jako u rostlin WT. Při solném stresu (300mM NaCl) však u zmíněných mutantů signifikantní vzestup exprese tohoto genu zaznamenán nebyl (Leyman *et al.* 2000). První dráha tedy zřejmě není závislá na ABA, druhá však závislá je.

Protein SYP121 byl zkoumán také v jiných rostlinných druzích. Ukázalo se, že hraje roli v transportu a aktivitě akvaporinu PIP2;5 i v aktivitě kanálů pro draselné ionty v kukuřici (*Zea mays*) (Besserer *et al.* 2012). Dá se tedy předpokládat jeho funkce v osmotickém přizpůsobení buňky během působení stresorů. Hachez *et al.* odhalili, že proteiny SYP61 a SYP121 jsou v *A. thaliana* důležité pro transport akvaporinu PIP2;7 (Hachez *et al.* 2014). SYP61 a SYP121 jsou zřejmě obsaženy v tomtéž SNARE komplexu, narušení každé jeho komponenty vedlo k poruše doručení PIP2;7 do PM. Tyto proteiny se tedy dají považovat za regulátory vodní homeostáze skrze modulaci prostupnosti PM pro vodu (Hachez *et al.* 2014).

5.2.2. Qb-SNARE proteiny

Skupina OsNPSN – Skupina proteinů OsNPSN (z angl. novel plant SNARE) v rýži (*O. sativa*) obsahuje tři členy (OsNPSN11, OsNPSN12, OsNPSN13) a byla zkoumána ve studii Bao *et al.* (2008a). Tyto proteiny jsou značně homologické s proteiny AtNPSN v *A. thaliana*, aminokyselinová identita je 57-80 %. Proteiny OsNPSN jsou lokalizovány do PM (Bao *et al.* 2008a), stejně jako proteiny AtNPSN (Uemura *et al.* 2004). Lokalizace ve váčkových strukturách poblíž PM a interakce s dalšími faktory právě v PM byla prokázána též u proteinu TaNSPN11 v *Triticum aestivum* (Wang *et al.* 2014). Působení 20mM H₂O₂ vedlo ke zvýšení exprese všech tří genů kódujících proteiny skupiny OsNPSN. Aplikace 200mM NaCl způsobila naopak snížení jejich exprese. Osmotický stres (20% PEG6000) nezměnil transkripci genu *OsNPSN13*, transkripce *OsNPSN11* se začala snižovat po 12 hodinách. Transkript *OsNPSN12* nebyl po 48 hodinách působení osmotického stresu téměř detekovatelný. Transformované kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* exprimující geny pro proteiny skupiny OsNPSN vykázaly větší toleranci k oxidativnímu stresu (1mM H₂O₂), menší naopak k solnému (700mM NaCl) a osmotickému stresu (500mM manitol) než kvasinky netransformované. Velmi podobné výsledky byly získány též u tabáku exprimujícího gen *OsNPSN11*. Zvýšení odolnosti k oxidativnímu stresu při expresi genů pro proteiny skupiny OsNPSN může být vysvětleno předcházením apoptóze indukované H₂O₂. Usnadnění fúze váčků obsahujících ROS s tonoplastem a následné poškození jeho funkcí může být naopak vysvětlením snížené odolnosti k soli a manitolu (Bao *et al.* 2008a). Jedná se tedy zřejmě o podobný mechanismus jako u proteinů skupiny AtVAMP7C (Leshem *et al.* 2006).

5.2.3. Qc-SNARE proteiny

AtSFT12 – Tarte *et al.* zkoumali v *A. thaliana* na GA lokalizovaný protein AtSFT12 (Tarte *et al.* 2015). Úroveň transkripce genu pro AtSFT12 rostla během působení soli (300mM NaCl), chladu (4 °C), 100μM ABA i 300mM manitolu. Výjimkou je pouze působení herbicidu methylviologenu (MV) o koncentraci 10 μM, který transkripci nezvýšil. U rostlin *AtSFT12* OX ani u rostlin mutantních v tomto genu nebyly ve srovnání s rostlinami WT pozorovány změny v odolnosti k MV. Dá se tedy předpokládat, že gen kódující protein AtSFT12 není zahrnut do odpovědi na oxidativní stres. Toto zjištění je ve shodě se studií Bao *et al.* (2012), v níž autoři ukázali, že exprese genu *OsSFT12* v *O. sativa* (ortholog *AtSFT12*) se za působení oxidativního stresu (20mM H₂O₂) nezvýší. Rostliny *AtSFT12* OX vykazovaly větší toleranci k různým koncentracím NaCl, LiCl i manitolu. Byla u nich zaznamenána též menší míra ztráty vody ve srovnání s WT. Mutace v tomto genu vedla naopak ke snížení tolerance k solím i manitolu,

míra ztráty vody byla větší. Při aplikaci 150mM NaCl obsahovaly rostliny *AtSFT12* OX ve svých buňkách více Na⁺ než WT či mutantní rostliny. Zvýšená akumulace Na⁺ byla objevena právě ve vakuole, protein *AtSFT12* tedy zřejmě hraje roli v regulaci transportu Na⁺ do vakuoly. Vakuola akumulující větší množství sodných kationtů nabývá na objemu, celkový objem buňky se však nemění (Hamaji *et al.* 2009).

SYP61/OSM1 – Zhu *et al.* zkoumali v *A. thaliana* roli proteinu SYP61, označovaného též OSM1, v abiotickém stresu (Zhu *et al.* 2002). Mutantní rostliny *syp61* vykazovaly zvýšenou citlivost již k 10mM NaCl, KCl i LiCl, nikoliv však k 10mM CsCl. Tento protein tedy zřejmě ovlivňuje citlivost spíše ke kationtům než k chloridovým aniontům. U mutantů byla pozorována snížená tolerance k osmotickému stresu způsobenému manitolem o různých koncentracích i k nedostatku vody – mutantní rostliny rychleji usychaly a též menší počet rostlin se dokázal zotavit po obnovení zalévání. Byla též zkoumána úroveň exprese stresového genu *RD29A*, podobně jako v pracích Nisa *et al.* (2017) a Sun *et al.* (2013). V tomto případě však nebyla při působení solného stresu (300mM NaCl) detekována změna jeho exprese, tedy SYP61 zřejmě není zahrnut v dráze kontrolující expresi genu *RD29A*. Mutantní rostliny *syp61* nebyly schopny správně odpovídat na přítomnost ABA indukované vodním deficitem a docházelo u nich k nekompletnímu zavírání průduchů. Narušena byla též inhibice otevírání průduchů běžná při působení ABA. Protein SYP61 je lokalizován na TGN i PVC a může interagovat s vápníkovými kanály svěracích buněk průduchů, tedy regulovat pohyby iontů a vody. Protein SYP61 představuje klíčovou signální komponentu, jež propojuje na ABA závislé i nezávislé dráhy vedoucí k důležitým stresovým odpovědím (Zhu *et al.* 2002).

Význam proteinu SYP61 se ukázal v *A. thaliana* také v dopravě komponent buněčné stěny. Potvrzena byla jeho role v transportu komplexů celulózasyntáz do PM, který je důležitý při vývoji i mechanickém poškození (Drakakaki *et al.* 2012). Protein SYP61 je v *A. thaliana* zřejmě obsažen ve stejném SNARE komplexu jako SYP121 a podílí se na doručení akvaporinu PIP2;7 do PM. SYP61 tedy může hrát roli v modulaci propustnosti PM pro vodu (Hachez *et al.* 2014).

OsSYP71 – Bao *et al.* ukázali význam proteinu OsSYP71 z rýže (*O. sativa*) v toleranci k oxidativnímu i biotickému stresu (Bao *et al.* 2012). Působení 20mM H₂O₂ na rostliny způsobilo nárůst exprese genu *OsSYP71*. Za běžných kultivačních podmínek byly rostliny nadměrně exprimující gen *OsSYP71* neodlišitelné od WT. Při působení H₂O₂ (koncentrace 30 a 50 mM) se již rozdílly vyskytly – růst semenáčků rostlin *OsSYP71* OX byl potlačen signifikantně méně. Tyto rostliny vykazovaly větší délku stonku a byl u nich naměřen značně vyšší obsah chlorofylu. Získané výsledky jsou opačné oproti výsledkům ve studii Leshem *et al.*

(2006). Tato neshoda může být vysvětlena odlišnou lokalizací studovaných proteinů. Je pravděpodobné (i ve srovnání s prací Liu *et al.* (2016)), že protein OsSYP71 je lokalizován na PM. V rostlinách *OsSYP71 OX* tedy zřejmě mohou váčky obsahující H₂O₂ lépe fúzovat s PM. Díky této fúzi se ROS dostanou účinněji mimo buňku. Výzkum biotického stresu odhalil, že protein OsSYP71 se zřejmě také podílí na regulaci exprese peroxidázy (Bao *et al.* 2012). Exprese peroxidázy se může zvyšovat i při působení abiotických stresorů, a přispívat tak ke zvýšené toleranci k nim.

5.2.4. SNAP25-like proteiny

AtSNAP33 – Wick *et al.* zkoumali v *A. thaliana* protein AtSNAP33, příbuzný k proteinu GsSNAP33 (Wick *et al.* 2003). Tento protein byl lokalizován do PM a do formující se buněčné desky. Exprese genu pro AtSNAP33 se zvýšila při napadení rostliny patogenem a též působením mechanických podnětů (Wick *et al.* 2003). Při jemném tření listů se transkripce tohoto genu zvýšila během prvních pěti minut, maxima bylo dosaženo mezi patnáctou a třicátou minutou. Při simulaci působení větru došlo ke zvýšení exprese genu *AtSNAP33* po patnácti až třiceti minutách. Jeho zvýšená exprese byla pozorována též při poranění rostliny kleštěmi. Předpokládá se, že zvýšená transkripce genu *AtSNAP33* po mechanickém podnětu odráží potřebu sekrece komponent buněčné stěny či oprav poškození PM způsobených ROS. V případě poranění zřejmě dochází ke zvýšené sekreci protektivních sloučenin do místa opravy (Wick *et al.* 2003).

GsSNAP33 – Nisa *et al.* ukázali, že transkripce genu *GsSNAP33* v sóji (*Glycine soja*) je zvýšena působením abiotických stresorů, např. 200mM NaCl či 30% PEG, a 100μM ABA (Nisa *et al.* 2017). Transgenní rostliny *A. thaliana* exprimující gen *GsSNAP33* měly devět dní po vyklíčení při působení 125mM i 150mM NaCl signifikantně více otevřených či zelených listů než WT. Podobná situace byla pozorována deset dní po vyklíčení za působení 250mM manitolu. Transgenní rostliny ve stádiu semenáčků vykázaly menší inhibici růstu kořenů při působení různých koncentrací NaCl (125 a 150 mM) a manitolu (250 a 300 mM). Dospělé rostliny měly po zalévání 200mM NaCl vyšší obsah chlorofylu. Po vystavení suchu na osm dní většina transgenních rostlin přežila, rostliny netransgenní naopak uhynuly. Po obnovení zalévání přežilo zhruba 18x více rostlin exprimujících gen *GsSNAP33* než WT. Nisa *et al.* zkoumali též úroveň transkripce stresem indukovaných genů *COR15A*, *KINI*, *P5CS*, *RAB18*, *RD29A* s *COR47* (Nisa *et al.* 2017). Úroveň transkripce téměř všech těchto genů byla při stresových situacích (200mM NaCl či 350mM manitol) zvýšena, mnohem výrazněji u transgenních rostlin. Tento fakt může vysvětlovat jejich zvýšenou odolnost k působení

stresorů. Dalším potenciálním vysvětlením je podíl proteinů GsSNAP33 na sekvestraci iontů Na⁺ do vakuoly. Podobně jako u GTPázy GsVAMP72 (Sun *et al.* 2013) se dá předpokládat, že též GTPáza GsSNAP33 ovlivňuje aktivitu iontových kanálů (Nisa *et al.* 2017).

OsSNAP32 – Bao *et al.* lokalizovali rýžový (*O. sativa*) protein OsSNAP32 do PM a zkoumali jeho roli v toleranci k oxidativnímu a osmotickému stresu i k nízkým teplotám (Bao *et al.* 2008b). Byla zaznamenána 62% homologie s proteinem AtSNAP33, zkoumaným ve studii Wick *et al.* (2003). Působení 20mM H₂O₂ vedlo k rychlému zvýšení transkripce genu *OsSNAP32*, ta se udržela značně zvýšená po celých 48 hodin výzkumu. Velmi výrazné zvýšení exprese tohoto genu bylo zaznamenáno po aplikaci 20% PEG6000. Působení nízké teploty (4 °C) vedlo k postupnému značnému zvyšování transkripce genu *OsSNAP32*. Vzhledem k lokalizaci proteinu OsSNAP32 v PM a značné homologii s proteinem AtSNAP33 lze předpokládat jejich podobnou funkci, tedy zajištění zvýšené fúze váčků s PM při působení stresorů (Bao *et al.* 2008b, Wick *et al.* 2003).

5.2.5. R-SNARE proteiny

AtVAMP7C – Skupina proteinů AtVAMP7C obsahuje čtyři členy, AtVAMP711 až AtVAMP714. Tyto proteiny fungují v procesu fúze váčků s tonoplastem. Leshem *et al.* ukázali, že rostliny *A. thaliana* se sníženou expresí každého z těchto genů jsou tolerantnější k solnému stresu (150mM NaCl); fenotyp rostlin *AtVAMP711* OX byl pak srovnatelný s WT (Leshem *et al.* 2006). Ukázalo se též, že působení různých abiotických stresorů vede ke snížení exprese genů kódujících proteiny skupiny AtVAMP7C. Výzkum akumulace ROS v kořenech za působení solného stresu odhalil, že ROS vznikají ve strukturách rozmístěných po celé cytoplasmě. Tyto struktury mají endosomální původ a fúzí s vakuolou. V rostlinách se sníženou expresí *AtVAMP711* byly ROS pozorovány ve specializovaném membránovém kompartmentu, který s tonoplastem nefúzuje. Solný stres (200mM NaCl) způsobil u WT výraznou alkalizaci vakuoly, u rostlin se sníženou expresí genu *AtVAMP711* byla alkalizace signifikantně menší (Leshem *et al.* 2006). Došlo též k odhalení, že Ca²⁺, významná signální molekula, uniká za působení solného stresu (200mM NaCl) z vakuoly více u WT než u mutantních rostlin. Výsledky naznačují, že fúze váčků obsahujících ROS s tonoplastem může způsobovat lokální oxidativní stres a poškozovat jeho strukturu. Inhibice této fúze tedy chrání funkce vakuoly (Leshem *et al.* 2006).

Leshem *et al.* však následně ukázali, že rostliny se sníženou expresí *AtVAMP711* projevují zhoršenou schopnost zavírat průduchy během působení sucha či ABA vedoucí k rychlejší ztrátě vody a kolapsu pletiv (Leshem *et al.* 2010). V těchto rostlinách byl pozorován větší počet

vakuol, tato vlastnost byla ještě zintenzivněna působením osmotického stresu (1000mM sorbitol). Ke správné funkci svěřacích buněk průduchů je vzhledem k jejich velkým objemovým změnám nutný endomembránový transport mezi PM a vakuolou. Při narušeném splývání váčků s tonoplastem je tedy zřejmě funkce průduchů porušena. Důležitý je také poznatek, že ABA ovlivňuje distribuci ROS uvnitř buňky. Lokalizace ROS pak hraje důležitou roli v transdukcii jejich signálu (Leshem *et al.* 2010). Protein AtVAMP711 tedy na jedné straně díky ochraně funkcí vakuoly zvyšuje odolnost k solnému stresu, na straně druhé narušením fungování průduchů snižuje odolnost k suchu.

GsVAMP72 – Sun *et al.* ukázali, že aplikace 200mM NaCl i působení 100 μ M ABA zvyšuje úroveň exprese genu *GsVAMP72* v sóji (*Glycine soja*) dle podobného vzoru, při působení solného stresu je však zvýšení v absolutních hodnotách výraznější (Sun *et al.* 2013). Po aplikaci 125mM NaCl vyklíčilo třetí den pouze 15-35 % semen transgenních rostlin *A. thaliana* exprimujících gen *GsVAMP72*, semen WT rostlin vyklíčilo 80 %. Netransgenní rostliny měly též větší čerstvou hmotnost a více zelených listů. Také v dospělém stavu vykazovaly tyto rostliny dle očekávání větší vegetativní i reprodukční růst než rostliny transgenní. Sun *et al.* dále ukázali, že zvýšená exprese genu *GsVAMP72* ovlivňuje toleranci ke stresu modifikací obsahu iontů v buňce (Sun *et al.* 2013). Tato modifikace je zřejmě způsobena regulací aktivity či lokalizace iontových kanálů v PM. U rostlin *GsVAMP72* OX je oproti WT významně redukována míra transkripce stresových genů *COR47*, *COR15A*, *RAB18*, *KINI* a *RD29A*. Úroveň transkripce většiny těchto genů byla zkoumána také v rostlinách *GsSNAP33* OX (Nisa *et al.* 2017). Sun *et al.* též ukázali, že protein *GsVAMP72* je pozitivním regulátorem signální dráhy ABA (Sun *et al.* 2013). Tento protein je lokalizován zřejmě na PM a strukturách podobných endosomům (endosome-like).

6. Diskuse a závěr

Rostliny jsou v místě svého růstu téměř neustále vystaveny působení různých abiotických i biotických stresorů. Přes řadu ochranných mechanismů představuje stres celosvětově hlavní příčinu ztrát na úrodě. Adaptace na stres vyžaduje významné změny exprese řady genů a velmi důležitou roli při ní hraje recyklace molekul odstraňující existující molekuly z různých buněčných kompartmentů a nahrazující je molekulami novými, nepoškozenými. Potřebný

pohyb molekul mezi kompartmenty je zajištěn endomembránovým transportem, na jehož dva významné aktéry, RAB GTPázy a SNARE proteiny, byla zaměřena této práce.

Většina citovaných studií zabývajících se RAB GTPázami a SNARE proteiny při působení abiotických stresorů zkoumala vliv působení soli (především NaCl), osmotického stresu (simulovaného činidlem PEG, sorbitolem nebo manitolem) či nedostatku vody odnětím zálivky. Často byl analyzován také sekundární oxidativní stres či působení ABA. Vzácněji bylo zkoumáno působení nízké teploty, mechanických podnětů, poranění či působení dalších rostlinných hormonů. Změny vlastností pozorované u rostlin byly v řadě studií objasněny či potvrzeny též na bakteriích *E. coli*, například v práci Peng *et al.* (2011). V mnoha studiích bylo prokázáno, že exprese zkoumaného proteinu se změnila (typicky se zvýšila, u některých proteinů se však snížila) při působení abiotických stresorů. Pouze v některých případech byl však předložen přímý důkaz, že změna exprese daného proteinu genetickou modifikací (například zvýšení exprese či mutace v genu kódujícím tento protein) vede k vyšší toleranci studované rostliny. Toto bylo potvrzeno například u proteinu OsRAB7 (Nahm *et al.* 2003, Peng *et al.* 2014). V některých případech však může být zvýšení exprese obou skupin proteinů součástí komplikovanějšího mechanismu stresové odpovědi a samotná změna exprese RAB GTPázy či SNARE proteinu zvýšení tolerance nezpůsobí.

Při srovnání různých proteinů se ukazuje, že velice záleží nejen na jejich funkci, ale též na jejich konkrétní lokalizaci. Protein OsSYP71 zřejmě usnadněním splývání váčků obsahujících H₂O₂ s PM zvýšil toleranci k působení stresorů, neboť díky této fúzi se buňka může účinněji zbavovat ROS (Bao *et al.* 2012). Proteiny skupiny AtVAMP7C fungují podobně, pouze v jiné části endomembránového transportu, konkrétně ve fúzi váčků s tonoplastem. Splývání váčků obsahujících ROS s vakuolou může vést k oxidativnímu poškození tonoplastu a následně k narušení funkcí vakuoly (Leshem *et al.* 2006). Usnadnění fúze váčků tedy může podle buněčného kontextu toleranci jednomu případě zvýšit, v případě jiném naopak snížit.

Pro praktické využití modifikované plodiny je velmi vhodné, aby zvýšení její tolerance k jednomu stresoru nebylo provázeno snížením tolerance ke stresoru jinému. Výše je uvedeno, že snížení exprese genů kódujících proteiny skupiny AtVAMP7C vedlo ke zvýšení tolerance rostliny k solnému stresu díky ochraně funkcí vakuoly (Leshem *et al.* 2006). Ukázalo se však, že při porušení fúzních mechanismů s vakuolou dochází zároveň k narušení funkce svěracích buněk průduchů, a tedy k rychlejší ztrátě vody (Leshem *et al.* 2010). Tato modifikace se tak pro svou dvousečnost nehodí k tvorbě tolerantnějších rostlin. Jako nevhodné se jeví též proteiny ze skupiny OsNPSN, které zvyšují toleranci k oxidativnímu stresu, ke stresu solnému a osmotickému ji však snižují (Bao *et al.* 2008a).

Výzkum role RAB GTPáz a SNARE proteinů v odpovědi na abiotický stres trvá již zhruba dvacet let. Přesto je však množství provedených studií, zejména u SNARE proteinů, stále poměrně omezené. Poznatky získané ve studiích i přes deset let starých mnohdy zůstávají jedinými znalostmi, které o zkoumaném proteinu v dané oblasti máme. Dodnes také zůstává nezodpovězena celá řada otázek, které si tyto studie kladly. U RAB GTPáz je situace příznivější, nicméně i zde je stále mnoho vlastností a funkcí nepotvrzených a prostor pro výzkum zůstává značně široký. Recentní publikace nových poznatků o funkcích těchto skupin proteinů při působení abiotického stresu však ukazují, že studium této problematiky nadále pokračuje. V budoucnu tak jistě dojde k významnému prohloubení našich znalostí.

Závěrem mohu shrnout, že o RAB GTPázách i SNARE proteinech lze jistě uvažovat jako o molekulárních aktérech využitelných k tvorbě tolerantnějších plodin. Změna jejich exprese vedla v mnoha studiích k výraznému zlepšení řady parametrů indikujících zvýšenou tolerancí k působení abiotických stresorů. Například v transgenní rýži (*O. sativa*) exprimující protein PgRAB7 byla zaznamenána při působení 200mM NaCl o 344 % vyšší čistá fotosyntéza a o 40 % větší elektronový transport než u WT (Tripathy *et al.* 2017). Zvýšená exprese proteinu ARA6 v *A. thaliana* vedla při působení 100mM NaCl ke kořenům delším o 37,1 % než u WT (Yin *et al.* 2017). Za zmínku stojí též studie zabývající se SNARE proteinem GsSNAP33, ve které autoři zaznamenali po obnovení zalévání (následujícím po osmidenním odnětí závlivky) přežití zhruba 18x většího množství rostlin *A. thaliana* exprimujících protein GsSNAP33 než WT (Nisa *et al.* 2017). Nenalezl jsem však studii, která by řešila vliv změny exprese více různých RAB GTPáz současně, anebo více odlišných SNARE proteinu zároveň. Bylo by zajímavé zkoumat, zda například současné zvýšení exprese dvou a více RAB GTPáz povede k větší toleranci než při zvýšení exprese pouze jedné z těchto RAB GTPáz, či zda dojde naopak k vzájemnému vyrušení těchto pozitivních efektů. Jinou úroveň studia může představovat současná změna exprese RAB GTPázy a SNARE proteinu operujících v téže transportní dráze. RAB a SNARE proteiny hrají roli v odlišných fázích transportních drah, tedy tato vícenásobná modifikace by mohla vést ke zvýšení tolerance rostliny posílením více kroků dané transportní dráhy zároveň. Dalším velmi slibným přístupem může být křížení rostlin s modifikovanou expresí RAB GTPáz či SNARE proteinů s rostlinami, jejichž zvýšená tolerance je zajištěna jiným mechanismem. Tato kombinace několika nezávislých mechanismů může též vést k vyšší toleranci získaných rostlin.

Je však nutné si uvědomit, že experimenty prováděné v citovaných studiích měly pouze laboratorní povahu. Velice důležité bude provést též skleníkové a zejména polní pokusy, při kterých na rostlinu působí současně mnohem širší paleta faktorů, než je možné nasimulovat

v laboratoři. Teprve po získání výsledků z těchto pokusů se ukáže, nakolik reálné byly naše naděje na tvorbu tolerantnějších rostlin modifikací exprese RAB GTPáz či SNARE proteinů. Již provádění těchto pokusů je zejména v Evropě komplikováno značným odporem veřejnosti ke geneticky modifikovaným organismům. Proces schválení geneticky modifikovaného organismu pro pěstování a jeho uvedení na trh trvá v Evropské unii velmi dlouho a je finančně značně nákladný. Praktické využití modifikovaných plodin se zvýšenou tolerancí založenou na RAB GTPázách či SNARE proteinech je tak i vzhledem ke zmíněné politické rovině zřejmě stále poměrně vzdálené.

7. Citovaná literatura

- * Agarwal P, Reddy MK, Sopory SK, Agarwal PK. 2009. Plant rabs: Characterization, functional diversity, and role in stress tolerance. *Plant Mol. Biol. Report.* 27(4):417–30
- Agarwal PK, Agarwal P, Jain P, Jha B, Reddy MK, Sopory SK. 2008. Constitutive overexpression of a stress-inducible small GTP-binding protein PgRab7 from *Pennisetum glaucum* enhances abiotic stress tolerance in transgenic tobacco. *Plant Cell Rep.* 27(1):105–15
- Asaoka R, Uemura T, Ito J, Fujimoto M, Ito E, *et al.* 2013a. *Arabidopsis* RABA1 GTPases are involved in transport between the *trans*-Golgi network and the plasma membrane, and are required for salinity stress tolerance. *Plant J.* 73(2):240–49
- Asaoka R, Uemura T, Nishida S, Fujiwara T, Ueda T, Nakano A. 2013b. New insights into the role of *Arabidopsis* RABA1 GTPases in salinity stress tolerance. *Plant Signal. Behav.* 8(9):e25377
- Bao Y-M, Sun S-J, Li M, Li L, Cao W-L, *et al.* 2012. Overexpression of the Qc-SNARE gene *OsSYP71* enhances tolerance to oxidative stress and resistance to rice blast in rice (*Oryza sativa* L.). *Gene.* 504(2):238–44
- Bao Y-M, Wang J-F, Huang J, Zhang H-S. 2008a. Cloning and characterization of three genes encoding Qb-SNARE proteins in rice. *Mol. Genet. Genomics.* 279(3):291–301
- Bao Y-M, Wang J-F, Huang J, Zhang H-S. 2008b. Molecular cloning and characterization of a novel SNAP25-type protein gene *OsSNAP32* in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol. Biol. Rep.* 35(2):145–52
- Besserer A, Burnotte E, Bienert GP, Chevalier AS, Errachid A, *et al.* 2012. Selective regulation of maize plasma membrane aquaporin trafficking and activity by the SNARE SYP121. *Plant Cell.* 24(8):3463–81
- 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 Mol. Biol.* 42(6):923–36
- Braam J, Davis RW. 1990. Rain-, wind-, and touch-induced expression of calmodulin and calmodulin-related genes in *Arabidopsis*. *Cell.* 60(3):357–64
- + Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL. 2015. *Biochemistry and molecular biology of plants (2nd Edition)*. West Sussex: John Wiley & sons

- Dettmer J. 2006. Vacuolar H⁺-ATPase activity is required for endocytic and secretory trafficking in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 18(3):715–30
- Dirac-Svejstrup AB, Sumizawa T, Pfeffer SR. 1997. Identification of a GDI displacement factor that releases endosomal Rab GTPases from Rab-GDI. *EMBO J*. 16(3):465–72
- Dombrowski JE, Baldwin JC, Martin RC. 2008. Cloning and characterization of a salt stress-inducible small GTPase gene from the model grass species *Lolium temulentum*. *J. Plant Physiol*. 165(6):651–61
- Drakakaki G, Van De Ven W, Pan S, Miao Y, Wang J, *et al.* 2012. Isolation and proteomic analysis of the SYP61 compartment reveal its role in exocytic trafficking in *Arabidopsis*. *Cell Res*. 22(2):413–24
- Ebine K, Fujimoto M, Okatani Y, Nishiyama T, Goh T, *et al.* 2011. A membrane trafficking pathway regulated by the plant-specific RAB GTPase ARA6. *Nat. Cell Biol*. 13(7):853–60
- 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(1):23–27
- Ebine K, Okatani Y, Uemura T, Goh T, Shoda K, *et al.* 2008. A SNARE complex unique to seed plants is required for protein storage vacuole biogenesis and seed development of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*. 20(11):3006–21
- * Ebine K, Ueda T. 2009. Unique mechanism of plant endocytic/vacuolar transport pathways. *J. Plant Res*. 122(1):21–30
- Fasshauer D, Sutton RB, Brunger AT, Jahn R. 1998. Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 95(26):15781–86
- Fendrych M, Synek L, Pečenková T, Toupalová H, Cole R, *et al.* 2010. The *Arabidopsis* exocyst complex is involved in cytokinesis and cell plate maturation. *Plant Cell*. 22(9):3053–65
- * Fujita Y, Fujita M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2011. ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. *J. Plant Res*. 124(4):509–25
- Gao C, Zhuang X, Cui Y, Fu X, He Y, *et al.* 2015. Dual roles of an *Arabidopsis* ESCRT component FREE1 in regulating vacuolar protein transport and autophagic degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 112(6):1886–91
- George S, Parida A. 2011. Over-expression of a Rab family GTPase from phreatophyte *Prosopis juliflora* confers tolerance to salt stress on transgenic tobacco. *Mol. Biol. Rep*. 38(3):1669–74
- * Gill SS, Tuteja N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem*. 48(12):909–30
- Hachez C, Laloux T, Reinhardt H, Cavez D, Degand H, *et al.* 2014. *Arabidopsis* SNAREs SYP61 and SYP121 coordinate the trafficking of plasma membrane aquaporin PIP2; 7 to modulate the cell membrane water permeability. *Plant Cell*. 26(7):3132–47
- Hamaji K, Nagira M, Yoshida K, Ohnishi M, Oda Y, *et al.* 2009. Dynamic aspects of ion accumulation by vesicle traffic under salt stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol*. 50(12):2023–33
- Hamant O, Heisler MG, Jönsson H, Krupinski P, Uyttewaal M, *et al.* 2008. Developmental patterning by mechanical signals in *Arabidopsis*. *Science*. 322(5908):1650–55
- Huang YP, Jhuo JH, Tsai MS, Tsai CH, Chen HC, *et al.* 2016. NbRABG3f, a member of Rab GTPase, is involved in Bamboo mosaic virus infection in *Nicotiana benthamiana*. *Mol. Plant Pathol*. 17(5):714–26
- Chen Y, Shin YK, Bassham DC. 2005. YKT6 is a core constituent of membrane fusion machineries at the *Arabidopsis* trans-Golgi network. *J. Mol. Biol*. 350(1):92–101

- * Il Kwon S, Park OK. 2008. Autophagy in plants. *J. Plant Biol.* 51(5):313–20
- Ishitani M, Liu J, Halfter U, Kim C-S, Shi W, Zhu J-K. 2000. SOS3 function in plant salt tolerance requires N-myristoylation and calcium binding. *Plant Cell.* 12(9):1667–77
- Jeter CR, Tang W, Henaff E, Butterfield T, Roux SJ. 2004. Evidence of a novel cell signaling role for extracellular adenosine triphosphates and diphosphates in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 16(10):2652–64
- * Jürgens G. 2004. Membrane trafficking in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20:481–504
- * Kanazawa T, Ueda T. 2017. Exocytic trafficking pathways in plants: Why and how they are redirected. *New Phytol.* 215(3):952–57
- Karim S, Alezzawi M, Garcia-Petit C, Solymosi K, Khan NZ, *et al.* 2014. A novel chloroplast localized Rab GTPase protein CPRabA5e is involved in stress, development, thylakoid biogenesis and vesicle transport in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 84(6):675–92
- Kim JH, Chen C, Yun HR, Lee Y-S, Yi YB, *et al.* 2017. Disorder of trafficking system of plasma membrane and vacuole antiporter proteins causes hypersensitive response to salinity stress in *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Biol.* 60(4):380–86
- Kleine-Vehn J, Dhonukshe P, Sauer M, Brewer PB, Wiśniewska J, *et al.* 2008. ARF GEF-dependent transcytosis and polar delivery of PIN auxin carriers in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 18(7):526–31
- Kolb C, Nagel M-K, Kalinowska K, Hagemann J, Ichikawa M, *et al.* 2015. FYVE1 is essential for vacuole biogenesis and intracellular trafficking in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 167(4):1361–73
- Kulich I, Pečenková T, Sekereš J, Smetana O, Fendrych M, *et al.* 2013. *Arabidopsis* exocyst subcomplex containing subunit EXO70B1 is involved in autophagy-related transport to the vacuole. *Traffic.* 14(11):1155–65
- Kwon S Il, Cho HJ, Kim SR, Park OK. 2013. The Rab GTPase RabG3b positively regulates autophagy and immunity-associated hypersensitive cell death in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 161(4):1722–36
- Lauber MH, Waizenegger I, Steinmann T, Schwarz H, Mayer U, *et al.* 1997. The *Arabidopsis* KNOLLE protein is a cytokinesis-specific syntaxin. *J. Cell Biol.* 139(6):1485–93
- Lee D, Polisensky DH, Braam J. 2005. Genome-wide identification of touch- and darkness-regulated *Arabidopsis* genes: A focus on calmodulin-like and *XTH* genes. *New Phytol.* 165(2):429–44
- Leshem Y, Golani Y, Kaye Y, Levine A. 2010. Reduced expression of the v-SNAREs AtVAMP71/AtVAMP7C gene family in *Arabidopsis* reduces drought tolerance by suppression of abscisic acid-dependent stomatal closure. *J. Exp. Bot.* 61(10):2615–22
- Leshem Y, Melamed-Book N, Cagnac O, Ronen G, Nishri Y, *et al.* 2006. Suppression of *Arabidopsis* vesicle-SNARE expression inhibited fusion of H₂O₂-containing vesicles with tonoplast and increased salt tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103(47):18008–13
- Leyman B, Geelen D, Blatt MR. 2000. Localization and control of expression of Nt-Syr1, a tobacco snare protein. *Plant J.* 24(3):369–81
- Leyman B, Geelen D, Quintero FJ, Blatt MR. 1999. A tobacco syntaxin with a role in hormonal control of guard cell ion channels. *Science.* 283(5401):537–40
- * Li J, Pu L, Han M, Zhu M, Zhang R, Xiang Y. 2014. Soil salinization research in China: Advances and prospects. *J. Geogr. Sci.* 24(5):943–60
- Liu F, Guo J, Bai P, Duan Y, Wang X, *et al.* 2012. Wheat TaRab7 GTPase is part of the signaling pathway in responses to stripe rust and abiotic stimuli. *PLoS One.* 7(5):e37146
- Liu M, Peng Y, Li H, Deng L, Wang X, Kang Z. 2016. TaSYP71, a Qc-SNARE, contributes to wheat resistance against *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Front. Plant Sci.* 7:544
- Liu Z, Luo C, Dong L, Toan C Van, Wei P-X, He X-H. 2014. Molecular characterization and expression analysis of a GTP-binding protein (MiRab5) in *Mangifera indica*. *Gene.*

540(1):86–91

- Maxwell DP, Wang Y, McIntosh L. 1999. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96(14):8271–76
- Mazel A, Leshem Y, Tiwari BS, Levine A. 2004. Induction of salt and osmotic stress tolerance by overexpression of an intracellular vesicle trafficking protein AtRab7 (AtRabG3e). *Source Plant Physiol.* 134(1):118–28
- * Michaeli S, Galili G, Genschik P, Fernie AR, Avin-Wittenberg T. 2016. Autophagy in plants – what’s new on the menu? *Trends Plant Sci.* 21(2):134–44
- Mirzaei M, Pascovici D, Atwell BJ, Haynes PA. 2012. Differential regulation of aquaporins, small GTPases and V-ATPases proteins in rice leaves subjected to drought stress and recovery. *Proteomics.* 12(6):864–77
- Mizrachi-Aviv E, Mills D, Benzioni A, Bar-Zvi D. 2002. Cloning and molecular characterization of the salt-regulated jojoba *ScRab* cDNA encoding a small GTP-binding protein. *DNA Seq.* 13(5):295–300
- * Moshkov IE, Novikova G V. 2008. Superfamily of plant monomeric GTP-binding proteins: 2. Rab proteins are the regulators of vesicles trafficking and plant responses to stresses. *Russ. J. Plant Physiol.* 55(1):119–29
- * Munns R, Tester M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59:651–81
- Nahm MY, Kim SW, Yun D, Lee SY, Cho MJ, Dong Bahk J. 2003. Molecular and biochemical analyses of *OsRab7*, a rice Rab7 homolog. *Plant Cell Physiol.* 44(12):1341–49
- Nisa Z-U, Mallano AI, Yu Y, Chen C, Duan X, *et al.* 2017. *GsSNAP33*, a novel *Glycine soja* SNAP25-type protein gene: Improvement of plant salt and drought tolerances in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol. Biochem.* 119:9–20
- O’Mahony PJ, Oliver MJ. 1999. Characterization of a desiccation-responsive small GTP-binding protein (Rab2) from the desiccation-tolerant grass *Sporobolus stapfianus*. *Plant Mol. Biol.* 39(4):809–21
- Onelli E, Prescianotto-Baschong C, Caccianiga M, Moscatelli A. 2008. Clathrin-dependent and independent endocytic pathways in tobacco protoplasts revealed by labelling with charged nanogold. *J. Exp. Bot.* 59(11):3051–68
- * Park M, Jürgens G. 2012. Membrane traffic and fusion at post-Golgi compartments. *Front. Plant Sci.* 2:111
- + Pavlová L. 2005. *Fyziologie rostlin*. Praha: Karolinum
- * Peixoto B, Pereira S, Pissarra J. 2017. Plant vacuolar sorting: An overview. *Prog. Bot.* 78:67–94
- Peng X, Ding X, Chang T, Wang Z, Liu R, *et al.* 2014. Overexpression of a vesicle trafficking gene, *OsRab7*, enhances salt tolerance in rice. *Sci. World J.* 2014:1–7
- Peng X, Zeng X, Ding X, Li S, Yu C, Zhu Y. 2011. Ectopic expression of a vesicle trafficking gene, *OsRab7*, from *Oryza sativa*, confers tolerance to several abiotic stresses in *Escherichia coli*. *African J. Biotechnol.* 10(36):6941–46
- * Pérez-Pérez ME, Lemaire SD, Crespo JL. 2012. Reactive oxygen species and autophagy in plants and algae. *Plant Physiol.* 160(1):156–64
- Pumplin N, Zhang X, Noar RD, Harrison MJ. 2012. Polar localization of a symbiosis-specific phosphate transporter is mediated by a transient reorientation of secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109(11):E665–72
- Rajan N, Agarwal P, Patel K, Sanadhya P, Khedia J, Agarwal PK. 2015. Molecular characterization and identification of target protein of an important vesicle trafficking gene *AlRab7* from a salt excreting halophyte *Aeluropus lagopoides*. *DNA Cell Biol.* 34(2):83–91
- * Rutherford S, Moore I. 2002. The *Arabidopsis* Rab GTPase family: Another enigma variation.

- Curr. Opin. Plant Biol.* 5(6):518–28
- Rybak K, Steiner A, Synek L, Klaeager S, Kulich I, *et al.* 2014. Plant cytokinesis is orchestrated by the sequential action of the TRAPP II and exocyst tethering complexes. *Dev. Cell.* 29(5):607–20
- Sanderfoot A. 2007. Increases in the number of SNARE genes parallels the rise of multicellularity among the green plants. *Plant Physiol.* 144(1):6–17
- Sanderfoot AA, Pilgrim M, Adam L, Raikhel N V. 2001. Disruption of individual members of *Arabidopsis* syntaxin gene families indicates each has essential functions. *Plant Cell.* 13(3):659–66
- Sharma K, Pant SR, McNeece BT, Lawrence GW, Klink VP. 2016. Co-regulation of the *Glycine max* soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor (SNARE)-containing regulon occurs during defense to a root pathogen. *J. Plant Interact.* 11(1):74–93
- Scherz-Shouval R, Shvets E, Fass E, Shorer H, Gil L, Elazar Z. 2007. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J.* 26(7):1749–60
- Söllner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, *et al.* 1993. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature.* 362(6418):318–24
- Son YS, Im CH, Kim DW, Bahk JD. 2013. OsRab11 and OsGAP1 are essential for the vesicle trafficking of the vacuolar H⁺-ATPase OsVHA-a1 under high salinity conditions. *Plant Sci.* 198:58–71
- Sui J-M, Li R, Fan Q-C, Song L, Zheng C-H, *et al.* 2012. Isolation and characterization of a stress responsive small GTP-binding protein AhRabG3b in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Euphytica.* 189(2):161–72
- Sui J-M, Li G, Chen G, Zhao C, Kong X, *et al.* 2017. RNA-seq analysis reveals the role of a small GTP-binding protein, Rab7, in regulating clathrin-mediated endocytosis and salinity-stress resistance in peanut. *Plant Biotechnol. Rep.* 11(1):43–52
- Sun X, Ji W, Ding X, Bai X, Cai H, *et al.* 2013. GsVAMP72, a novel *Glycine soja* R-SNARE protein, is involved in regulating plant salt tolerance and ABA sensitivity. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 113(2):199–215
- Suzuki M, Hashioka A, Mimura T, Ashihara H. 2005. Salt stress and glycolytic regulation in suspension-cultured cells of the mangrove tree, *Bruguiera sexangula*. *Physiol. Plant.* 123(3):246–53
- * Sytar O, Kumar A, Latowski D, Kuczynska P, Strzałka K, Prasad MNV. 2013. Heavy metal-induced oxidative damage, defense reactions, and detoxification mechanisms in plants. *Acta Physiol. Plant.* 35(4):985–99
- Tarte VN, Seok H-Y, Woo D-H, Le DH, Tran HT, *et al.* 2015. *Arabidopsis* Qc-SNARE gene *AtSFT12* is involved in salt and osmotic stress responses and Na⁺ accumulation in vacuoles. *Plant Cell Rep.* 34(7):1127–38
- * Tester M, Davenport R. 2003. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Ann. Bot.* 91(5):503–27
- Touchot N, Chardin P, Tavitian A. 1987. Four additional members of the ras gene superfamily isolated by an oligonucleotide strategy: Molecular cloning of YPT-related cDNAs from a rat brain library. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84(23):8210–14
- Tripathy MK, Tiwari BS, Reddy MK, Deswal R, Sopory SK. 2017. Ectopic expression of PgRab7 in rice plants (*Oryza sativa* L.) results in differential tolerance at the vegetative and seed setting stage during salinity and drought stress. *Protoplasma.* 254(1):109–24
- Tse YC, Mo B, Hillmer S, Zhao M, Lo SW, *et al.* 2004. Identification of multivesicular bodies as prevacuolar compartments in *Nicotiana tabacum* BY-2 cells. *Plant Cell.* 16(3):672–93
- Tsutsui T, Nakano A, Ueda T. 2015. The plant-specific RAB5 GTPase ARA6 is required for

- starch and sugar homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 56(6):1073–83
- 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*. *EMBO J.* 20(17):4730–41
- Uemura T, Kim H, Saito C, Ebine K, Ueda T, *et al.* 2012a. Qa-SNAREs localized to the *trans*-Golgi network regulate multiple transport pathways and extracellular disease resistance in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109(5):1784–89
- * Uemura T, Ueda T. 2014. Plant vacuolar trafficking driven by RAB and SNARE proteins. *Curr. Opin. Plant Biol.* 22:116–21
- Uemura T, Ueda T, Nakano A. 2012b. The physiological role of SYP4 in the salinity and osmotic stress tolerances. *Plant Signal. Behav.* 7(9):1118–20
- Uemura T, Ueda T, Ohniwa RL, Nakano A, Takeyasu K, Sato MH. 2004. Systematic analysis of SNARE molecules in *Arabidopsis*: Dissection of the post-Golgi network in plant cells. *CELL Struct. Funct.* 29:49–65
- Uyttewaal M, Burian A, Alim K, Landrein B, Borowska-Wykre D, *et al.* 2012. Mechanical stress acts via katanin to amplify differences in growth rate between adjacent cells in *Arabidopsis*. *Cell.* 149(2):439–51
- Vernoud V, Horton AC, Yang Z, Nielsen E. 2003. Analysis of the small GTPase gene superfamily of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 131(3):1191–1208
- Wang X, Wang X, Deng L, Chang H, Dubcovsky J, *et al.* 2014. Wheat *TaNPSN* SNARE homologues are involved in vesicle-mediated resistance to stripe rust (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*). *J. Exp. Bot.* 65(17):4807–20
- Weerasinghe RR, Swanson SJ, Okada SF, Garrett MB, Kim S-Y, *et al.* 2009. Touch induces ATP release in *Arabidopsis* roots that is modulated by the heterotrimeric G-protein complex. *FEBS Lett.* 583(15):2521–26
- Weimbs T, Low SH, Chapin SJ, Mostov KE, Bucher P, Hofmann K. 1997. A conserved domain is present in different families of vesicular fusion proteins: A new superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94(7):3046–51
- * Wesolowski J, Paumet F. 2010. SNARE motif: A common motif used by pathogens to manipulate membrane fusion. *Virulence.* 1(4):319–24
- Wick P, Gansel X, Oulevey C, Page V, Studer I, *et al.* 2003. The expression of the t-SNARE AtSNAP33 is induced by pathogens and mechanical stimulation. *Plant Physiol.* 132(1):343–51
- Yang A, Zhang W-H. 2016. A small GTPase, OsRab6a, is involved in the regulation of iron homeostasis in rice. *Plant Cell Physiol.* 57(6):1271–80
- Yano D, Sato M, Saito C, Sato MH, Morita MT, Tasaka M. 2003. A SNARE complex containing SGR3/AtVAM3 and ZIG/VTI11 in gravity-sensing cells is important for *Arabidopsis* shoot gravitropism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100(14):8589–94
- Yin C, Karim S, Zhang H, Aronsson H. 2017. *Arabidopsis* RabF1 (ARA6) is involved in salt stress and dark-induced senescence (DIS). *Int. J. Mol. Sci.* 18(2):1–10
- Zhao M, Wu S, Zhou Q, Vivona S, Cipriano DJ, *et al.* 2015. Mechanistic insights into the recycling machine of the SNARE complex. *Nature.* 518(7537):61–67
- Zhu J, Gong Z, Zhang C, Song C-P, Damsz B, *et al.* 2002. OSM1/SYP61: A syntaxin protein in *Arabidopsis* controls abscisic acid-mediated and non-abscisic acid-mediated responses to abiotic stress. *Plant Cell.* 14(12):3009–28

* shrnující článek (review)

+ učebnice/skripta