

### 3) Regulace růstu a vývoje rostlin hormony

a) Auxiny

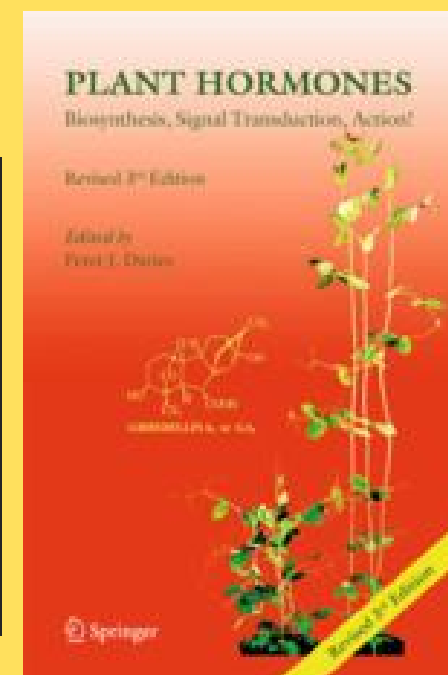
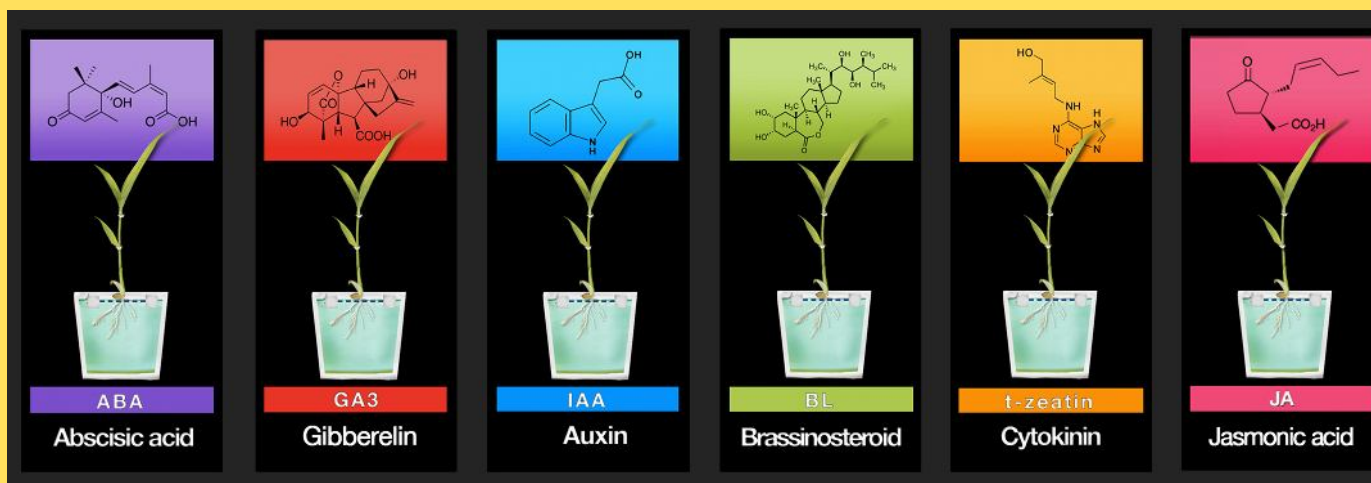
b) Brasinosteroidy

c) Ethylen

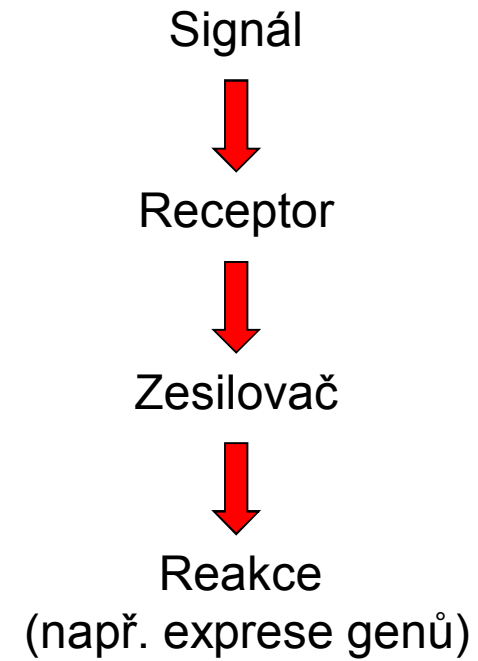
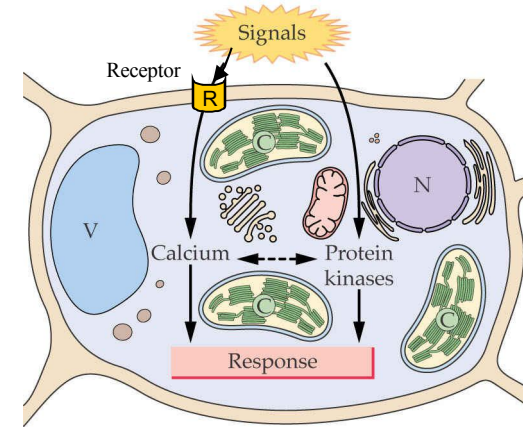
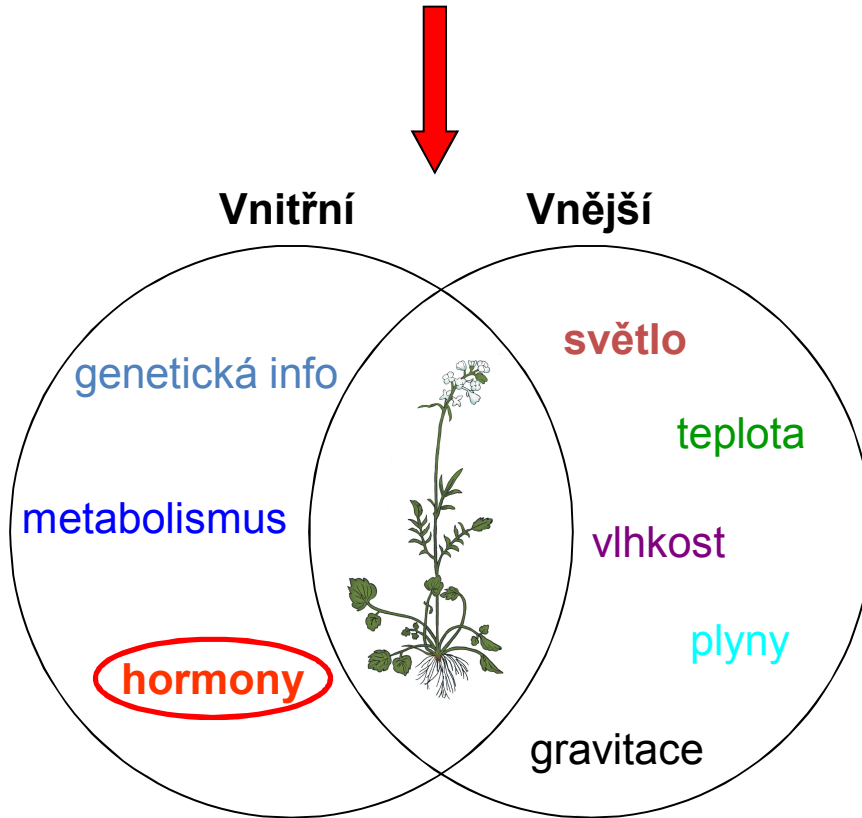
d) Kyselina abscisová (ABA)

e) Kyselina salicylová (SA)

f) Kyselina jasmonová (JA)

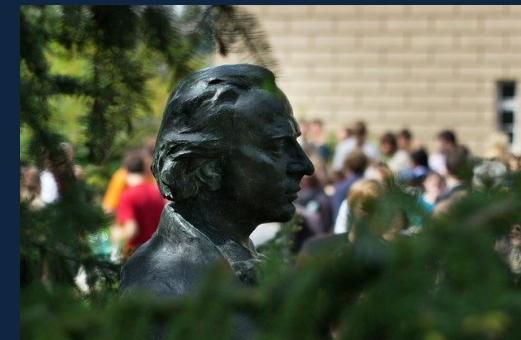
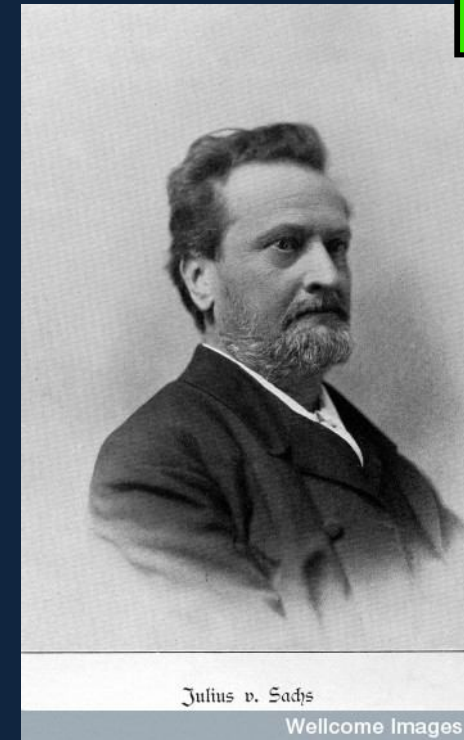


### Vývoj organismu regulují signály (faktory)



**Historii hormonů začíná Julius von Sachs (1832-1897), studoval v Praze.**

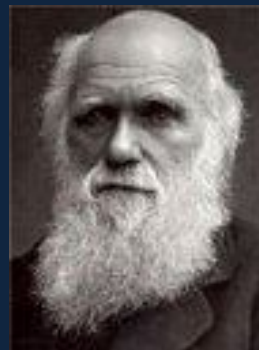
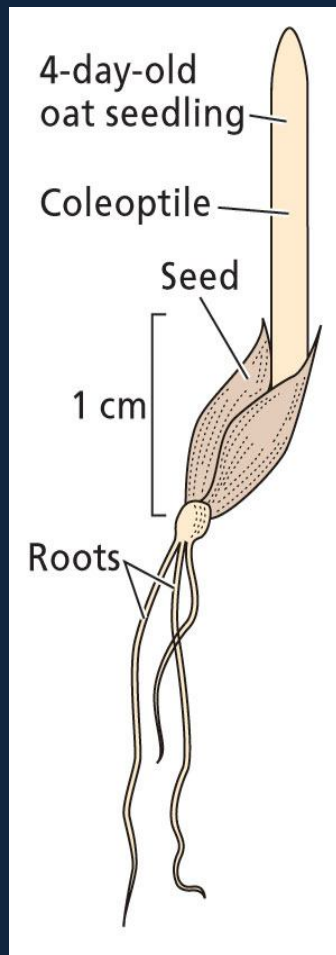
- **Endokrinní (přenos do jiných částí rostliny) i parakrinní (účinky v místě syntézy)**
- **Nemají přesná místa syntézy a účinku**
- **Slabší koncentrační závislost účinku**
- **Menší specifita účinku mechanismus účinku ale obdobný**
- **Receptor (vazebné místo) a přenos signálu v buňce (systém druhých posílů, protein kinasová kaskáda, regulace aktivity enzymů, genové exprese apod.)**



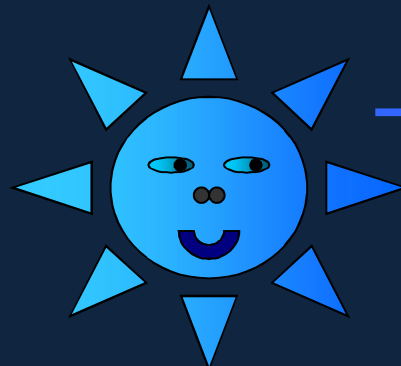
**PřF UK, Praha 6.5. 2014**

## a) Auxiny

## Fototropismus (1880)



Ch. Darwin

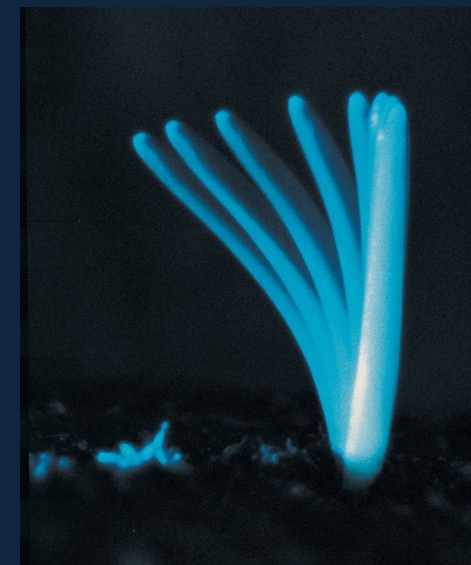


Auxinový gradient



Auxin stimuluje růst buněk více na zastíněné než na ozářené straně koleoptile => zakřivení růstu

~ 180 minut



Zakřivení koleoptile

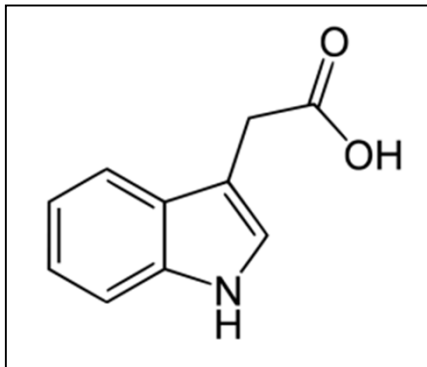
**Ve 30. letech byl izolován **auxin** a bylo ukázáno, že stimuluje růst..**



Akumulace auxinu ze špiček koleoptile do agarových bloků

...a ukázal, že materiál akumulovaný v agarových blocích je látka, která stimuluje růst.

Úhel zakřivení je úměrný množství auxinu v bloku



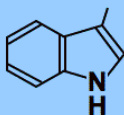
IAA - Kyselina indol-3-octová (Indole-3-acetic acid)

Tento experiment ukazující stimulaci růstu auxinem byl použit jako základ pro purifikaci auxinu.

## Auxiny – důležité rostlinné hormony zapojené v širokém spektru růstových a vývojových procesů:

### Naturally Occurring Auxins

indole-3-acetic acid  
CH<sub>2</sub>COOH



IAA

4-chloroindole-3-acetic acid  
CH<sub>2</sub>COOH



4-Cl-IAA

phenylacetic acid  
CH<sub>2</sub>COOH

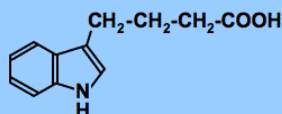


PAA

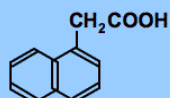
- ❖ embryogeneze
- ❖ prodlužování stonku
- ❖ apikální dominance
- ❖ foto- a gravitropismus
- ❖ tvorba laterálních kořenů

### Commonly Used Synthetic Auxins

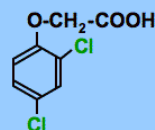
indole-3-butyric acid



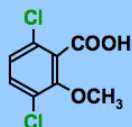
naphthalene acetic acid



2,4-dichlorophenoxyacetic acid



2-methoxy-3,6-dichlorobenzoic acid



4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid



2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid



### Buněčná úroveň:

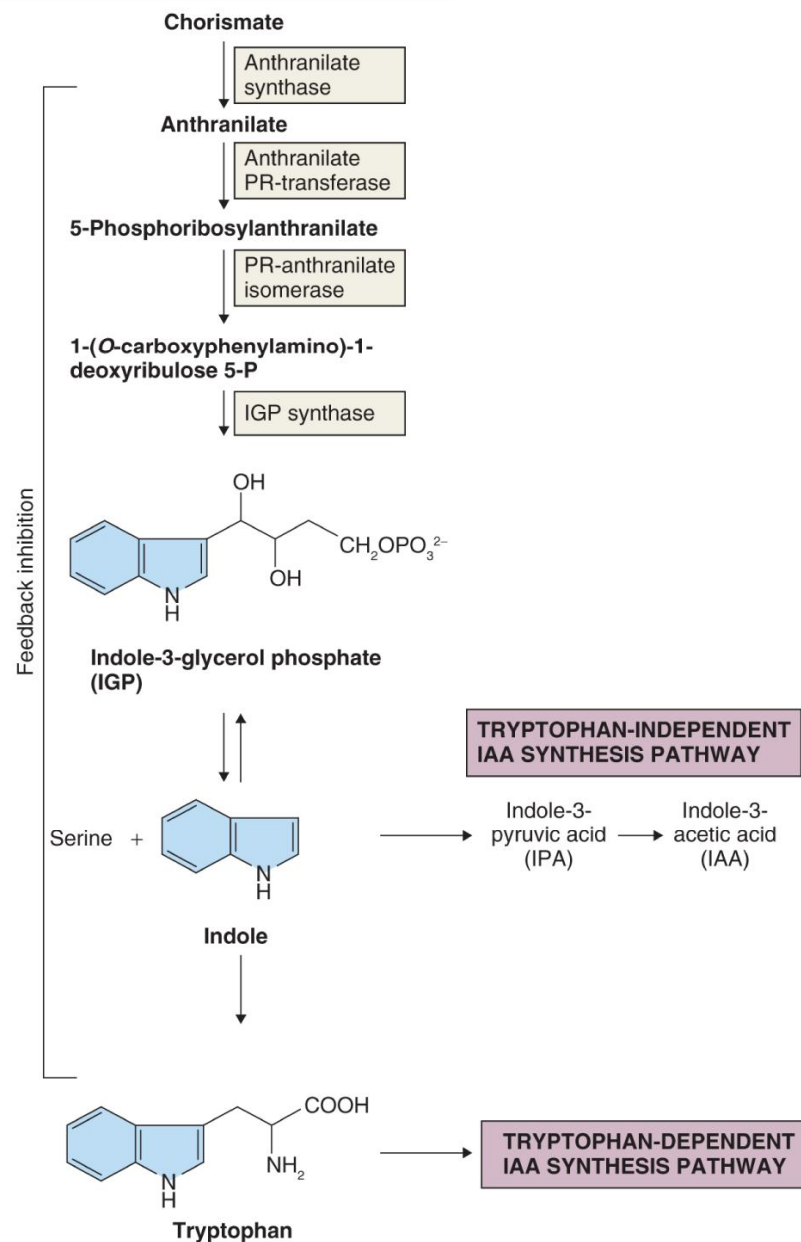
- ❖ buněčné dělení
- ❖ expanze buněk
- ❖ diferenciacce buněk

## Biosyntéza auxinu IAA

- Indolová dráha
- Tryptofanová dráha

Hlavním místem biosyntézy jsou mladá dělicí se pletiva a meristémy.

### TRYPTOPHAN BIOSYNTHETIC PATHWAY



## Konjugáty

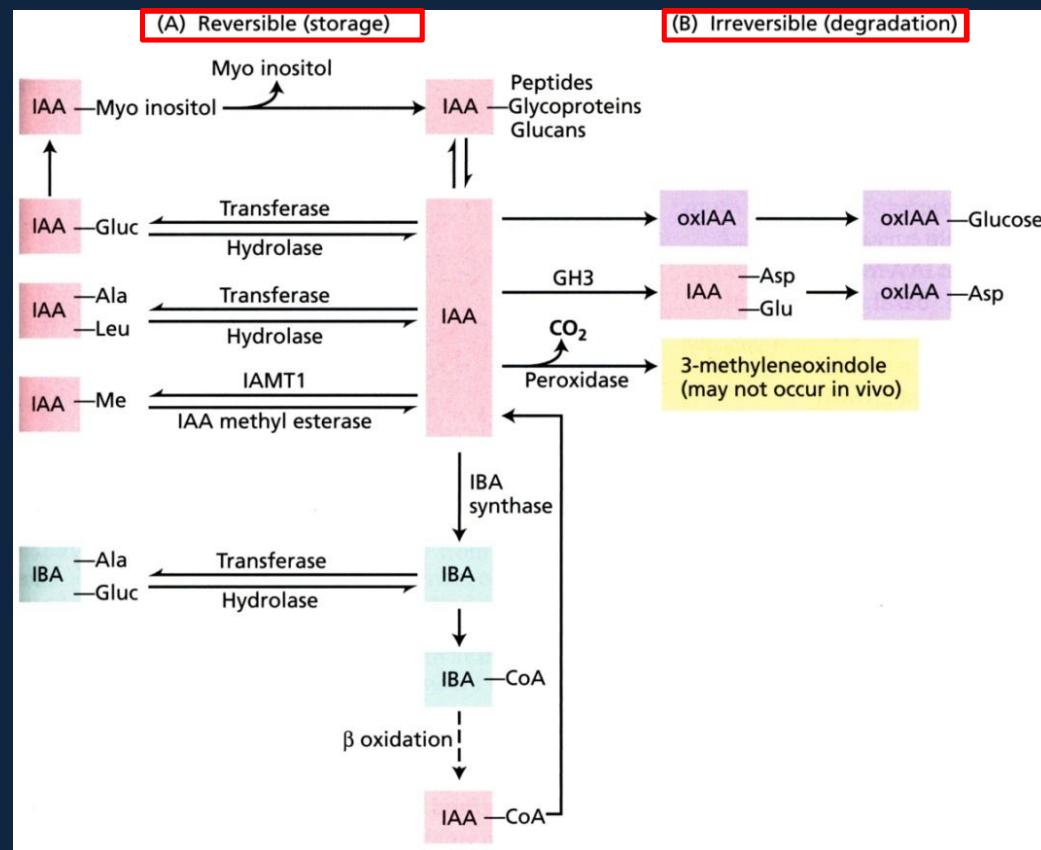
**Kovalentně vázaná IAA (hl. semena a zásobní orgány) – netransportovatelné inaktivní formy auxinu**

### (A) Reverzibilní

IAA-myo-inositol, IAA-glukóza, IAA-AMK, methylester-IAA

### (B) Ireverzibilní

IAA-aspartát, IAA-glutamát

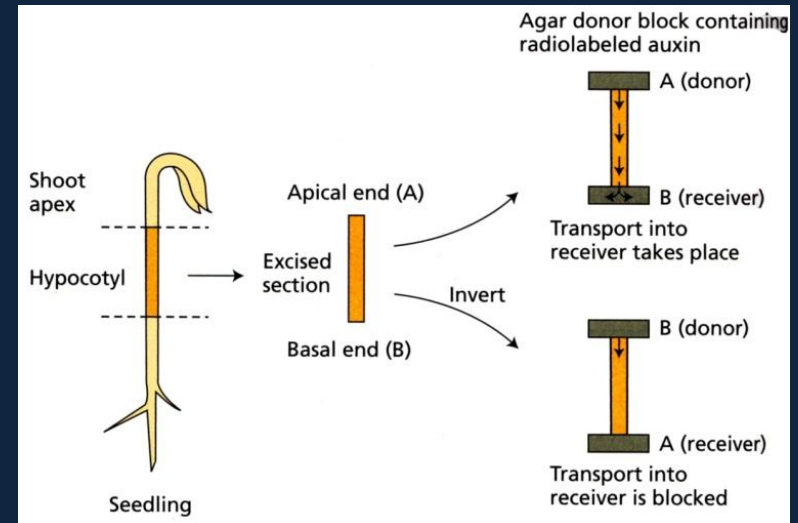


**Degradace:** oxidace IAA (substrát – IAA i ireverzibilní konjugáty)



## Transport auxinu

- Polární (bazipetální) z apexu, koleoptile, řapíky; v kořeni převládá akropetální (není ovlivněn orientací)
- Buněčný orientovaný (převládá), méně apoplastický, xylémový i floémový transport



### Inhibitory transportu

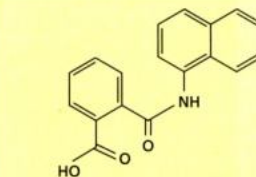
NPA: kys. 1-N-naftylftalamová

TIBA: kys. 2,3,5-triiododbenzoová

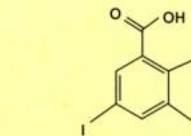
NOA: kys. 1-naftoxyoctová

quercetin, genistein

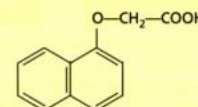
#### Auxin transport inhibitors not found in plants



NPA (1-N-naphthylphthalamic acid)

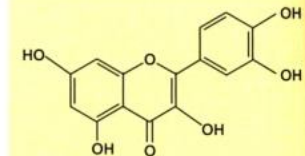


TIBA (2,3,5-triiodobenzoic acid)

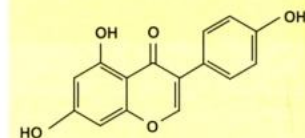


1-NOA (1-naphthoxyacetic acid)

#### Naturally occurring auxin transport inhibitors



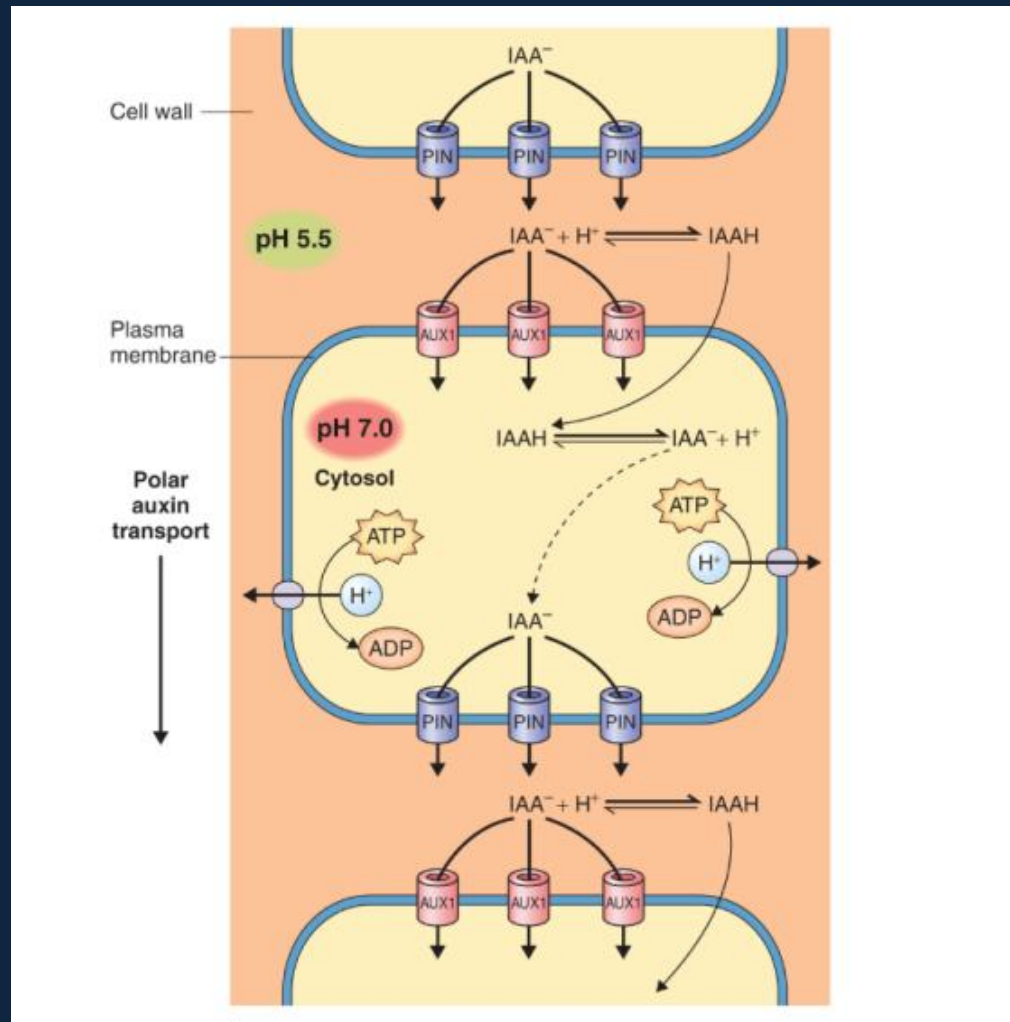
Quercetin (flavonol)



Genistein

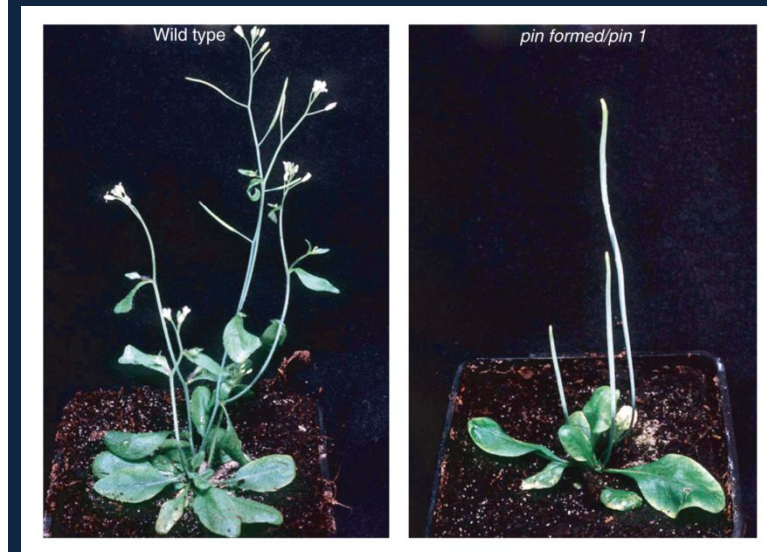
## Příjem (influx)

- Pasivní (difúze IAAH, lipofilní)
- Aktivní permeáza - AUX1 přenašeč (symport  $2H^+/IAA^-$ )



## Výdej (efflux)

- Aktivní (přenašeče: PIN proteiny, P-glykoproteiny (ATP-závislý přenašeč))

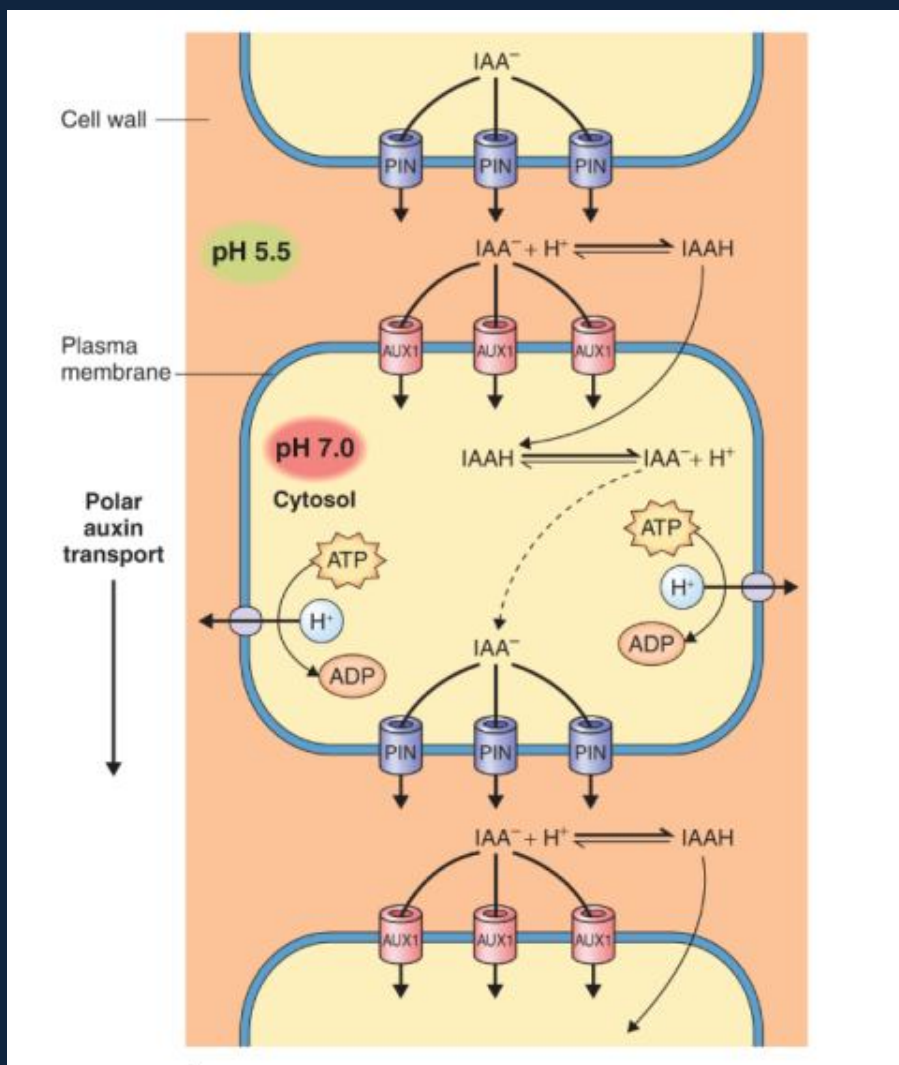


WT

*pin1* mutant



## Buněčné základy polárního transportu auxinu John Raven and Mary Helen Goldsmith



1. V cytoplasmě (pH 7) se auxin vyskytuje v ionizované formě. Když se v této formě dostane do prostředí buněčné stěny (pH 5), váže na sebe H<sup>+</sup> a stává se elektricky neutrálním (IAAH).

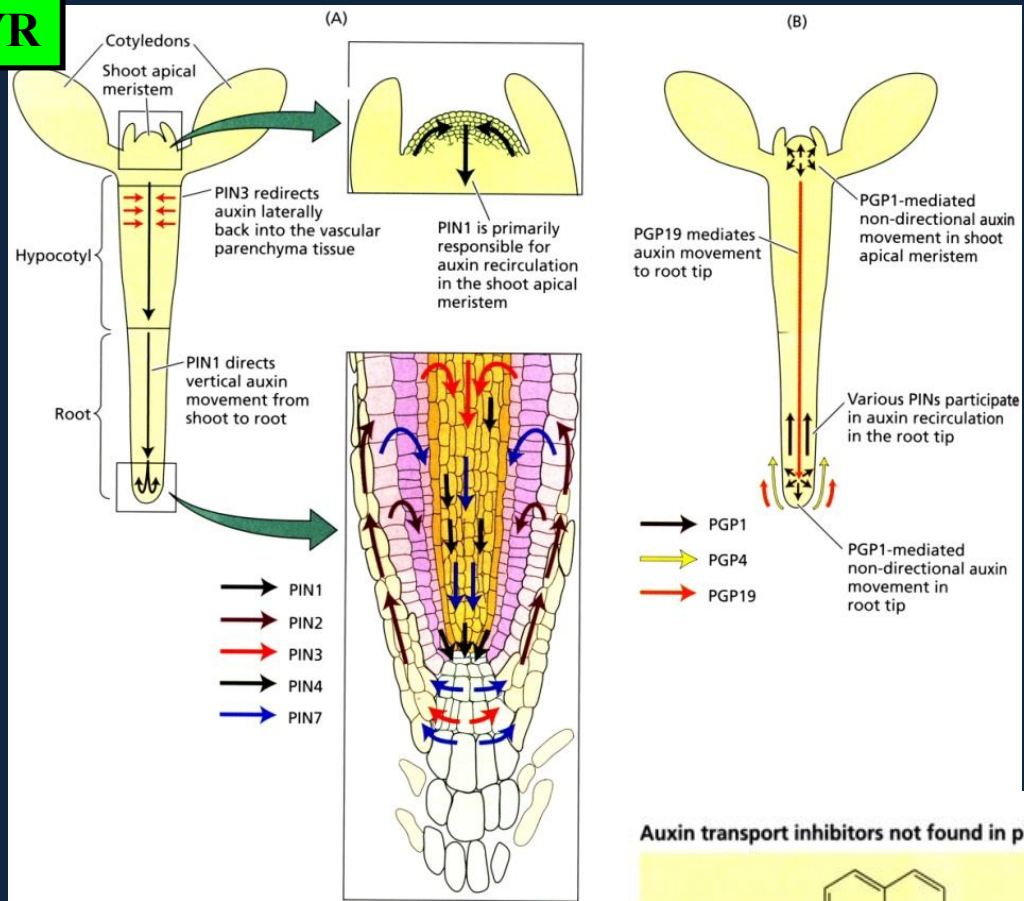
2. Jako relativně malá a neutrální molekula je auxin schopen procházet přes plazmatickou membránu dovnitř buňky.

3. Když se neutrální auxin dostane dovnitř buňky s pH 7, ionizuje se. V této formě se auxin po určitou dobu akumuluje v buňce, protože v ionizované formě má menší schopnost prostupovat plazmatickou membránou než stejně velké neutrální molekuly.

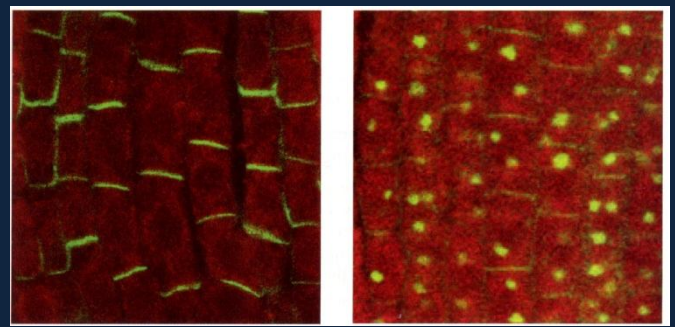
4. Uvolněný H<sup>+</sup> je transportován protonovou pumpou do apoplastu (prostor buněčné stěny).

5. Anionty auxinu se dostávají z buňky pomocí membránového proteinového přenašeče. Protonová pumpa udržuje transport auxinu tím, že generuje membránový potenciál, který favorizuje transport aniontů auxinu ven z buňky.

**RVR**



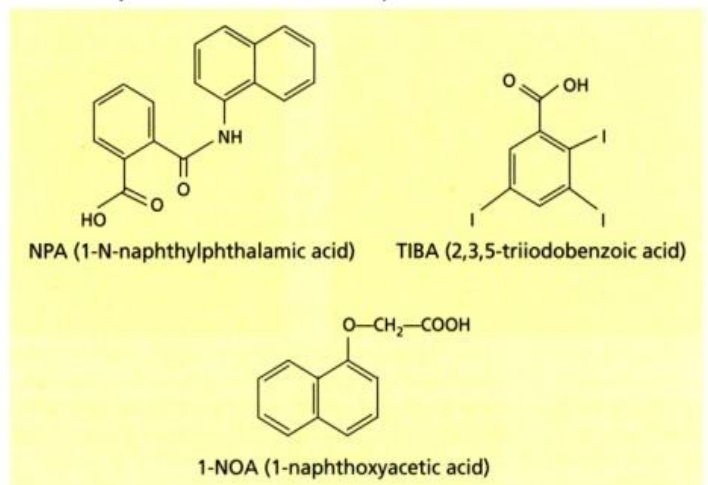
**Inhibitory transportu blokují sekreci PIN1 proteinu**



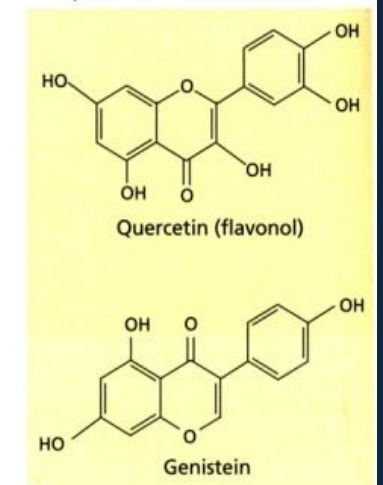
**Akumulace PIN1 na plazmatické membráně**      **Akumulace PIN1 v jádře**

**NPA: kys. 1-N-naftylftalamová**  
**TIBA: kys. 2,3,5-triiododbenzoová**  
**NOA: kys. 1-naftoxyoctová**  
**quercetin, genistein**

**Auxin transport inhibitors not found in plants**



**Naturally occurring auxin transport inhibitors**



## Signální dráhy auxinů

### Auxinový receptor TIR1



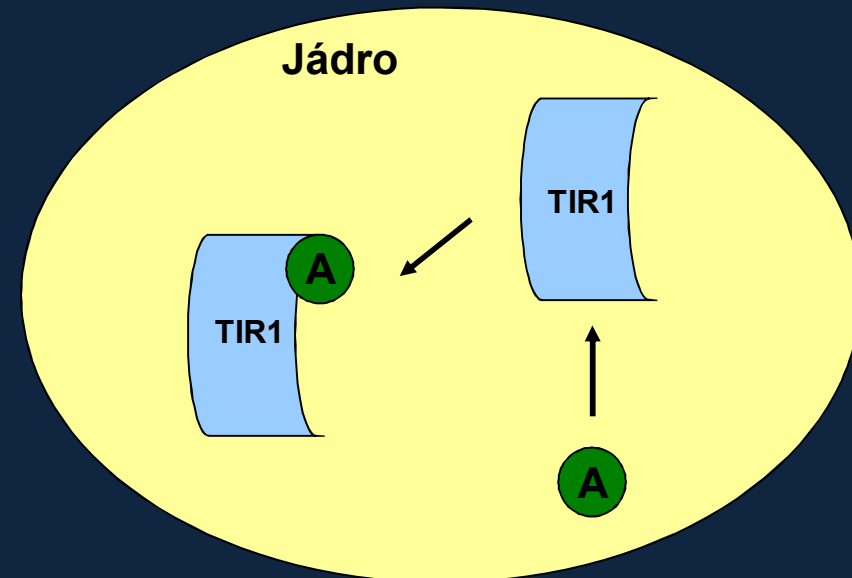
### Intracelulární receptor TIR1 (Transport Inhibitor Response 1) u *Arabidopsis*

Kepinski and Leyser 2005

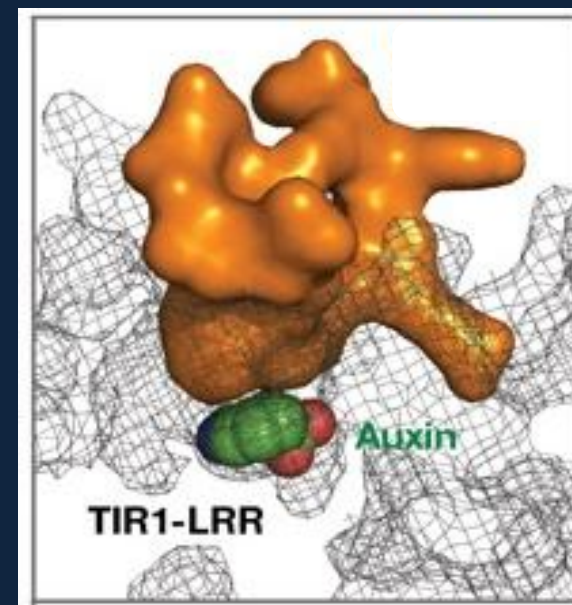
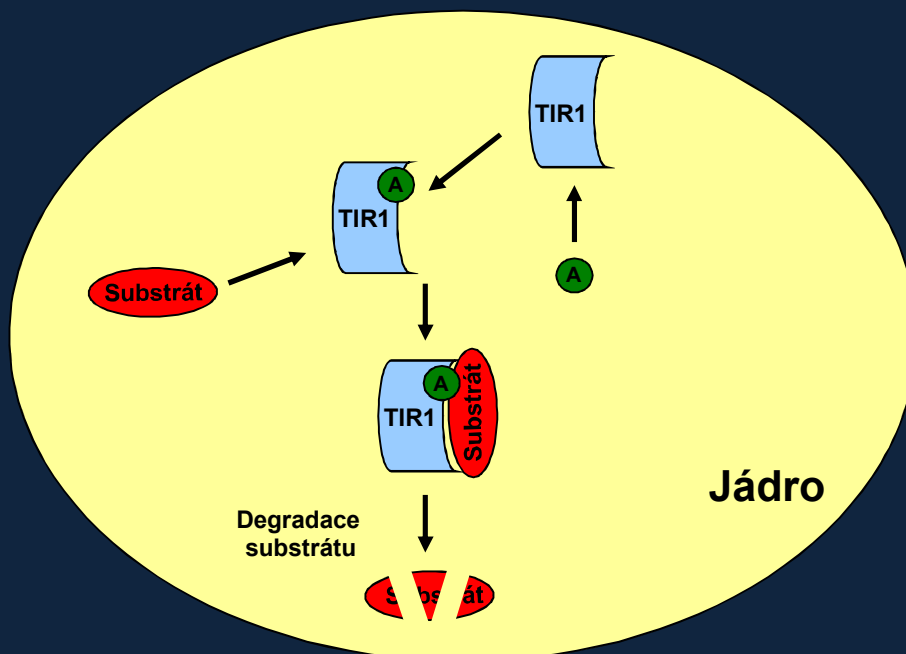
Dharmasiri *et al.* 2005

Auxin se váže v jádře přímo k TIR1

- 1) První intracelulární auxinový receptor
- 2) Receptor zprostředkující transkripční reakce k auxinu



## F-box – zprostředkuje transkripční reakce k auxinu

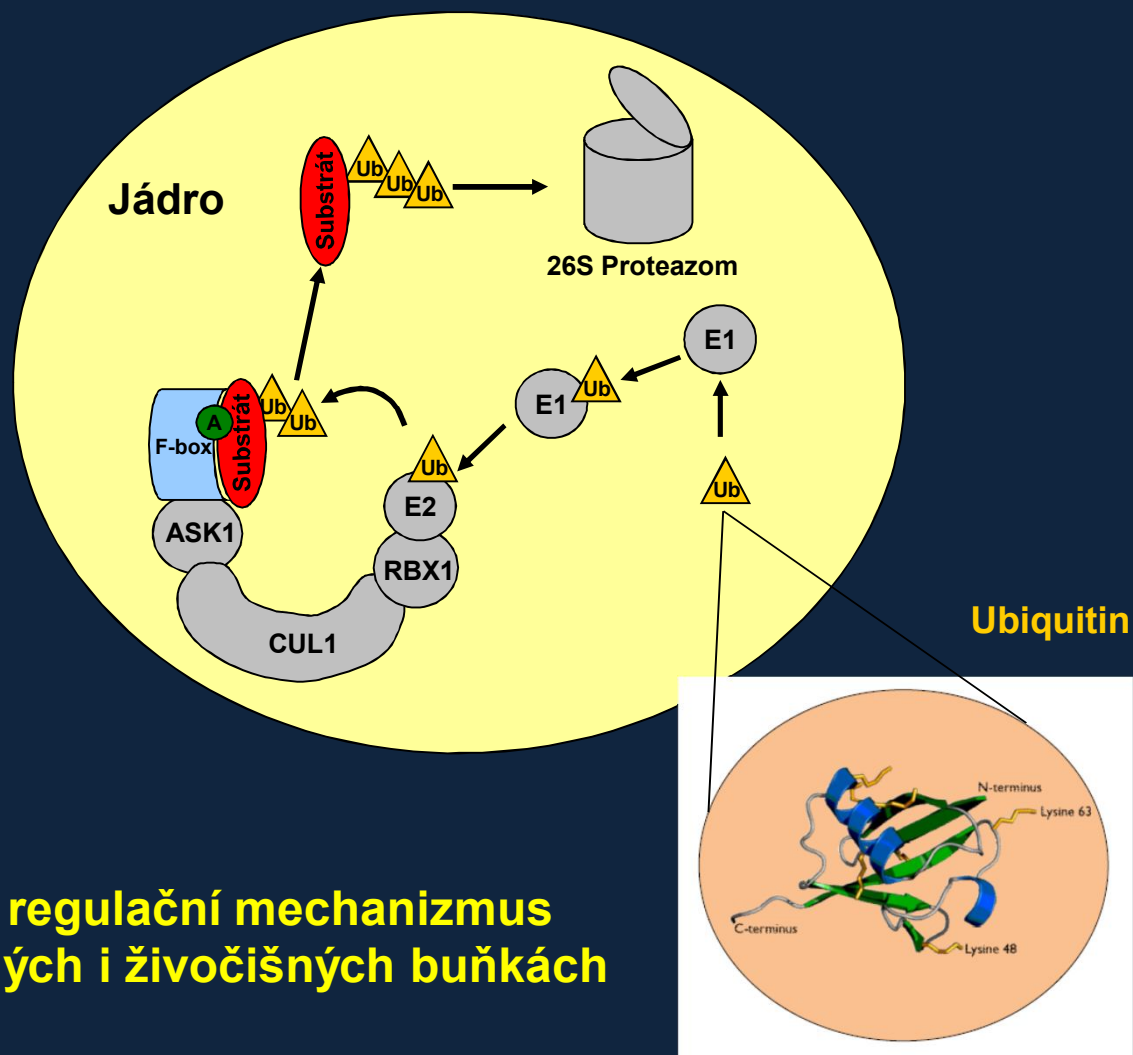
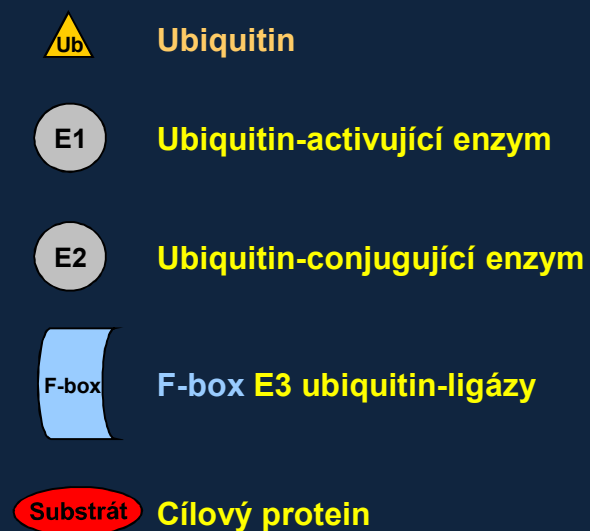


2010 American Society of Plant Biologists

Vazba auxinu k TIR1 umožňuje vazbu substrátového proteinu (= represoru transkripce auxinem-indukovaných genů). To vede k degradaci substrátového proteinu a tak k uvolnění exprese auxinem-indukovaných genů.

Auxin funguje jako „lepidlo“ umožňující spojení TIR1 se substrátem

Substrát je poly-ubiquitinován a směřován do 26S proteazomu, kde je degradován.



**Ubiquitinace - nezbytný regulační mechanismus v rostlinných i živočišných buňkách**

## Signalizace prostřednictvím jaderného receptoru TIR1

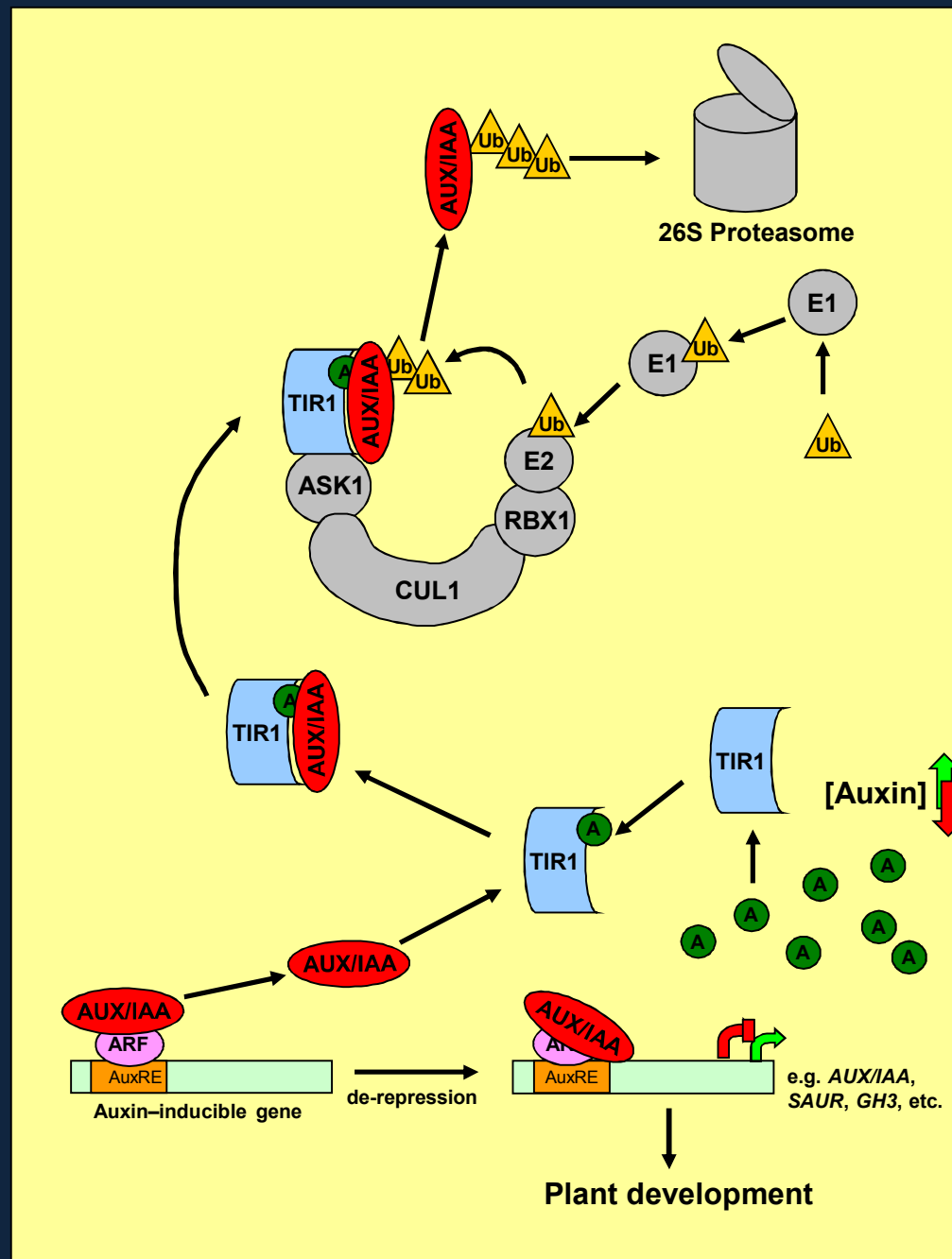
**A** – auxin

**TIR1** – F-box podjednotka E3-ubiquitin ligázy; auxinový receptor

**AUX/IAA** – represor transkripce auxinem-indukovaných genů

**ARF** – transkripční faktor (aktivátor exprese genů)

Auxinem-indukované geny obsahují  
**AuxRE** = auxin responsivní element

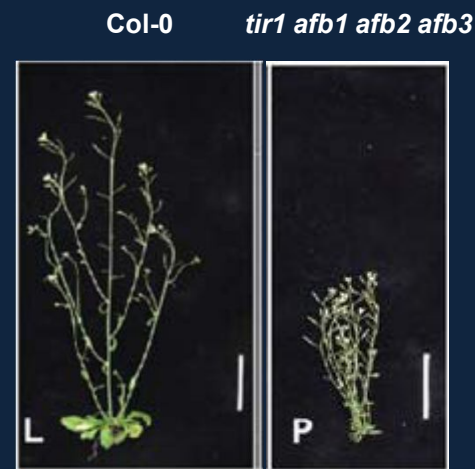
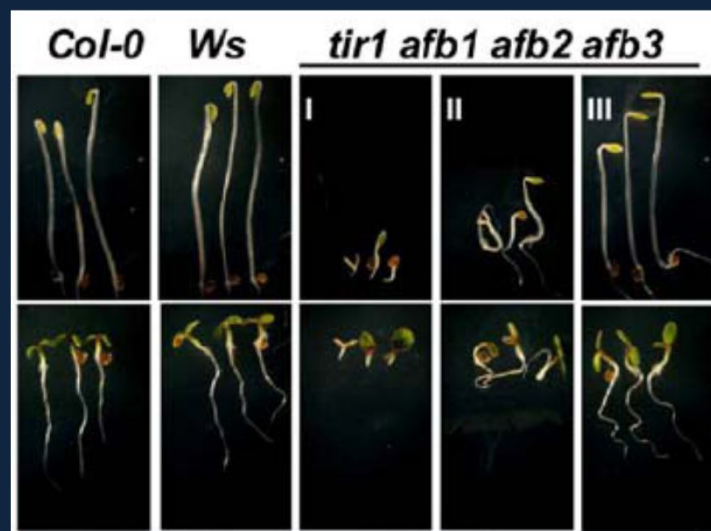




## Signální dráha receptoru TIR1 – důležitá, ale ne jediná, dráha pro funkci auxinu

Homology TIR1: AFB1, AFB2, AFB3 – stejná funkce jako TIR1

Avšak: 1) Čtyřnásobný mutant – stále funkční rostlina → Receptory TIR1 a AFB nejsou nepostradatelné



Dharmasiri et al. 2005b

2)

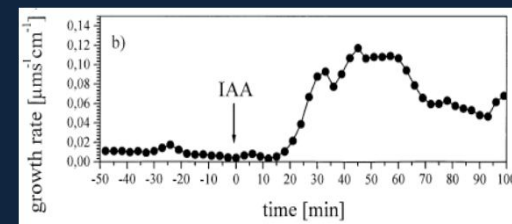
Auxin indukuje prodlužování buněk s lag fází 8-15 min => rychlá reakce vylučující zapojení TIR1, tedy transkripci genů či syntézu proteinů



Auxin funguje prostřednictvím signální dráhy s jiným receptorem



Receptor  
ABP1



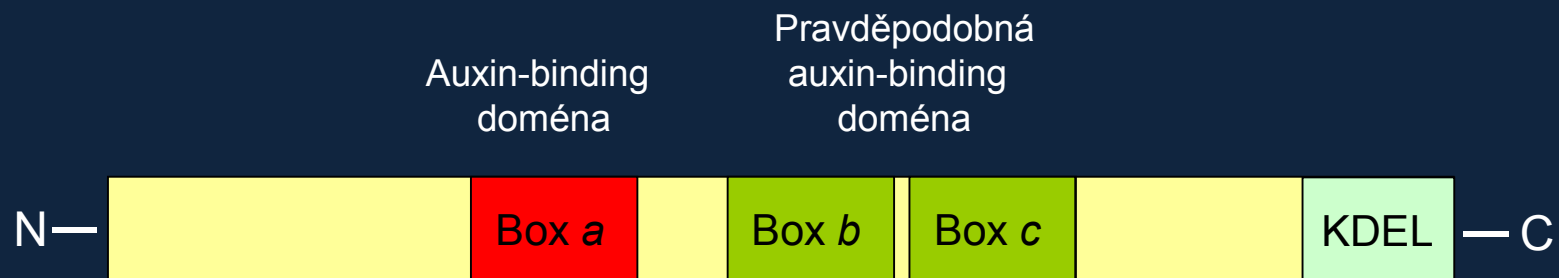
Steffens and Lüthen 2000

## Auxinový receptor ABP1

1972 – identifikace ABP1 (Auxin-Binding Protein 1) v izolovaných membránách z buněk kukuřičné koleoptile; vazba radioaktivního auxinu v membráně

1985 – izolace proteinu ABP1 z kukuřice; velikost 22 kD

Konec 80. let – klonování ABP1 a struktura ABP1



Auxin se váže k plazmamembránové frakci

ALE

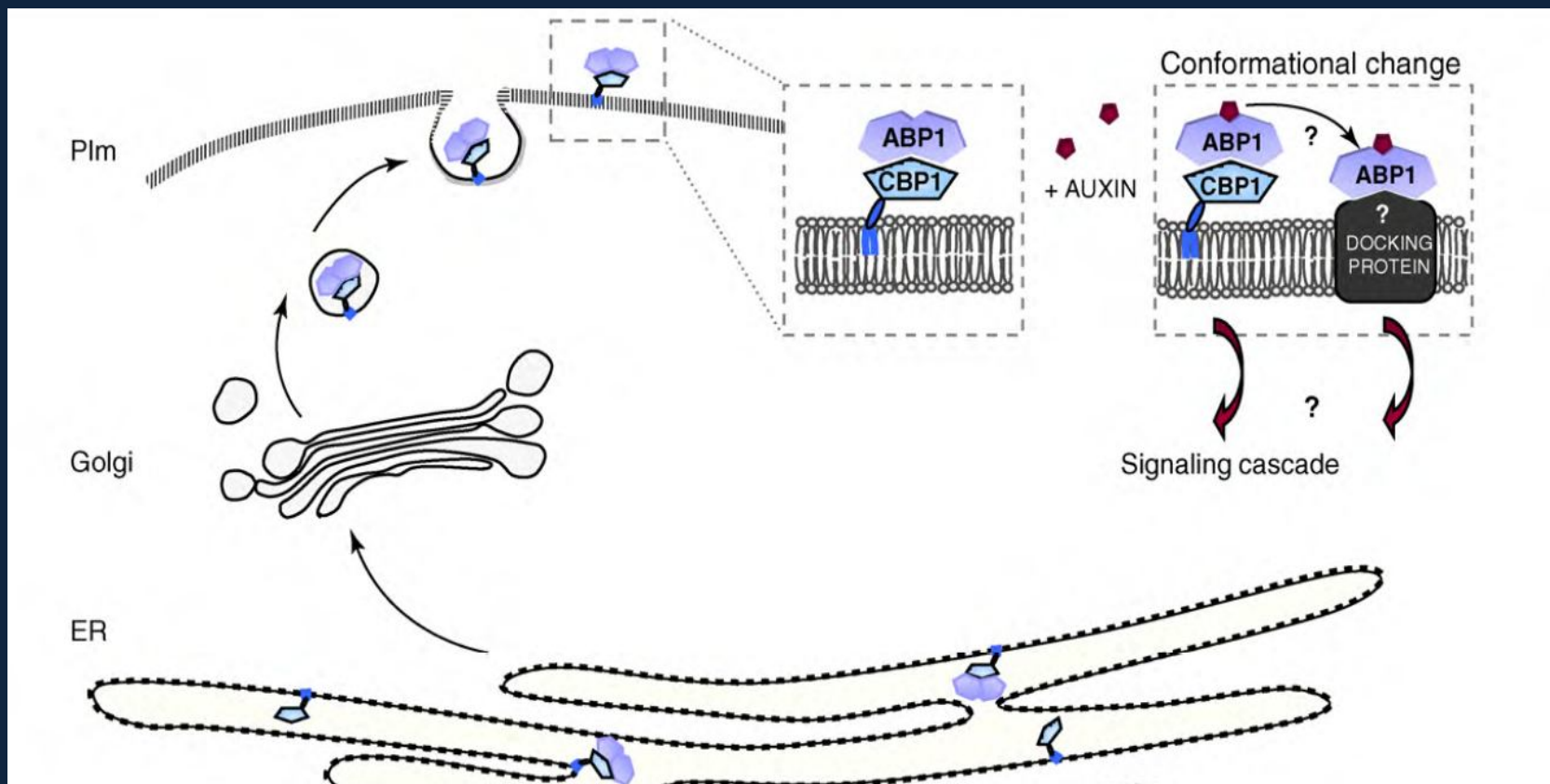
Protein ABP1 nemá transmembránovou doménu



Navržen model „Docking“ proteinu

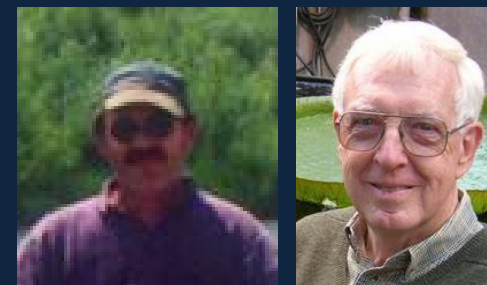


## Transport ABP1 z endoplazmatického retikula do apoplastu



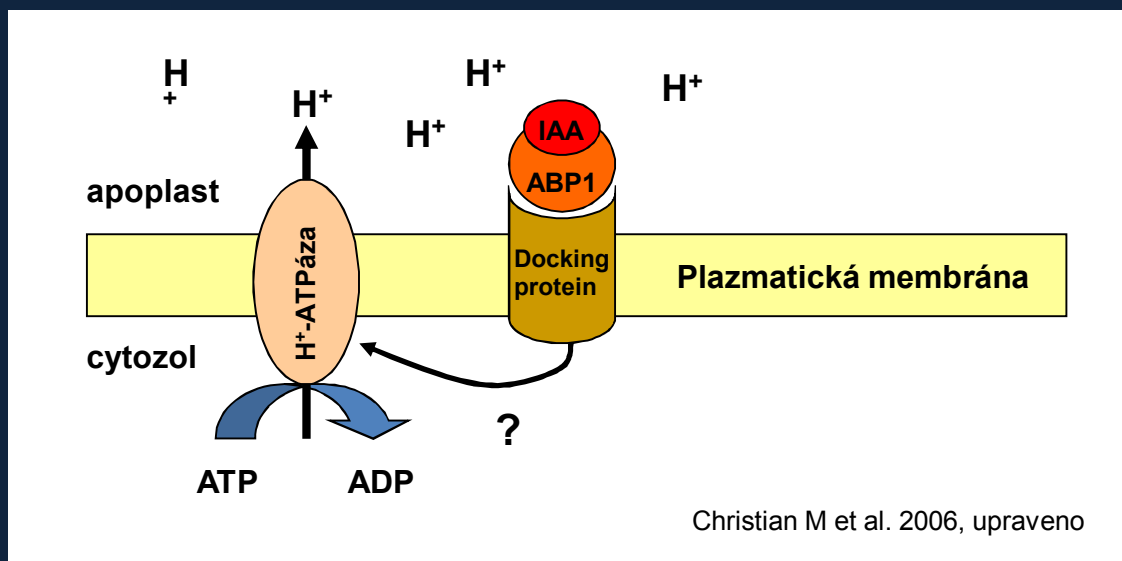
Většina ABP1 je lokalizována v endoplazmatickém retikulu (ER). Malá část ABP1 je pomocí vezikul sekretována zatím neznámým mechanismem do apoplastu a přichycena na plazmatickou membránu (Plm). Sekrece ABP1 byla dokázána v různých typech buněčných kultur. ABP1 se pravidelně nalézá i v kultivačním médiu. Brefeldin - inhibitor vesikulárního transportu - inhibuje sekreci ABP1 do kultivačního media.

# Teorie kyselého růstu, protonová pumpa a draslíkové kanály



Rayle D and Cleland R (1970)

Auxin → Exkrece  $H^+$  do apoplastu → Snížení pH v apoplastu  
 Aktivace enzymů (expansinů) rozvolňujících buněčnou stěnu



Vazba auxinu k ABP1



Stimulace aktivity  
 $H^+$ -ATPázy

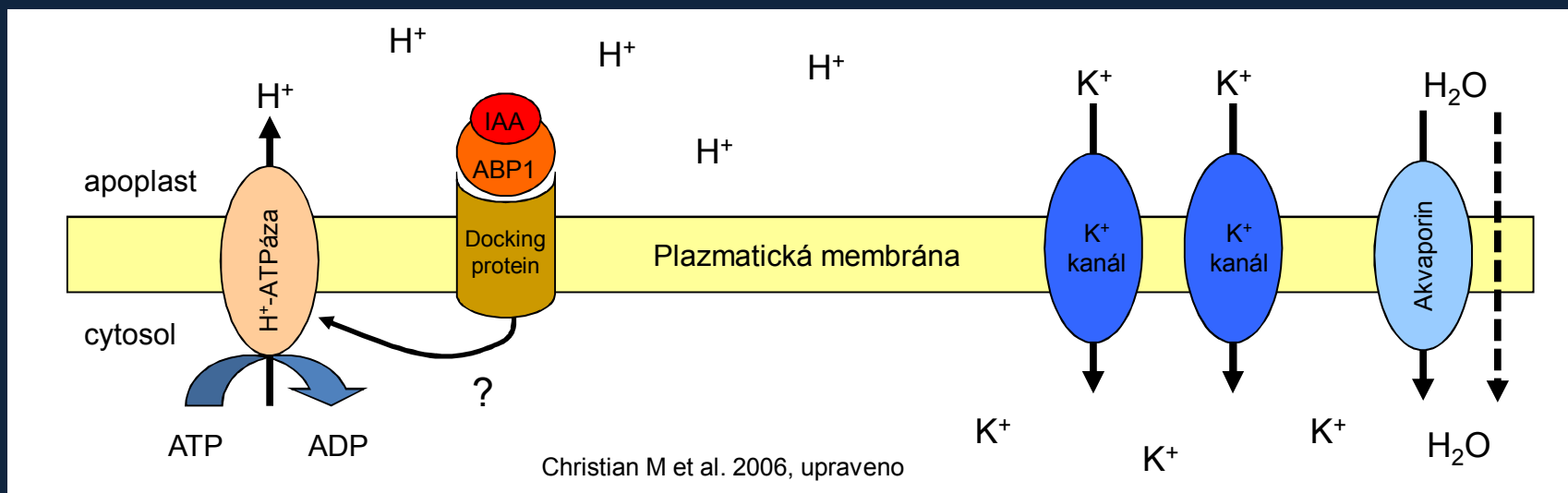


Hyperpolarizace membrány  
Acidifikace apoplastu

Podmínkou růstu buňky je turgor. Auxin sám nezvyšuje turgorový tlak.

Akumulace  $H^+$  v apoplastu  $\rightarrow$  Kompenzace náboje v cytosolu

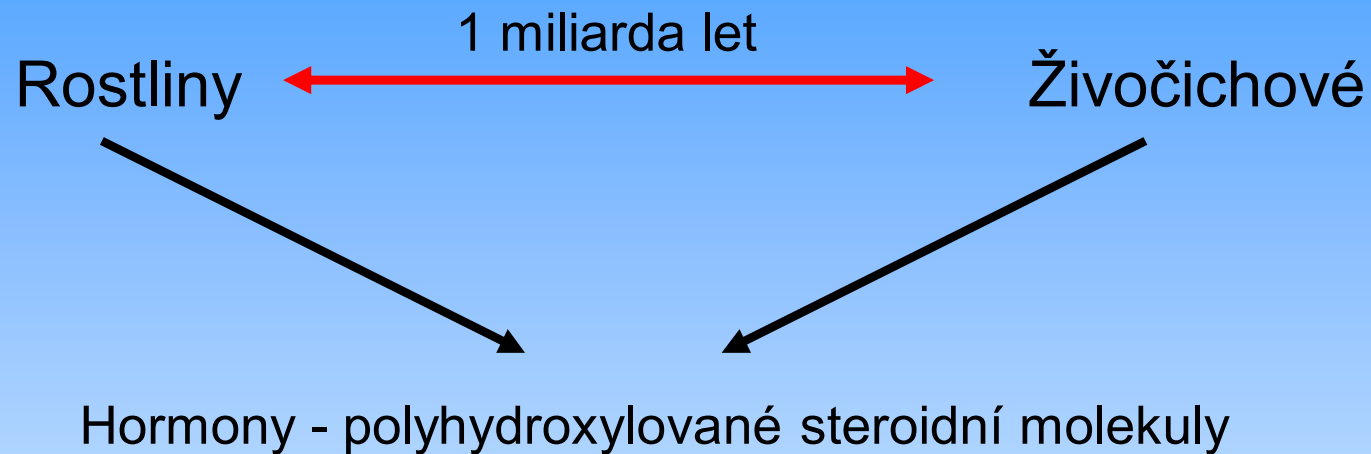
$K^+$  kanály transportující  $K^+$  dovnitř buňky



Akumulace  $K^+$  v cytosolu  $\rightarrow$  Transport  $H_2O$  do buňky  $\rightarrow$  Turgor  $\rightarrow$  RŮST

Přítomnost  $K^+$  : podmínka udržení trvalé acidifikace a trvalého růstu

## b) Brasinosteroidy

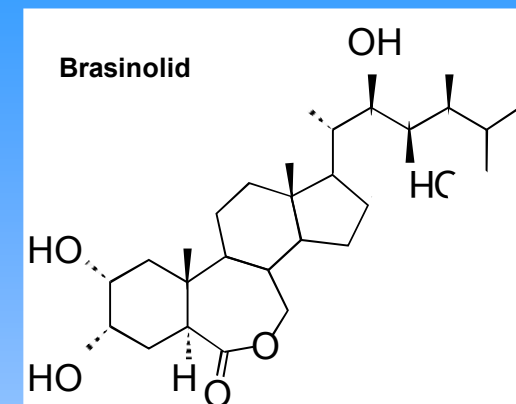
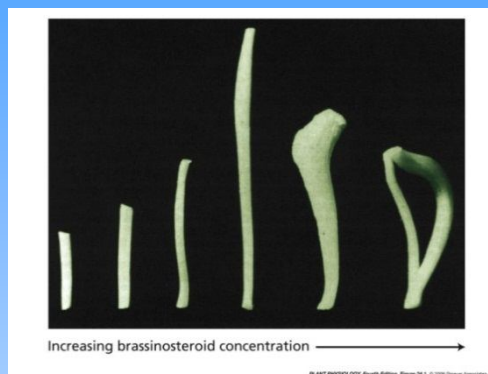


- BR a steroidy kontrolují:**
- regulaci genové exprese
  - buněčné dělení
  - expanzi buněk
  - diferenciaci buněk
  - PCD
  - homeostázu

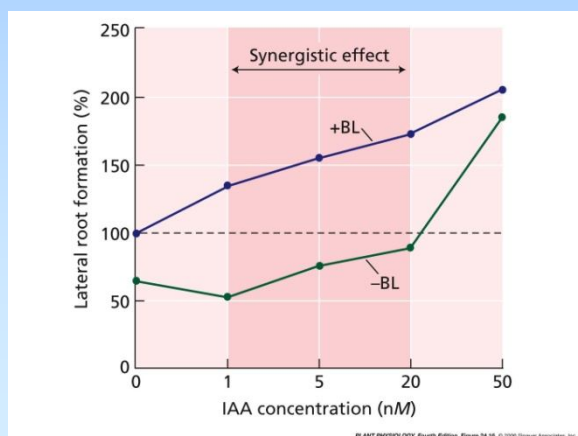
## 1979 – brassinolid (BL) – koncový produkt biosyntetické dráhy

- stimuluje prodlužování stonku
- stimuluje prodlužování kořene (nízké koncentrace)
- inhibuje prodlužování kořene (vysoké koncentrace)
- stimuluje klíčení semen a růst listů

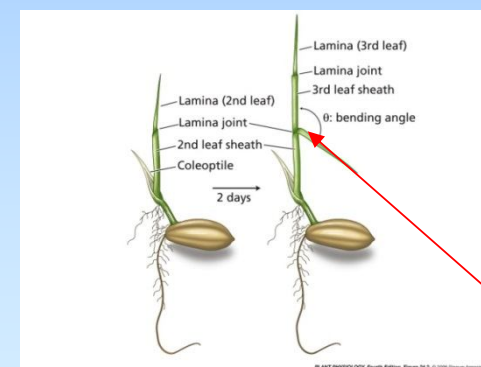
Prodlužování 2. internodu stonku fazole



## Brassinosteroidy a auxiny mají synergické účinky. Stimulace:



- tvorby laterálních kořenů
- prodlužování stonku
- růstu pylové láčky
- ohýbání listů a epinastie
- aktivity protonové pumpy
- diferenciacce xylému



Ohýbání listů

Auxin – rychlý účinek      Brassinolid – pomalý účinek

**Použití brasinosteroidů v zemědělství:**

- zvyšování výnosů
- stimulace rezistence ke stresům

**Výskyt:**

- ve všech testovaných pletivech
- nejvíce v apikálních částech stonků

**Brasinosteroidy nejsou pravděpodobně transportovány na dlouhé vzdálenosti**





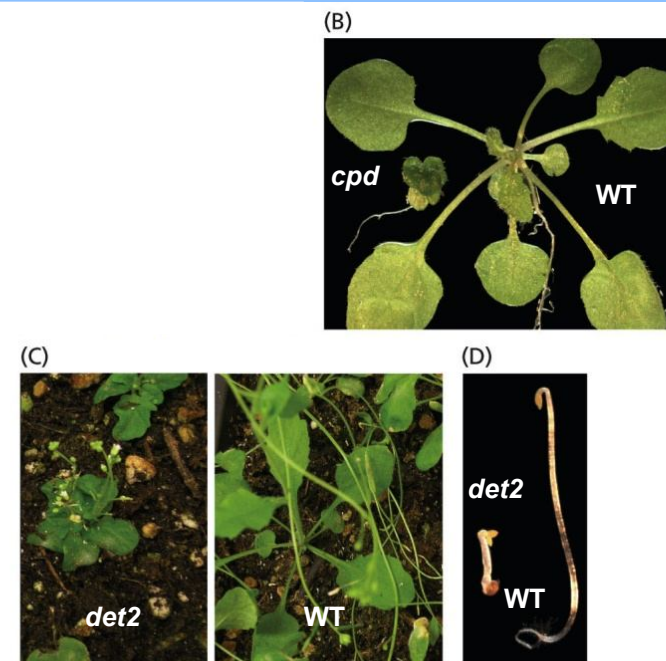
**Genetický přístup** – fyziologická, biochemická a molekulární charakterizace mutantů

Selekce mutantů s redukovanou biosyntézou BR (rajče, hrách, rýže, *Arabidopsis*)

Výrazný fenotyp mutantů; *Arabidopsis* – pleiotropický efekt mutací

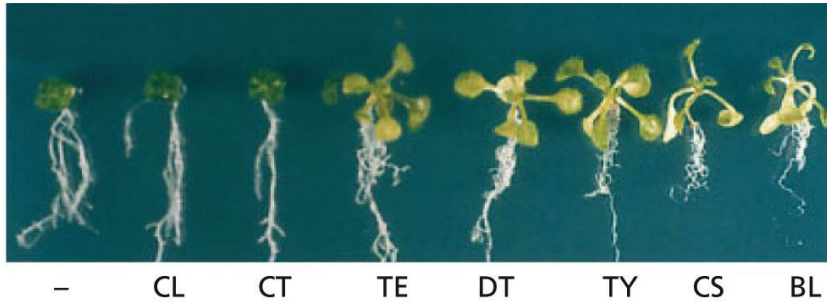
**Tma:** krátký vzrůst, tlustý hypokotyl, otevřené zvětšené dělohy, přítomnost primárních listových pupenů

**Světlo:** trpasličí vzrůst, tmavozelená barva, pylová sterilita, zpožděná senescence chloroplastů a listů, změny v reakci ke světlu.

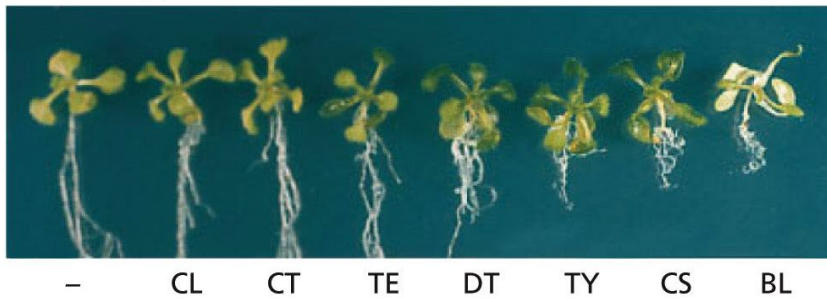


### Aplikace exogenních BR vede k normalizaci mutantních fenotypů

(A) *cpd*



(B) Wild-type



CL - campesterol

CT - cathasterone

TE - teasterone

DT - dehydroteasterone

TY - typhasterol

CS - castasterone

BL - brassinolide

## Biosyntéza brasinosteroidů

**Kontrolní mechanismy regulující hladinu BR:**

- regulace biosyntézy
- inaktivace BR
- zpětná vazba od signální dráhy

**Dvě biosyntetické dráhy BR**

-  ranná C-6 oxidace
-  pozdní C-6 oxidace

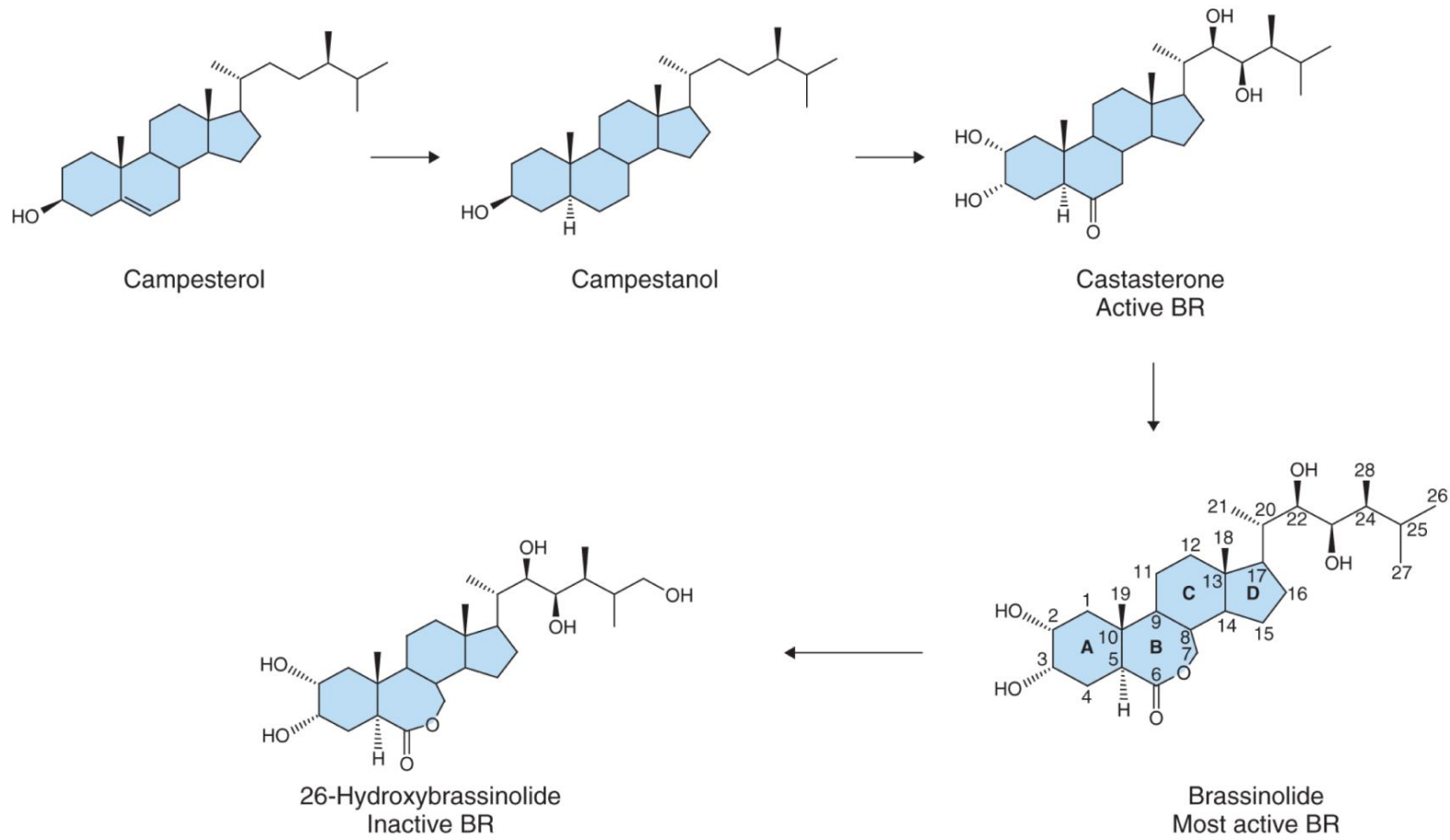
**Rostliny**

Campesterol  $\longrightarrow$   $\longrightarrow$   $\longrightarrow$   $\longrightarrow$   $\longrightarrow$  BR

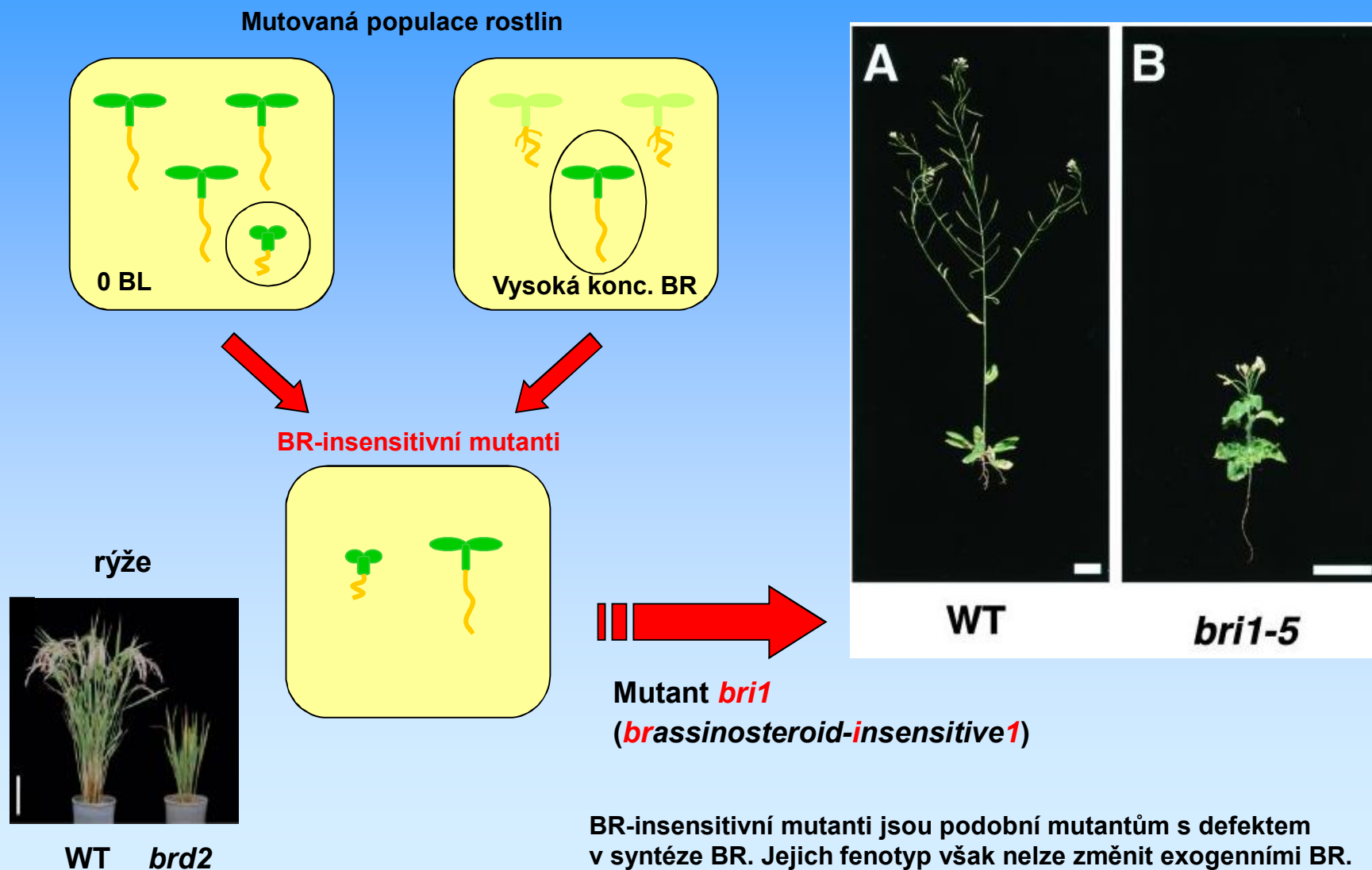
**Živočichové**

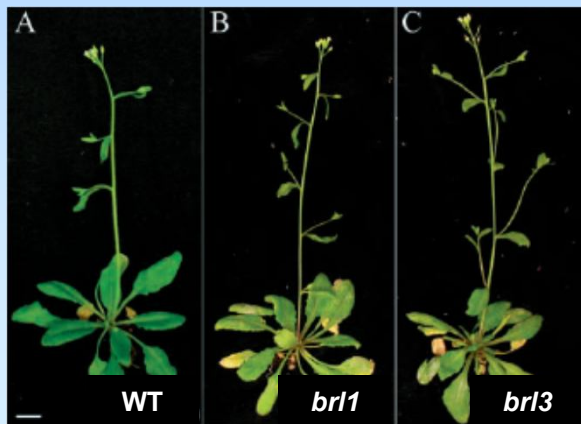
Cholesterol  $\longrightarrow$   $\longrightarrow$   $\longrightarrow$   $\longrightarrow$   $\longrightarrow$  Steroidy

**Klíčové kroky syntézy BR a steroidů jsou vysoce konzervované – přítomnost 5 $\alpha$ -reduktázy**



## Identifikace BR-insenzitivních mutantů





Laboratoř J. Chory – identifikace dalších trpasličích alel *bri1*



Plně funkční **BRI1** je pozitivním regulátorem signálních drah BR

Další geny této skupiny: *BRL1*, *BRL2* a *BRL3*

*BRL1* a *BRL3* se specificky exprimují ve vaskulárním systému => mutace *bri1* a *bri3* vedou k abnormálnímu poměru v diferenciaci floému a xylému.

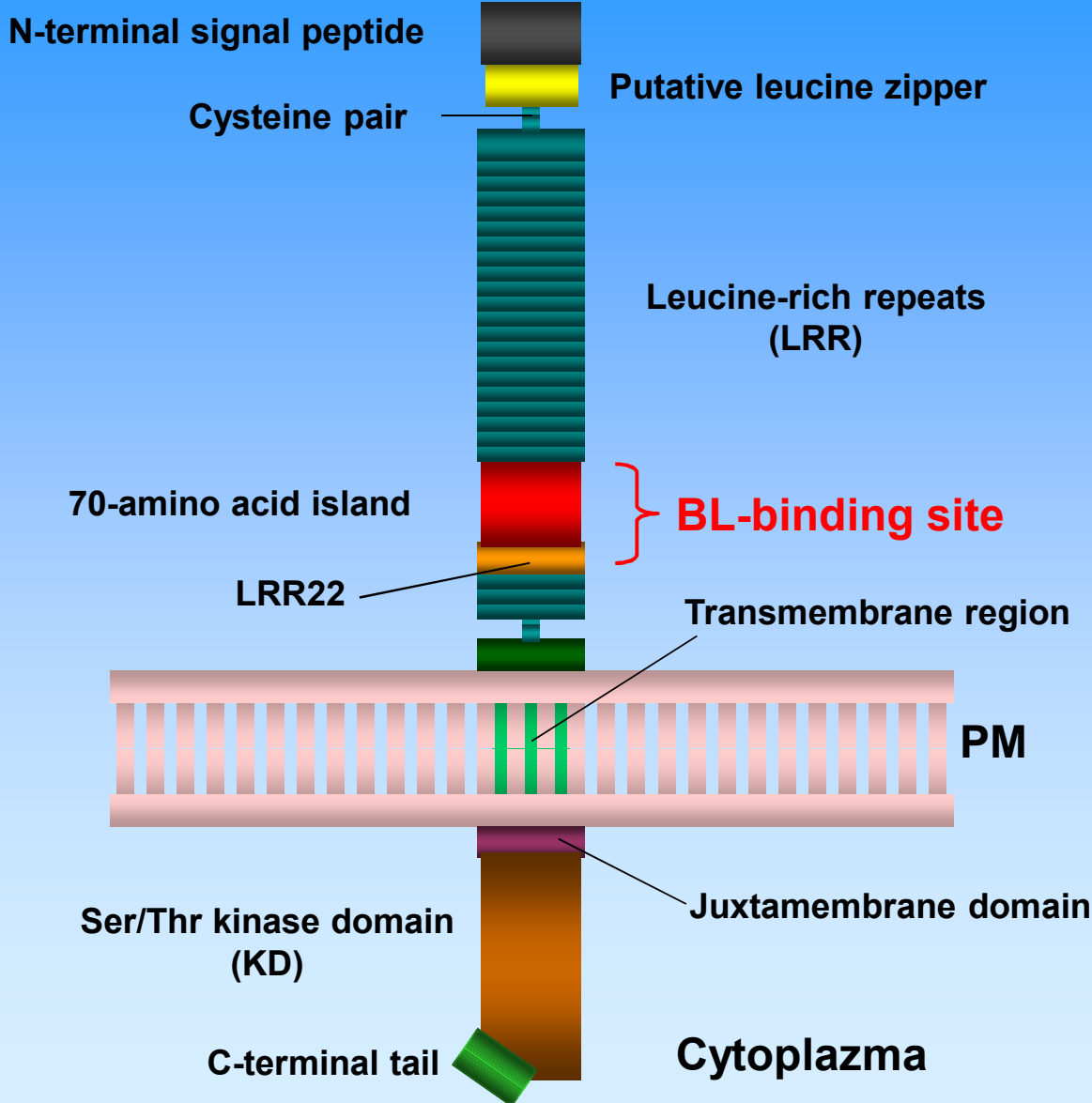
Trojitý mutant *bri1bri1bri3* - zesílený trpasličí vzrůst a vaskulární fenotyp



**Vazebné studie:** vysoká specifita vazby BL k BRI1 proteinu

**BRI1 je receptorem brasinosteroidů**

# Struktura receptoru BRI1

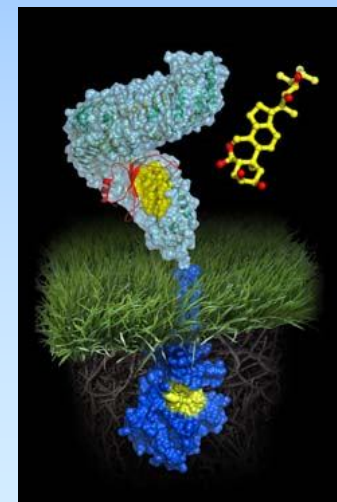
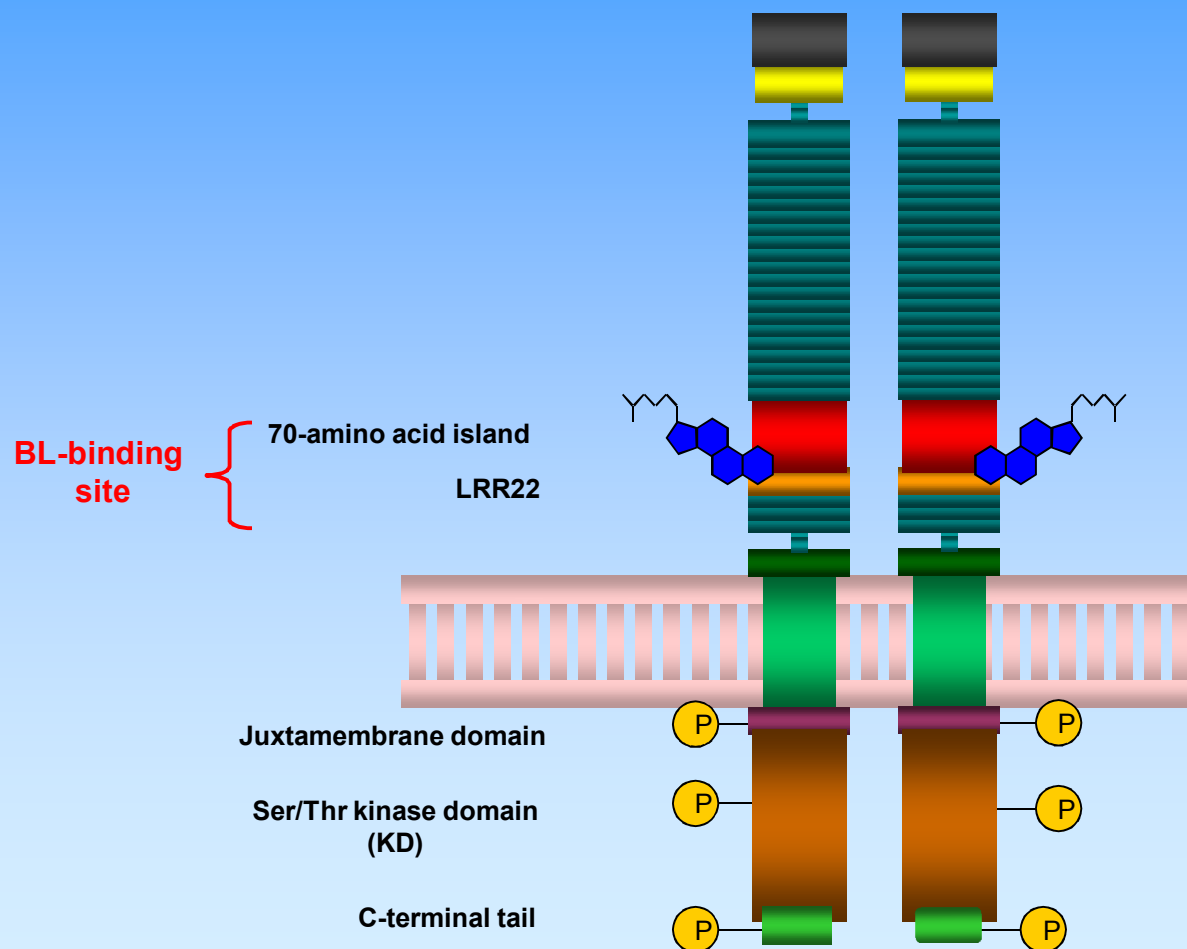


*BRI1* kóduje leucin-rich repeat (LRR) transmembránovou receptor-like kinázu (RLK) (LRR-RLK) (poziční klonování)

Lokalizace: plazma membrána (exprese BRI1-GFP)

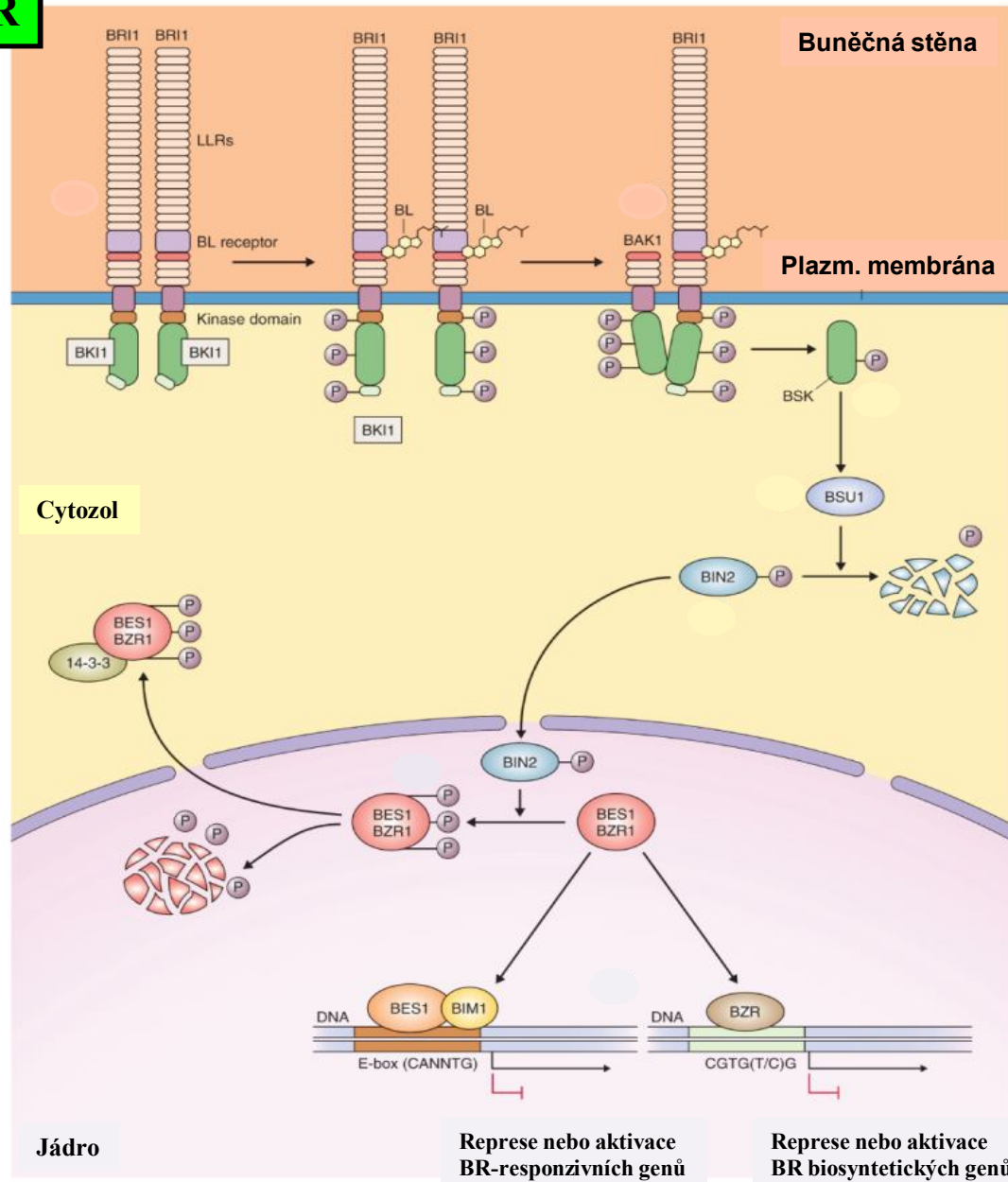
## Fosforylace receptoru BRI1

Analýza mutantů s defekty v BRI1 → Identifikace domén nutných pro přenos signálu



Hothorn M et al. (2011) Nature 474: 467- 471





Přítomnost BL = vazba BL k receptoru

Aktivovaný BRI1/BAK1 heterodimer inhibuje aktivitu BIN2 kinázy prostřednictvím **BSK** (Brassinosteroid-Signaling Kinases) a **BSU1** (bri1 **SU**pressor 1)

+

Přímá aktivita **BSU1**



Akumulace defosforylované formy BES1 a BZR1 v jádře

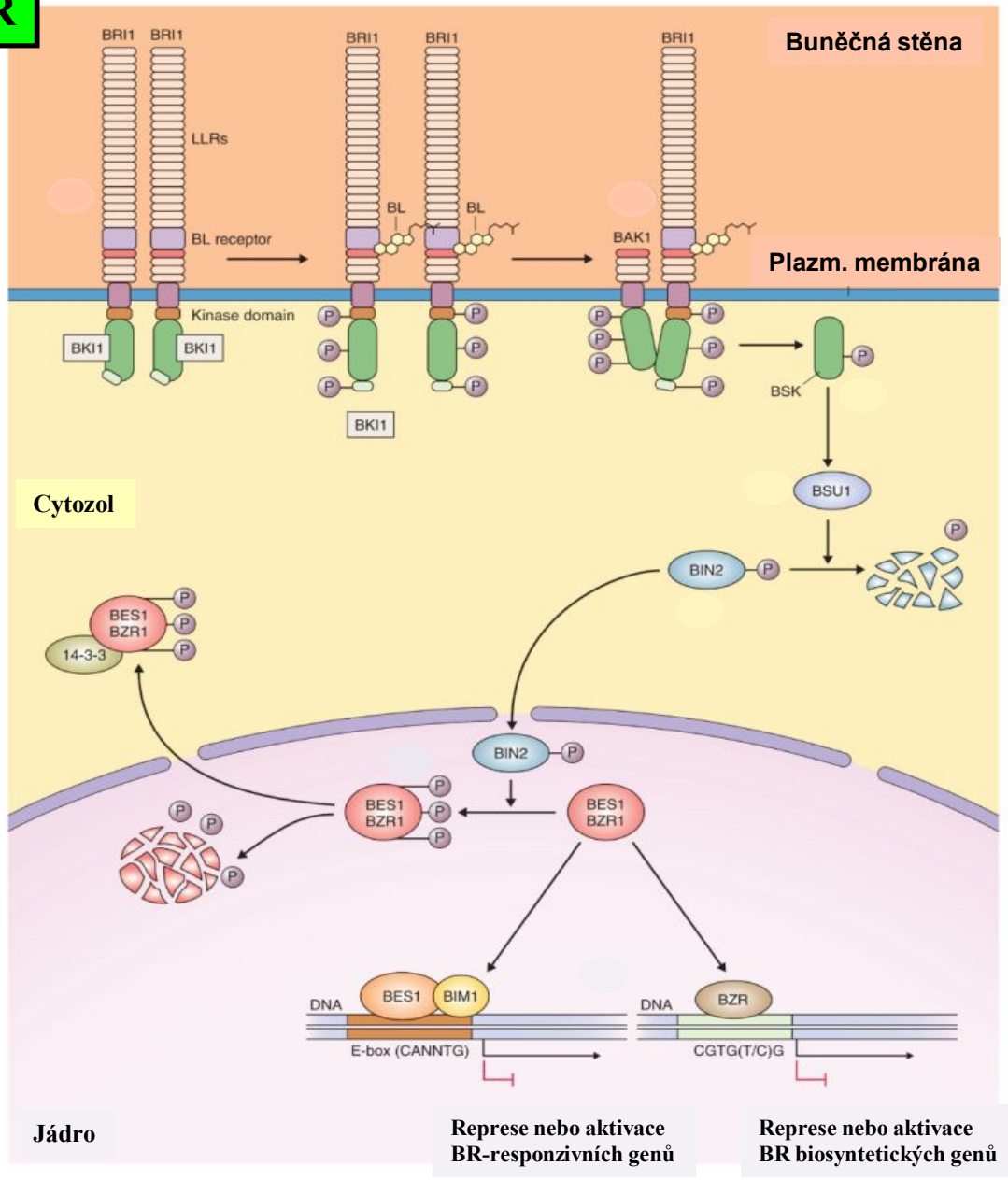
**BES1** (bri1-**EMS**-suppressor 1)

**BZR1** (brassinazole-resistant 1)

BES1 a BZR1 – transkripční faktory BR-indukovaných genů; krátká životnost; degradace 26S proteasome



**Aktivace či potlačení genové exprese**



**Absence BR:**

Fosforylace proteinů **BES1** a **BZR1** konstitutivně lokalizovaných v jádře.

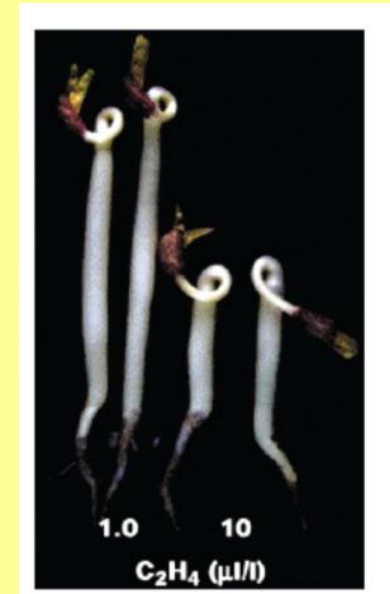
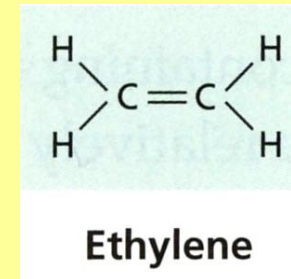
Fosforylované BES1 a BZR1 se nemohou vázat k DNA a jsou degradovány



**BR-indukované geny nejsou exprimovány**

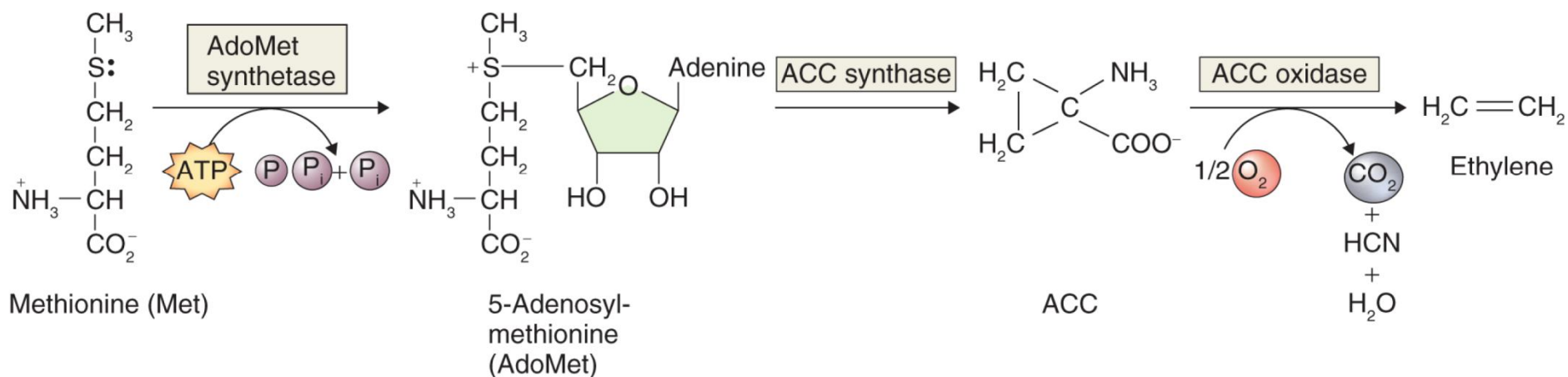
### c) Ethylen

- Plynný hormon
- D. Neljubov (1901) – inhibice etiolovaných rostlin svítiplynem; identifikoval ethylen-triple response.
- H. Cousins – 1910 – zjistil, že ethylen je přírodní látka – plyn skladovaných plodů pomerančů
- R. Gane (1934) – identifikoval ethylen chemicky jako produkt rostlinného metabolismu.
- Dlouho nebyl považován za rostlinný hormon – jeho efekty zprostředkovány auxinem, až po objevu plynové chromatografie (1958), rozpoznán jako fytohormon.



Triple response.

## Struktura, biosyntéza a měření ethylenu

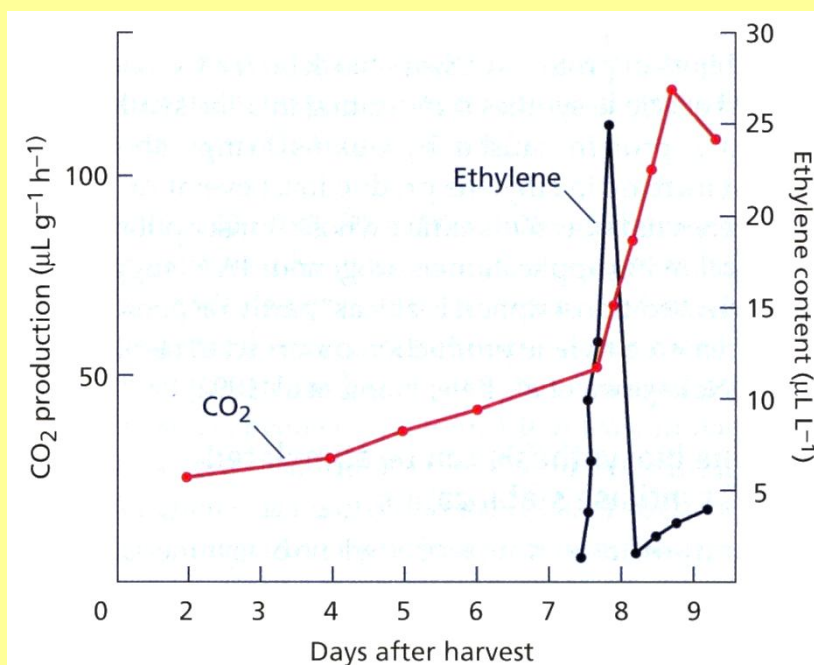


**Hořlavý plyn, snadno oxidovatelný  
a hydrolizovatelný!**

**Ethylen je produkován zejména zrajícími plody, při senescenci, poranění a fyziologických stresech, ale i houbami, kvasinkami a bakteriem (*E. coli*).  
Koncentrace ethylenu se pohybuje v ml/l.**

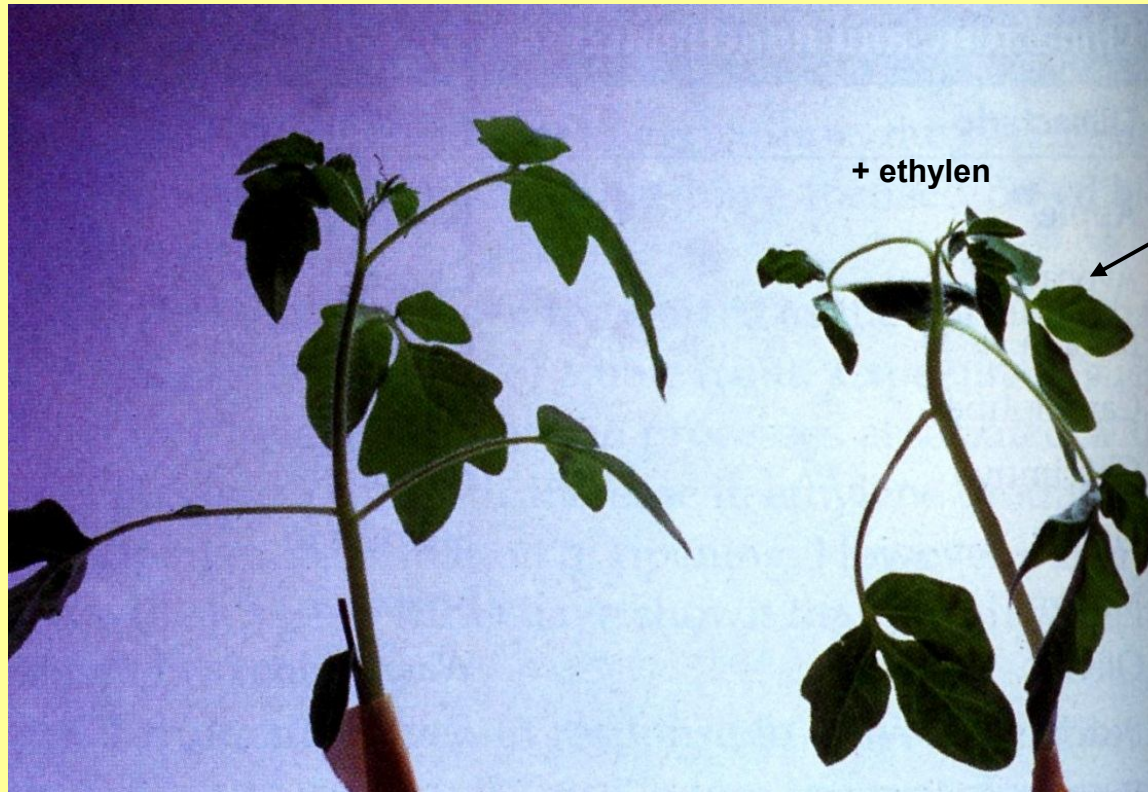
## Fyziologické funkce ethylenu

Ethylen stimuluje zrání některých plodů, tzv. **klimakterických**:  
banány, avokado, jablka, rajčata



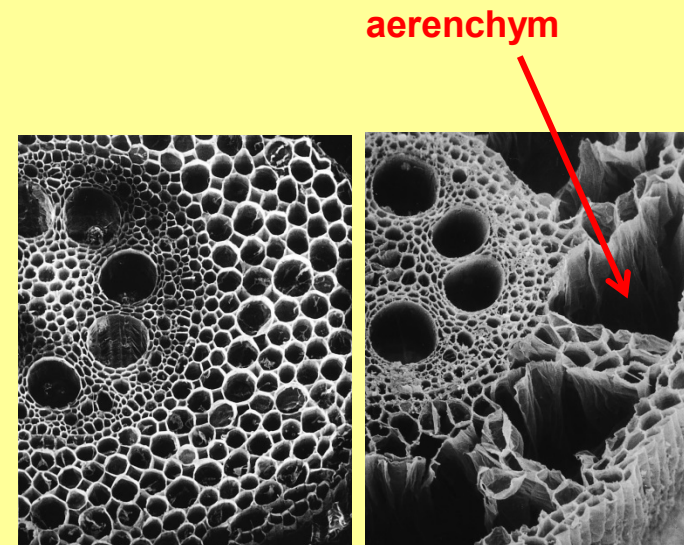
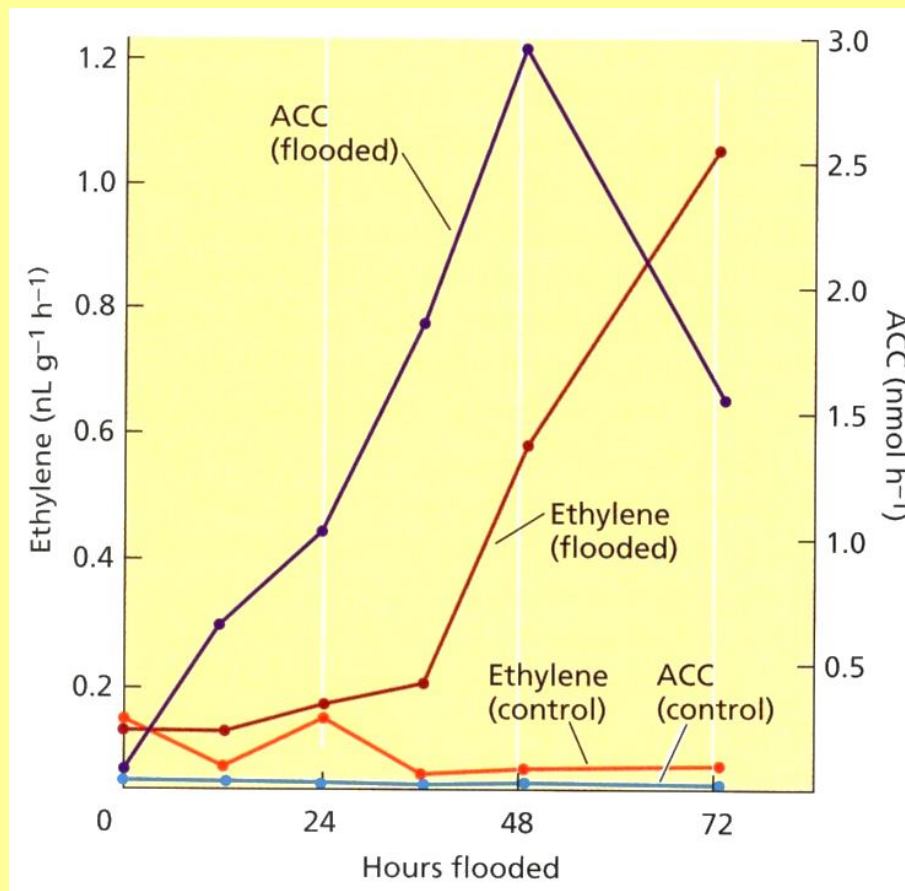
**Neklimakterické plody:** citrusy, ananas, vodní meloun,..

## Vliv ethyleny na listovou epinastii



Interakce auxin-ethylen → auxin indukuje produkci ethyleny

## Koncentrace ethylenu roste ve stresovaných rostlinách – např. po zaplavení



V ponořených rostlinách dochází v kořenech k hypoxii (nedostatek kyslíku). Hypoxie v kořenech stimuluje tvorbu etylénu. Etylén zvyšuje cytozolickou koncentraci  $\text{Ca}^{2+}$ , což indukuje smrt některých buněk v kortexu - vzniká **aerenchym**.

Transport ACC z kořenů, které jsou v anaerobních podmínkách.

Triple response = trojitá odezva u etiolovaných rostlin

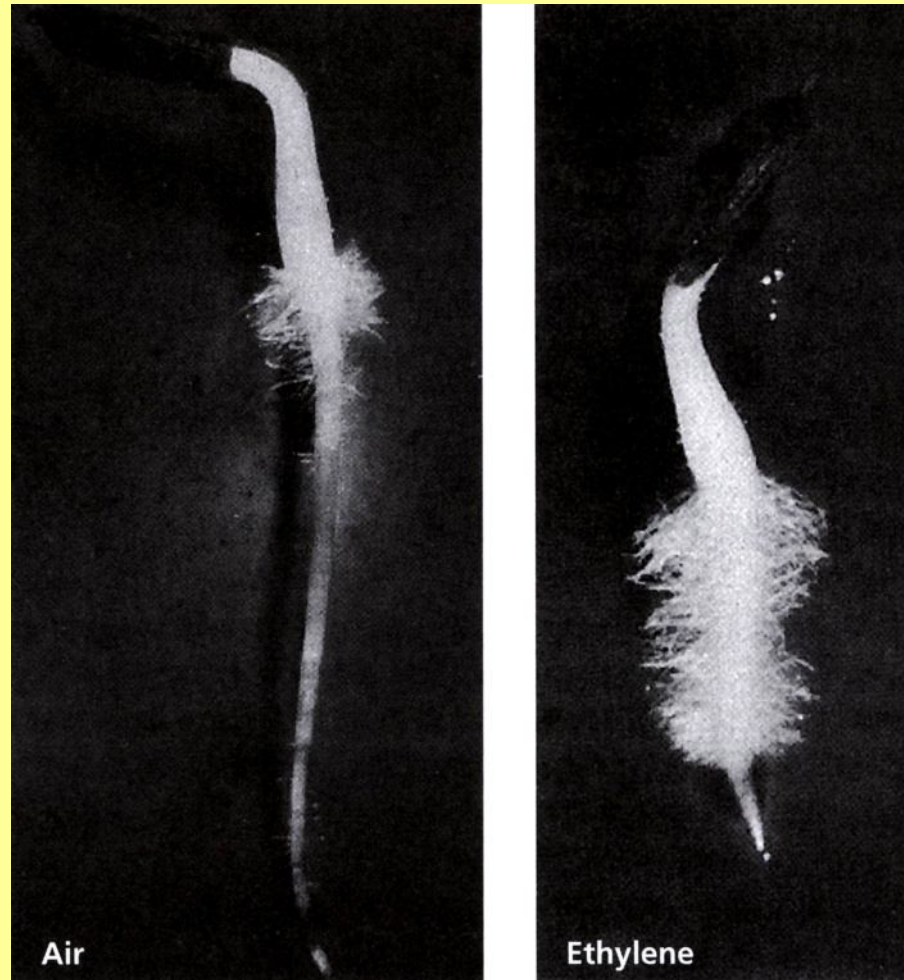


1. Ztloustití hypokotylu
2. Zkrácení hypokotylu
3. Vytvoření háčku

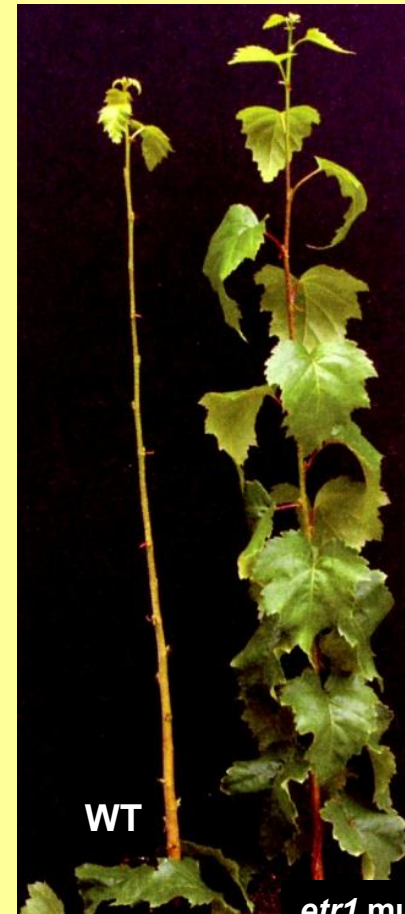
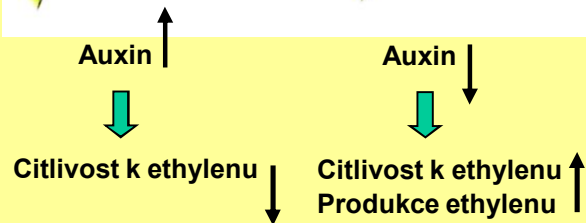
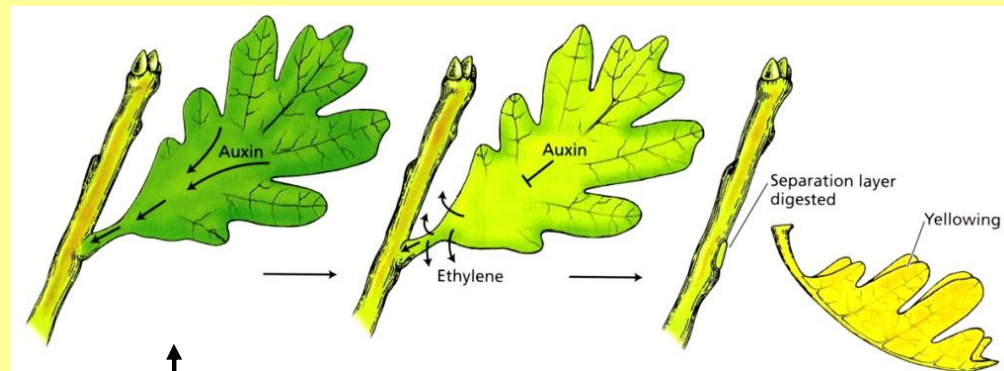
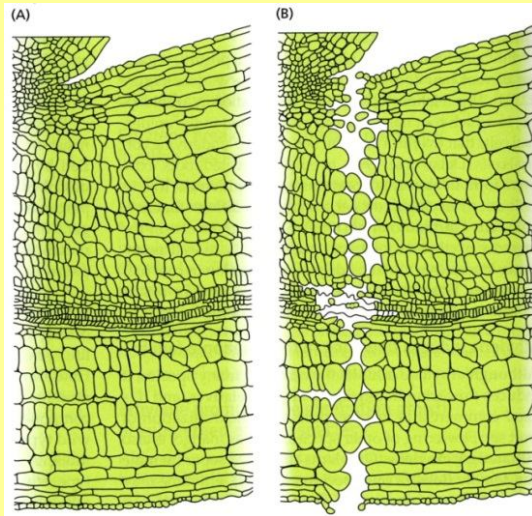




Ethylen indukuje tvorbu adventivních kořenů a kořenových vlásků



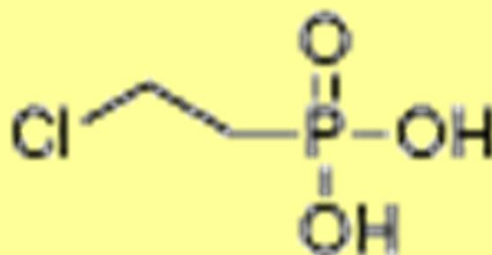
# Ethylen urychluje senescenci a opad listů – u *etr1* nebo *ein2* mutantů (receptorový mutanti) prodlužuje délku života rostlin o 30%



*etr1* mutant – defekt v receptoru pro ethylen

Při opadu listů antagonismus s auxinem

Ethylen má značné praktické využití v zemědělství:  
opad plodů, květů, dozrávání, synchronizace kvetení



Ethepon - 2-chloroethylfosfonová kyselina

Ethepon = syntetická látka, která se v rostlině mění metabolismem  
na ethylen

## Signální dráhy ethylenu

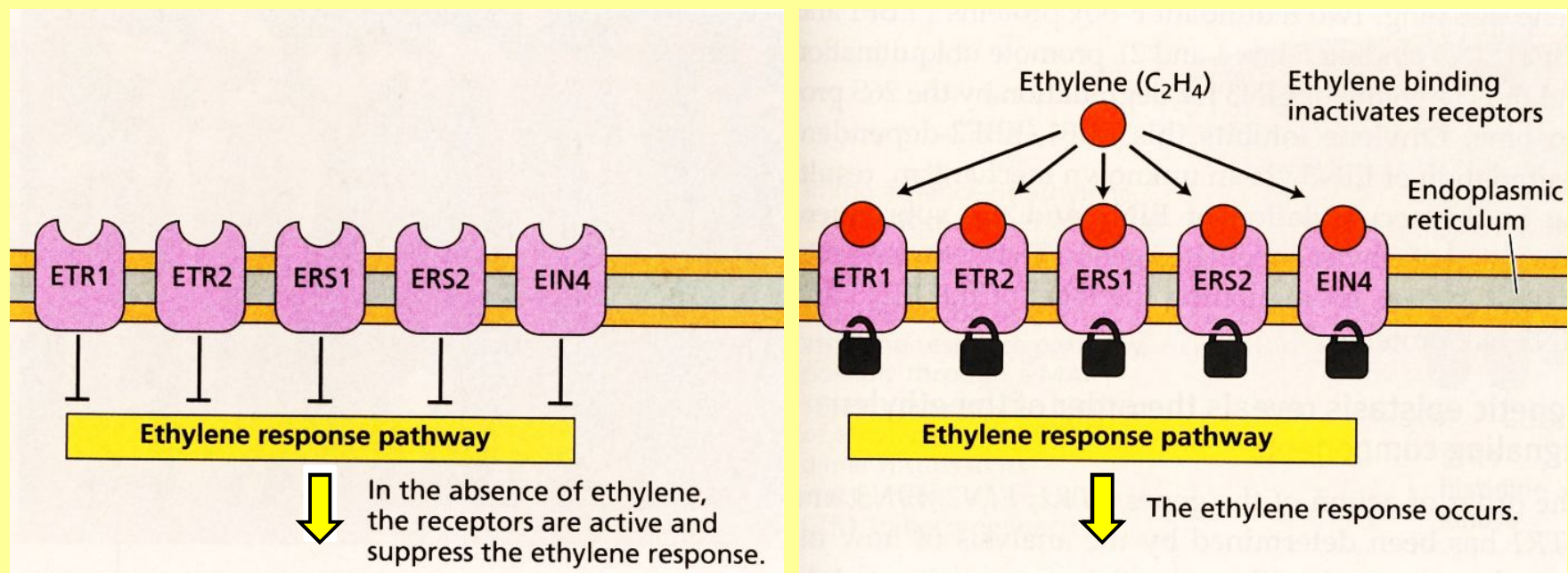


Izolace mutanta *etr1* necitlivého  
k ethylenu.



Receptor ethylenu

Za nepřítomnosti ethyleny jsou receptory na membráně endoplazmatického retikula aktivní a blokují signální dráhu.



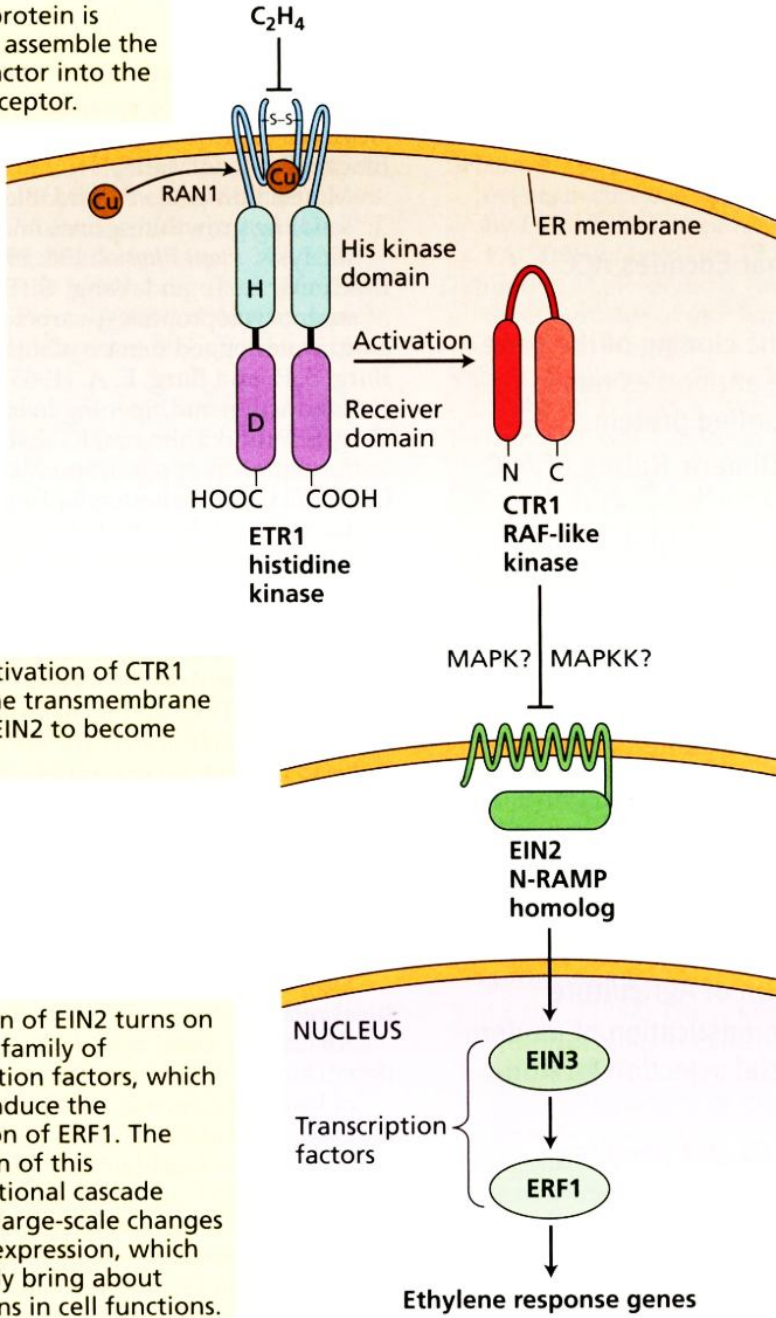
Vazba ethyleny k receptorům vede k jejich zablokování. Tím se uvolní signální dráhy a dochází k indukci reakcí k ethyleny.

The RAN1 protein is required to assemble the copper cofactor into the ethylene receptor.

In the absence of ethylene, ETR1 and the other ethylene receptors activate the kinase activity of CTR1. This leads to a repression of the ethylene response pathway, possibly through a MAP kinase cascade. The binding of ethylene to the ETR1 dimer results in its inactivation, which causes CTR1 to become inactive.

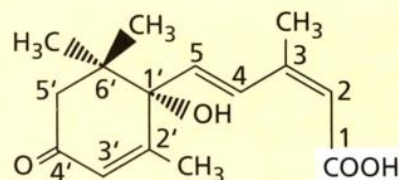
The inactivation of CTR1 allows the transmembrane protein EIN2 to become active.

Activation of EIN2 turns on the EIN3 family of transcription factors, which in turn induce the expression of ERF1. The activation of this transcriptional cascade leads to large-scale changes in gene expression, which ultimately bring about alterations in cell functions.

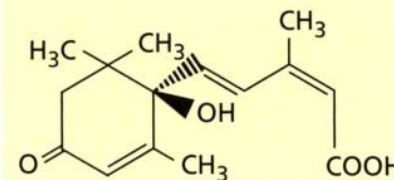


## d) Kyselina abscisová (ABA)

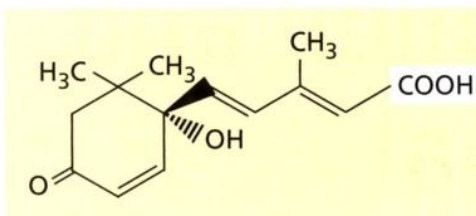
- Kyselina abscisová (ABA) (dříve zvaná abscisin II nebo dormin) je inhibiční fytohormon. Zpomaluje růst rostlin, připravuje rostlinu na období vegetačního klidu. Strukturně patří mezi seskviterpeny.
- ABA má řadu isomerů – aktivní a přírodní je pouze *S*-(*cis*)-forma



(*S*)-*cis*-ABA  
(naturally occurring  
active form)



(*R*)-*cis*-ABA  
(inactive in stomatal closure)



(*S*)-2-*trans*-ABA (inactive, but  
interconvertible with active  
*cis* form)

## ABA - historie

**1963 - Frederickem Addicottem při hledání látek, odpovědných za opadávání plodů bavlníku - *abscisin I* a *abscisin II* (dnes ABA)**

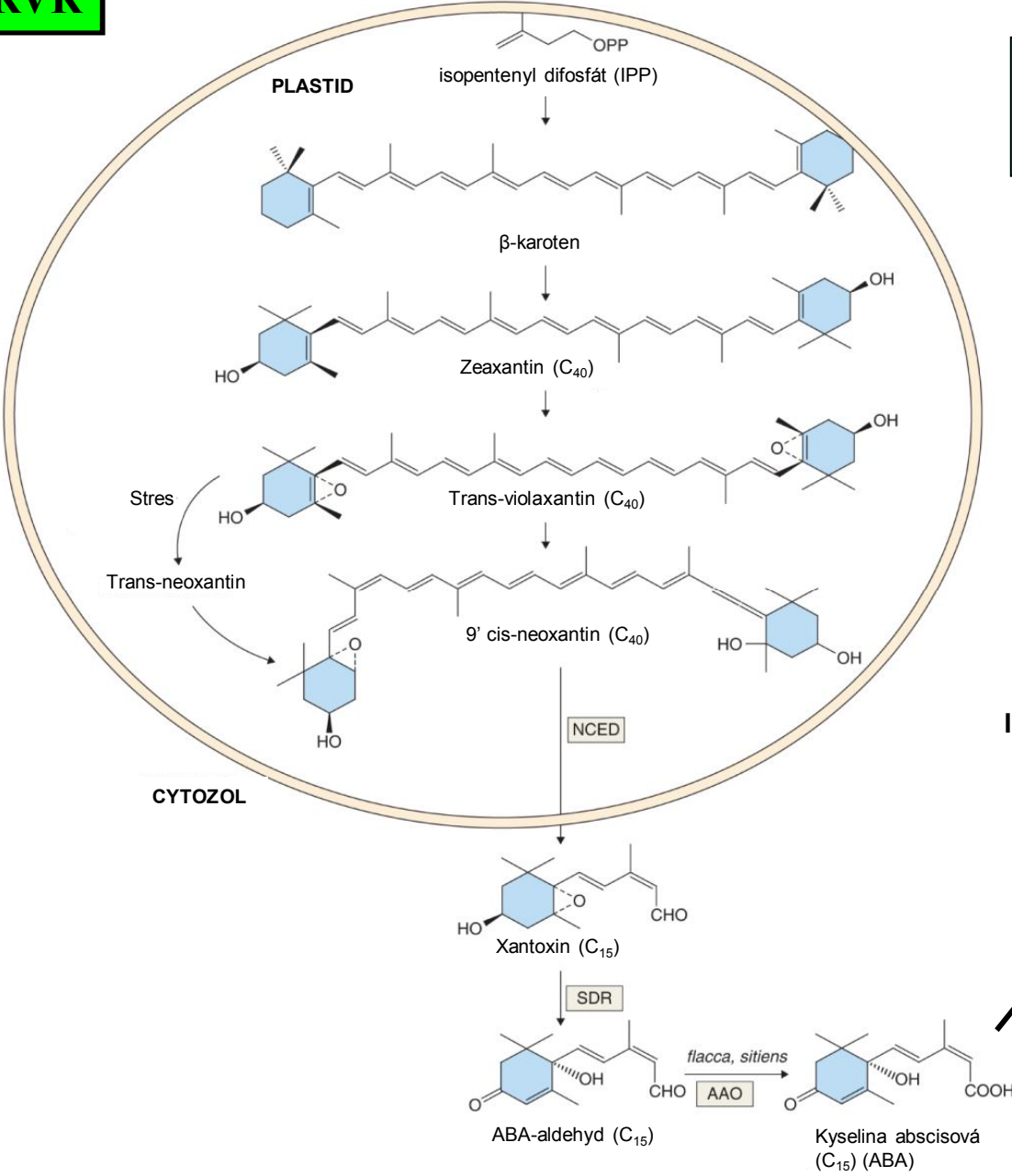
**Ve stejné době:**

**Philip Wareing - studoval procesy spojené s vegetačním klidem u dřevin a tak tuto látku pojmenoval *dormin* (od pojmu *dormance*, období vegetačního klidu u pupenů).**

**Van Stevenincke - studoval opadávání květů a lusků vlčího bobu**

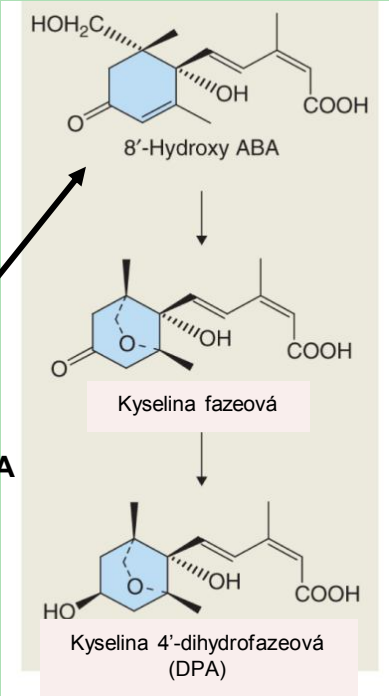


# Biosyntéza a metabolismus ABA



Inaktivace ABA oxidativními procesy

Enzym CYP707A



## Fyziologická funkce ABA

**ABA inhibuje předčasné klíčení - viviparii**



Prokázáno u ABA-deficientních mutantů (*vp2*, *vp5*, *vp7*, *vp9*, *vp14*) dochází k parciální obnově fenotypu po aplikaci ABA.

ABA reguluje akumulaci zásobních proteinů a proteinů zodpovědných za vysušení semen (proteiny LEA – late-embryogenesis-abundant)

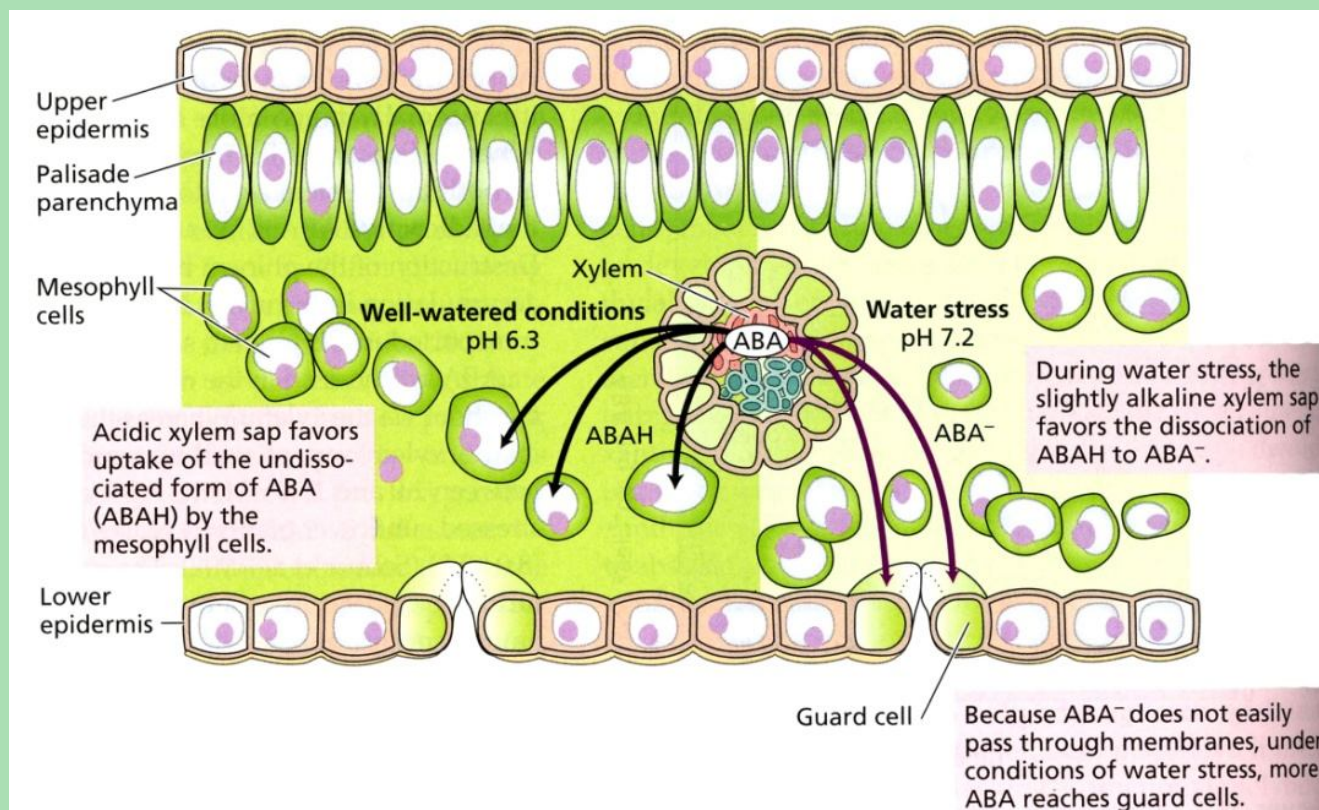
## Dormance semen

Klid (dormance) semene je způsoben zejména přítomností ABA v semenných obalech.

### 2 typy semenné dormance:

- a) embryo dormance – řízena ABA z kotyledonů (líška, jasan, broskev), po odstranění kotyledonů normální růst
  
- b) obalem řízená dormance – rostliny z aridních oblastí se silným obalem (vojtěška)

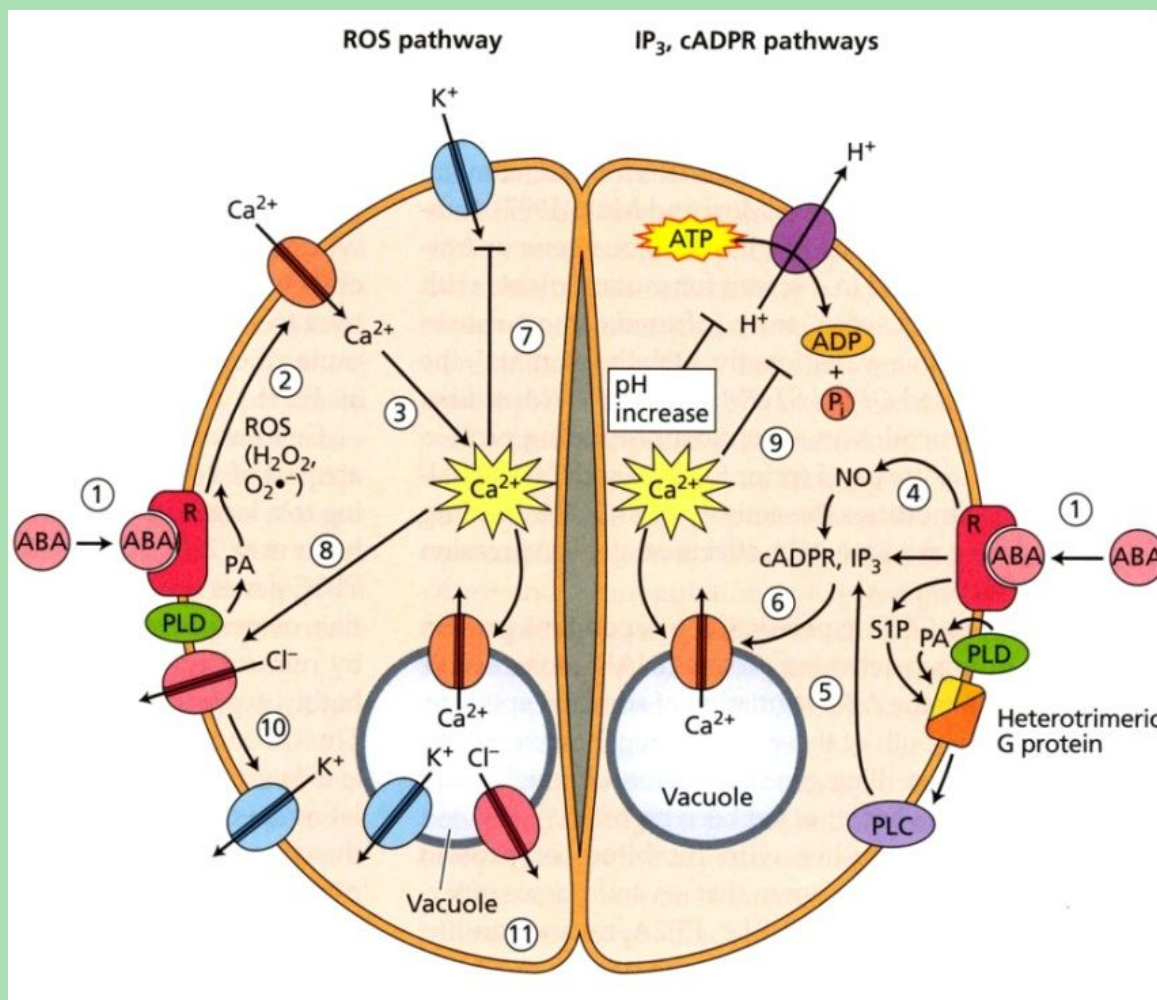
## ABA uzavírá průduchy (stomata) v závislosti na vodním stresu



**Zavodněné rostliny:** pH xylémového roztoku se pohybuje kolem 6.3 => pohlcování ABA mezofylovými buňkami, protože ABA se nachází v nedisociované (protonované) podobě ABAH.

**Vodní stres:** pH xylémového roztoku roste na 7.2 => stresem indukovaná alkalizace apoplastu upřednostňuje tvorbu disociované formy ABA, ABA<sup>-</sup>. Dehydratace současně vede k okyselení cytozolu => ABA<sup>-</sup> se dostává do mezofylových buněk špatně => více ABA<sup>-</sup> se dostává ke svěřacím buňkám, kde se váže na membránový receptor.

1. ABA se váže na receptor.
2. Vazba ABA indukuje proud  $\text{Ca}^{2+}$  do buňky.
3. Zvyšuje se intracelulární konc.  $\text{Ca}^{2+}$  a indukuje se dále proud  $\text{Ca}^{2+}$  z vakuoly.
4. ABA stimuluje indukci NO a cADPR.
5. ABA zvyšuje hladinu  $\text{IP}_3$  prostřednictvím G proteinu.
6.  $\text{IP}_3$  stimuluje proud  $\text{Ca}^{2+}$  z vakuoly.
7. Vysoká hladina  $\text{Ca}^{2+}$  blokuje proud  $\text{K}^+$  do buňky.
8. Vysoká hladina  $\text{Ca}^{2+}$  stimuluje proud  $\text{Cl}^-$  z buňky a způsobuje depolarizaci membrány.
9. Vysoká hladina  $\text{Ca}^{2+}$  blokuje protonovou pumpu, zesiluje se depolarizace.
10. Depolarizace membrány aktivuje proud  $\text{K}^+$  z buňky.
11.  $\text{K}^+$  a  $\text{Cl}^-$  proudí z vakuoly do cytosolu.



ROS - Reactive oxygen species

$\text{IP}_3$  - Inositol-trifosfát

cADPR – cyclic ADP-ribose

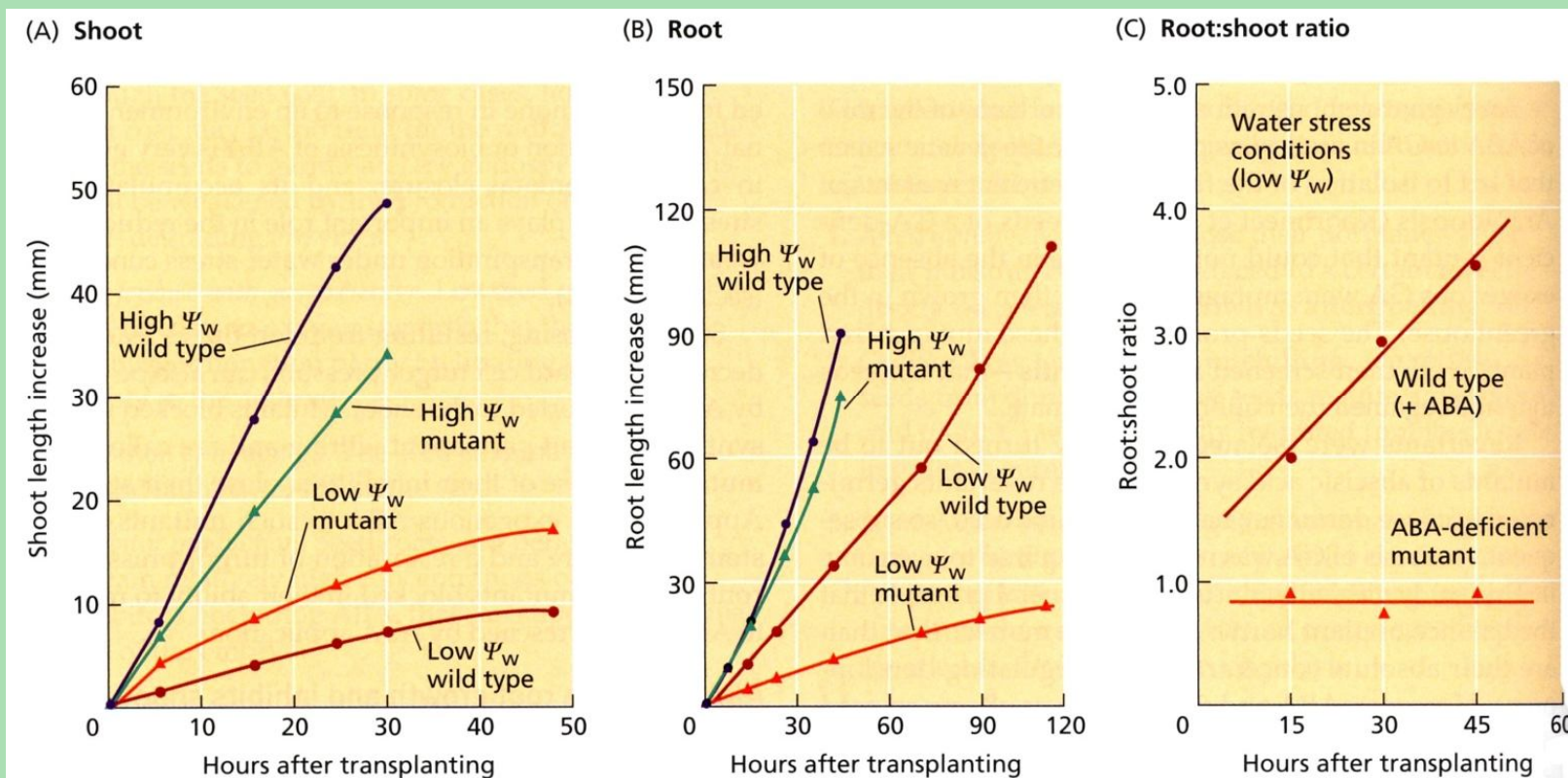
NO – nitric oxide (oxid dusnatý)

PLC – phospholipase C)

PLD – phospholipase D)

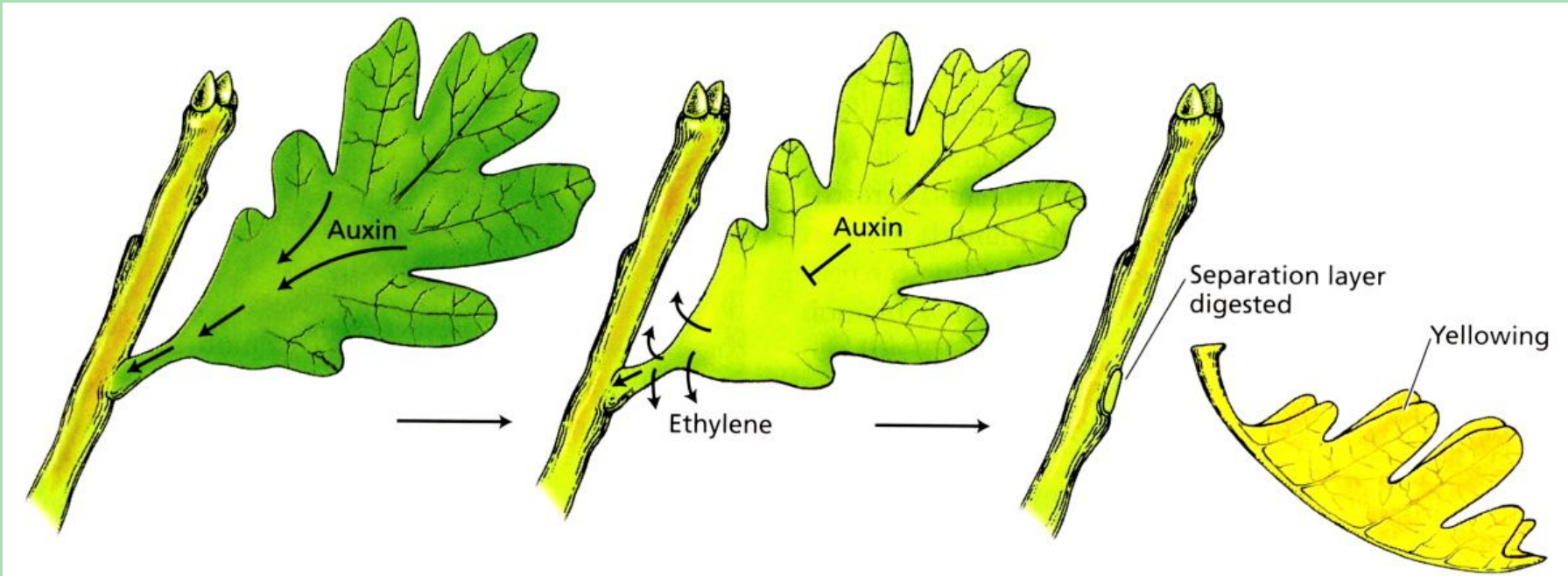
PA – phosphatidic acid)

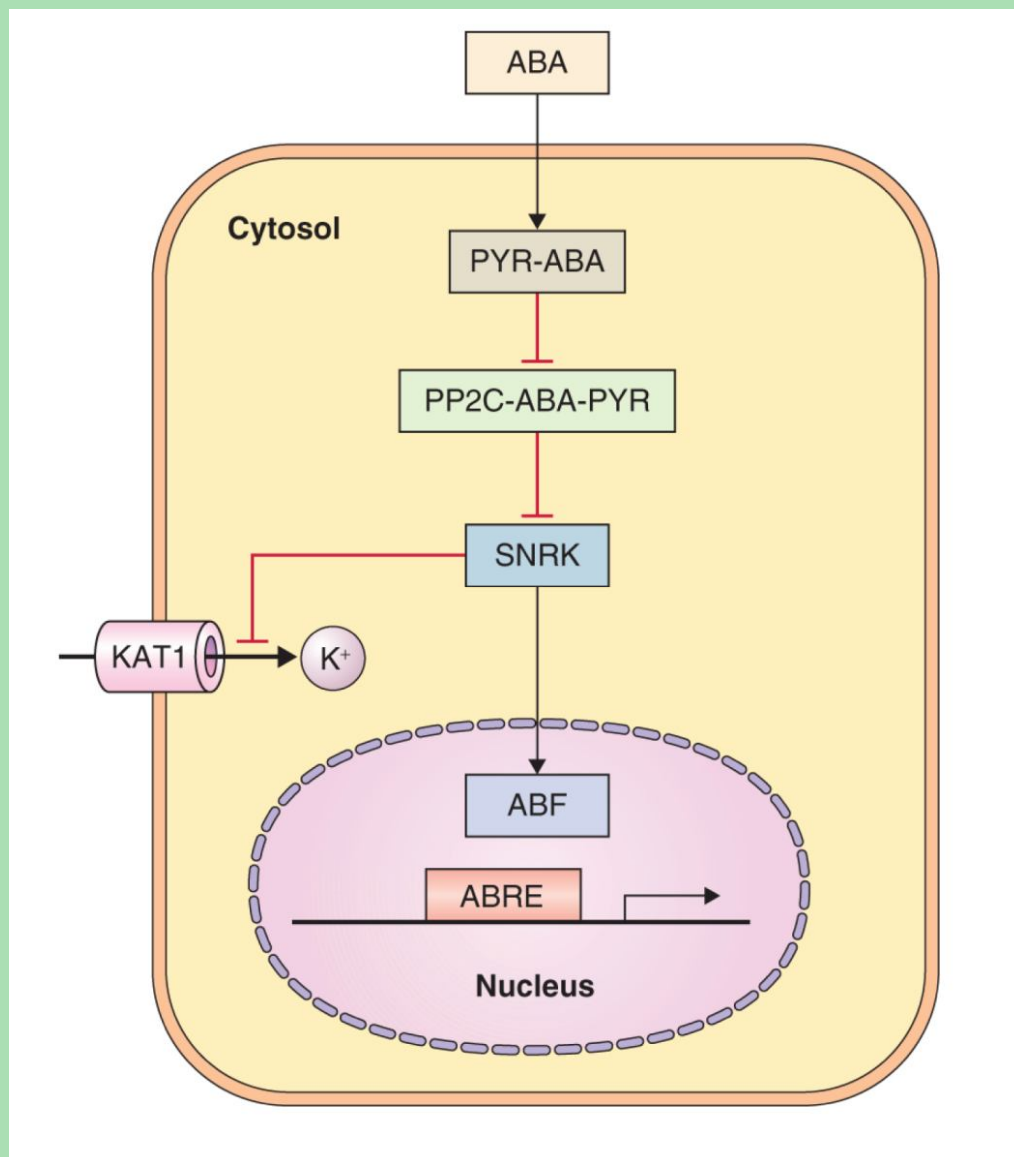
Při nízkém vodním potenciálu ( $\psi_w$ ; nedostatek vody) ABA stimuluje růst kořenů a inhibuje růst výhonů (vp mutant)



Při nedostatku vody – inhibice tvorby ethylenu v kořenech

**ABA podporuje listovou senescenci nezávisle na ethylenu a auxinu**



**ABA receptory:**

***PYrabactin Resistance 1 (PYR1)***  
(homology **PYL** a **PYR-Like**).

Vazba ABA k PYR1 vede k inhibici fosfatáz typu 2C (**PhosPhatase** type **2C**, **PP2C**)

Terčem proteinů PP2C je skupina proteinů zvaných SNF1-podobná protein kináza 2 (**SNF1-Related protein Kinase 2**, **SNRK2**).

**Absence ABA:** Fosfatáza PP2C (ABI1, ABI2) je aktivní a defosforyluje SNRK2. SNRK2 kináza je tak inaktivována.

**Přítomnost ABA:** Fosfatáza PP2C je inhibována a SNRK kinázy jsou aktivní.

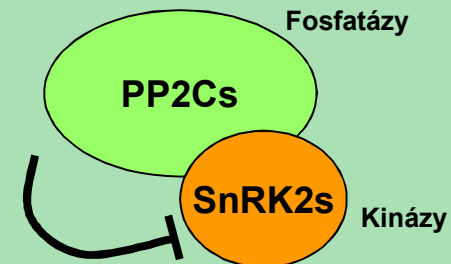
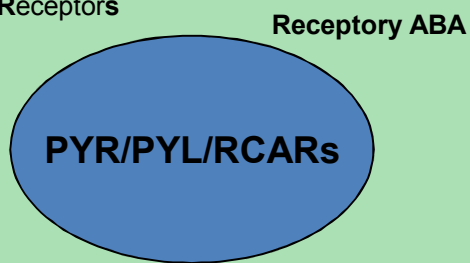


PYR = PYrabactin Resistance

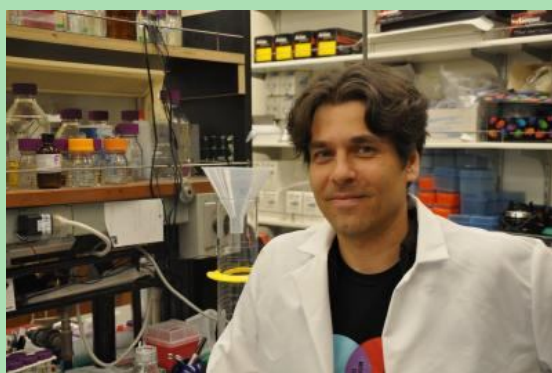
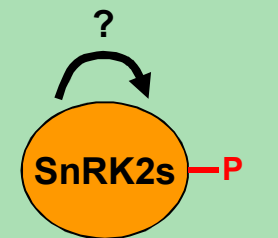
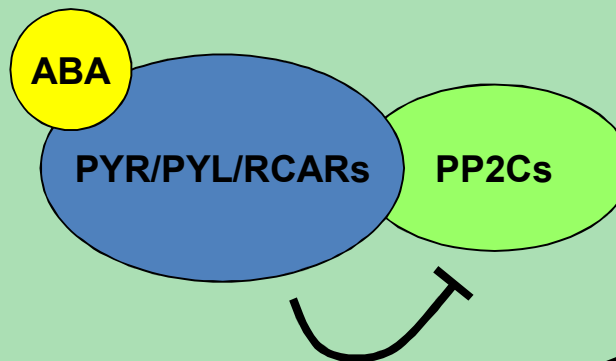
PYL = PYR-Like

RCARs = Regulatory Component of ABA Receptors

**- ABA**



**+ ABA**



Sean Cutler

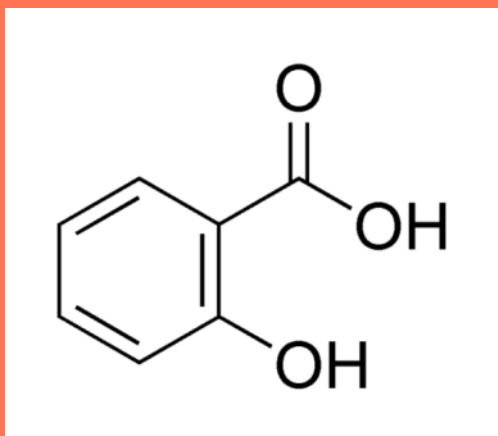
Aktivace pomalých aniontových kanálů

Inhibice K<sup>+</sup> kanálů

Aktivace ABA-zprostředkované exprese genů (v jádře)

## e) Kyselina salicylová (SA)

### Kyselina salicylová



Jméno od *Salix alba*  
(*Vrba bílá*)

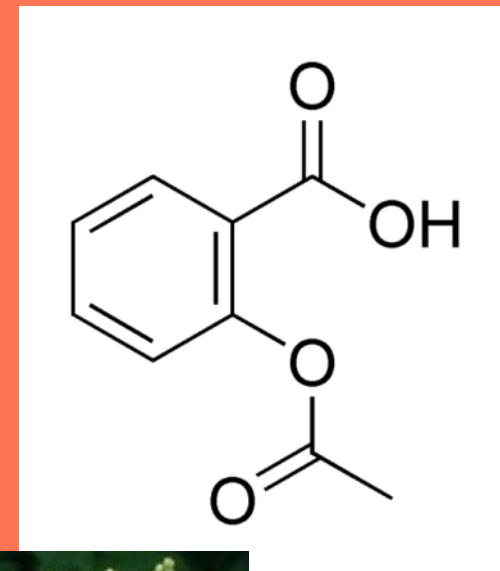


### Kyselina acetylsalicylová

Derivát SA



Aspirin



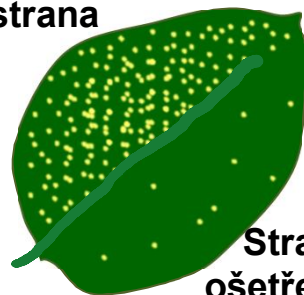
Jméno podle  
*Spiraea* (Tavolník)

## Historie SA

Hippocrates psal od použití vrby k odstranění bolesti ~ před 2400 lety



Neošetřená strana



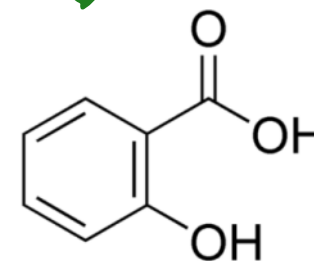
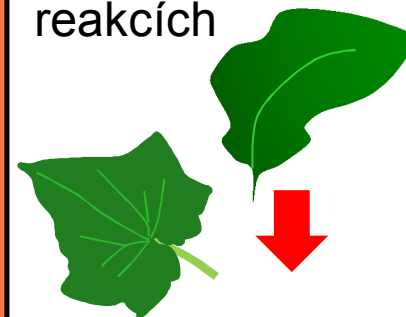
Strana ošetřená SA

V r. 1979 White ukázal, že ošetření listu aspirinem nebo SA je spojeno s jeho rezistencí k tabákovému viru mozaiky tabáku (TMV)

V r. 1987 bylo ukázáno, že endogenní SA je zodpovědná za produkci tepla v květech kaly (*Arum*)



V r. 1990 bylo zjištěno, že SA funguje v rostlinách jako endogenní signál při obraných reakcích

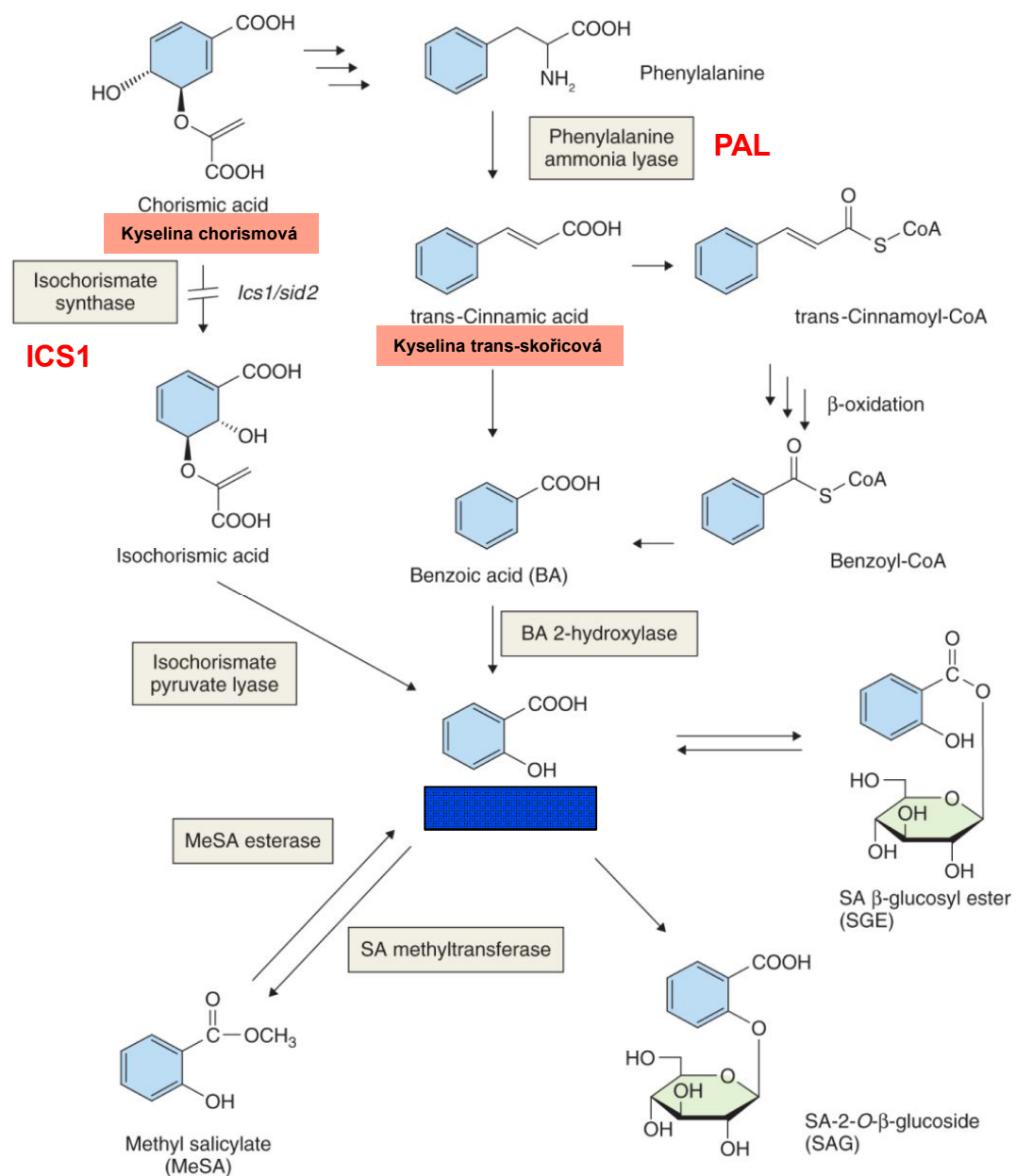


## Biosyntéza a metabolismus SA

### 2 syntetické dráhy SA

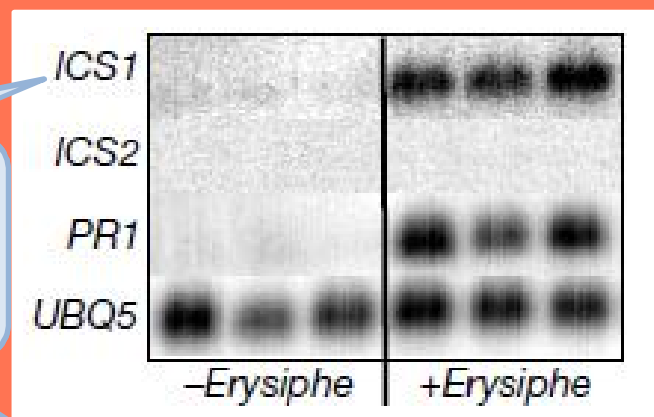
1. Kys. trans skořicová

2. Kys. chorismová

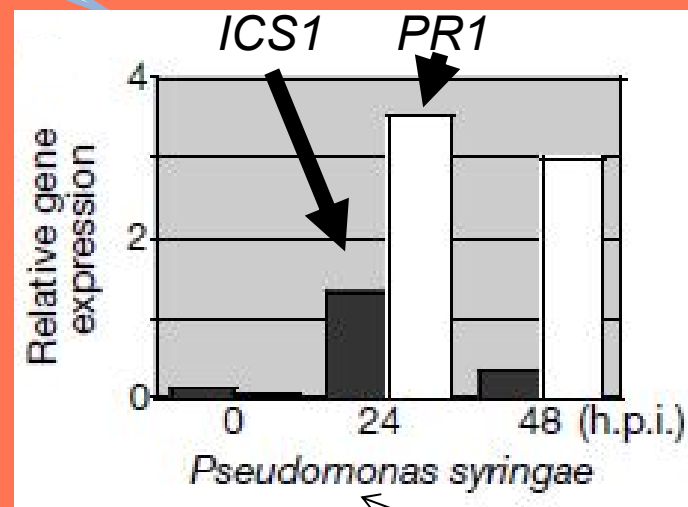


V mnoha rostlinách je gen pro *ICS1* upregulován po napadení patogenem.

Expresse genu *ICS1* se zvyšuje po napadení patogenem



*PR1* je SA-indukovaný gen exprimovaný po napadení pathogenem



*Erysiphe* – houba vyvolávající onemocnění zvané padlí

Gram-negativní bakterie

## Fyziologické funkce SA



### Reakce k patogenům

- lokální a hypersensitivní reakce
- systemická získaná resistance

### Interakce

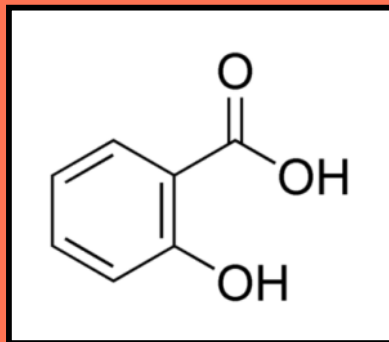
### Další funkce

- abiotický stres
- termogeneze



Signál (např. patogen, UV, teplo,  
vývojové podněty

Zvýšená  
syntéza SA



Expresse  
patogen-  
indukovaných  
genů

→ **OBRANA**

→ Reakce ke stresům

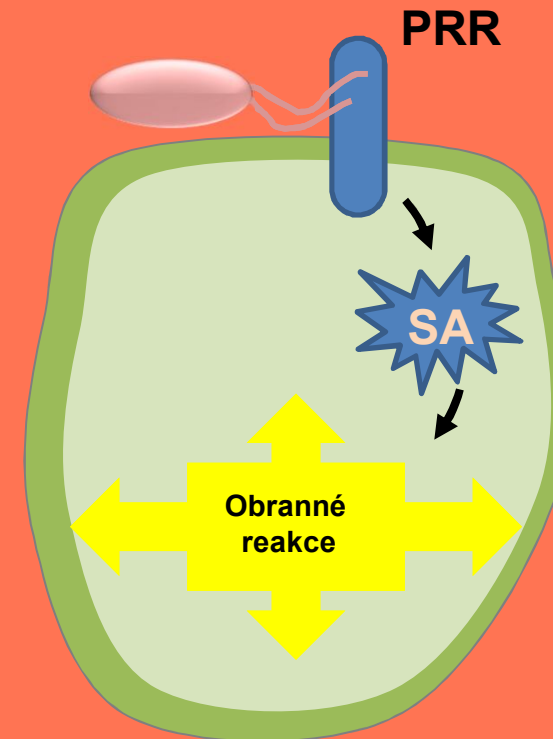
→ Vývojové reakce

Hlavním účinkem SA u rostlin je schopnost měnit expresi genů.

## Pattern-triggered immunity (PTI)

Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) jsou konzervované molekuly jako flagelin nebo chitin.

Tyto molekuly jsou rozpoznány extracelulárním receptorem PRRs (pattern recognition receptors)

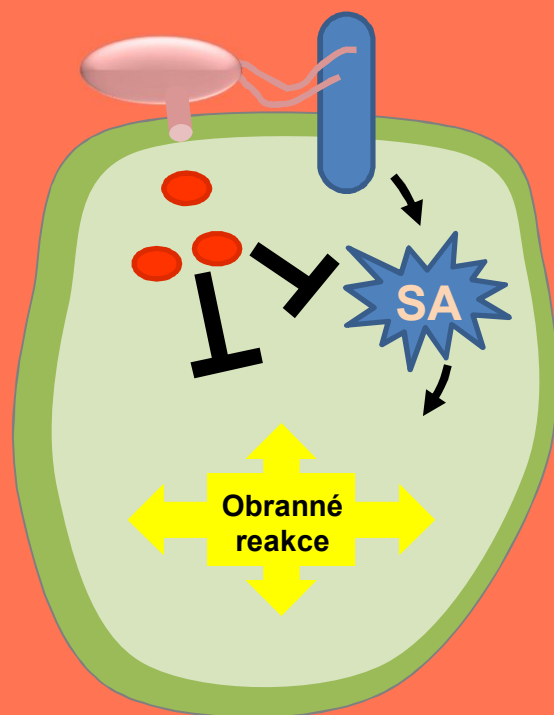


Rozpoznání PAMP spouští syntézu SA a indukci obranných genů = pattern-triggered immunity (PTI)

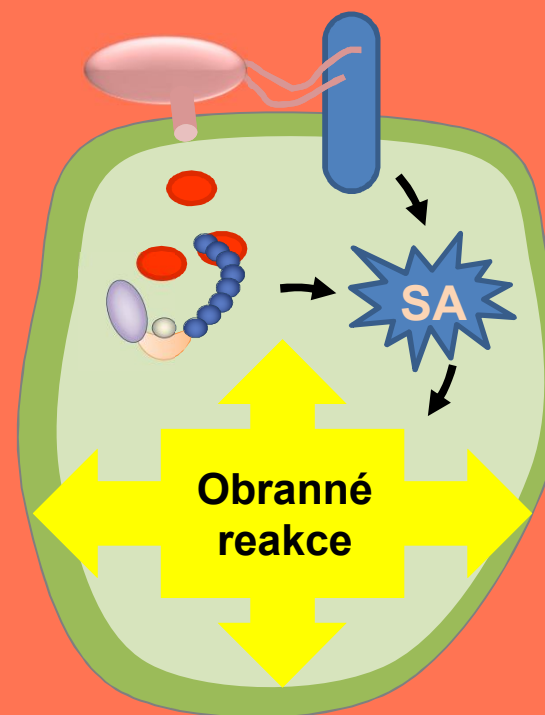


## Effector-triggered immunity (ETI)

Některé patogeny překonávají PTI tím, že do buňky vypouští efekty.



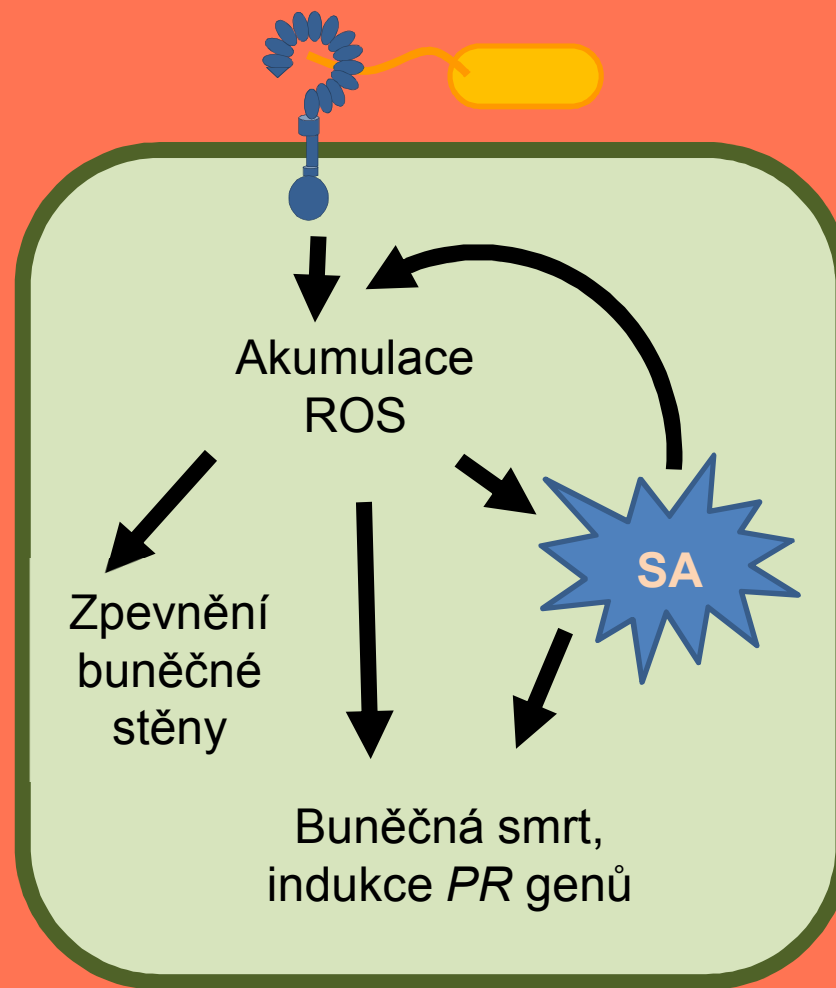
Buňka vytváří R-proteiny, které rozpoznávají efekty a spouští tak zvýšenou reakci.



Efektorem-spouštěná imunita

## Lokální reakce – hypersensitivní reakce

Rozpoznání patogenu spouští lokální hypersensitivní reakci, která zahrnuje oxidativní výbuch (oxidative burst), zesílení buněčné stěny, indukci *PR* genů a buněčnou smrt.



## Hypersensitivní reakce (HR) uzavře patogena v hrobě mrtvých buněk



HR zabíjí infikované buňky a buňky okolní a tak pomáhá bránit rozšiřování patogena.

## Systemická získaná resistance (systemic acquired resistance; SAR)

Popsána u listů tabáku infikovaných virem tabákové mozaiky (TMV - Tobacco Mosaic Virus)



Tato rostlina nebyla pre-inokulována TMV a ukazuje velké oblasti léze (poškození) po inokulaci TMV.

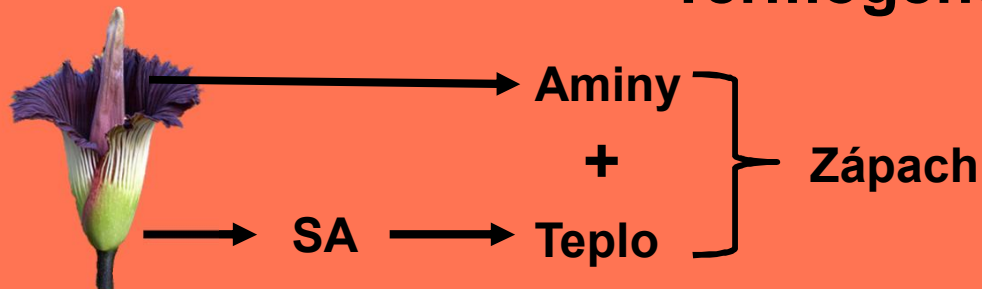


Experiment demonstruje systemickou signalizaci.



Tato rostlina byla pre-inokulována TMV na třech spodních listech. Po 7 dnech byly inokulovány TMV tři vrchní listy. Tyto vrchní listy ukazují **zvýšenou rezistenci** k TMV.

# Termogeneze



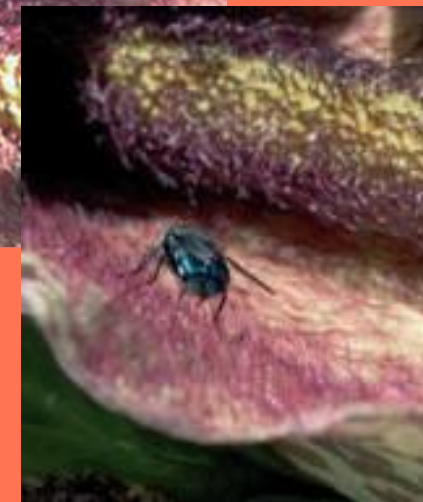
Látka indukující termogenezi byla poprvé nazvána **calorigen**. Na konci 80. let bylo zjištěno, že jde právě o SA. Aplikace SA na rostliny kaly vede k indukci termogeneze.



Zmijovec titánský (áronova hůl)  
(*Amorphophallus titanum*)

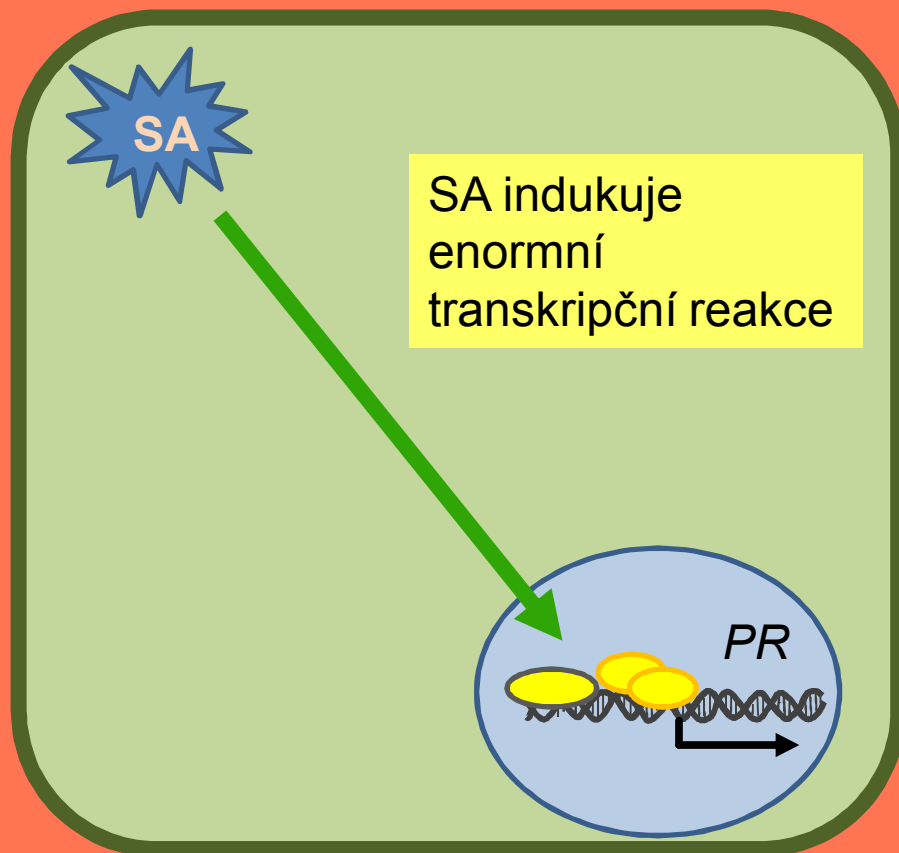


Masařka na květu  
*Helicodicerus muscivorus*

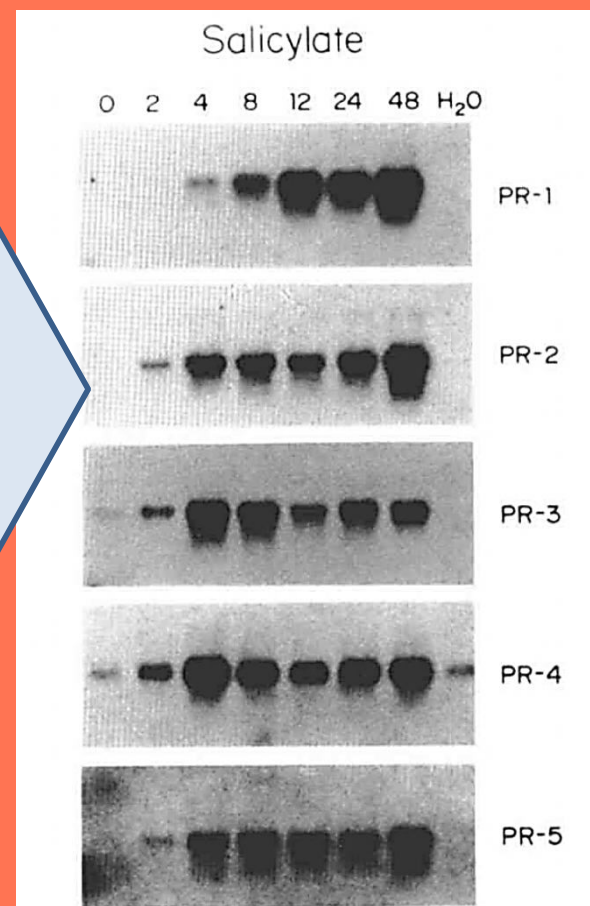


Některé rostliny čeledi *Aracea* páchnou jako hnilé maso a lákají hmyz. Květy produkují teplo, které udržuje zápach a napodobuje tak rozkládající se tělo.

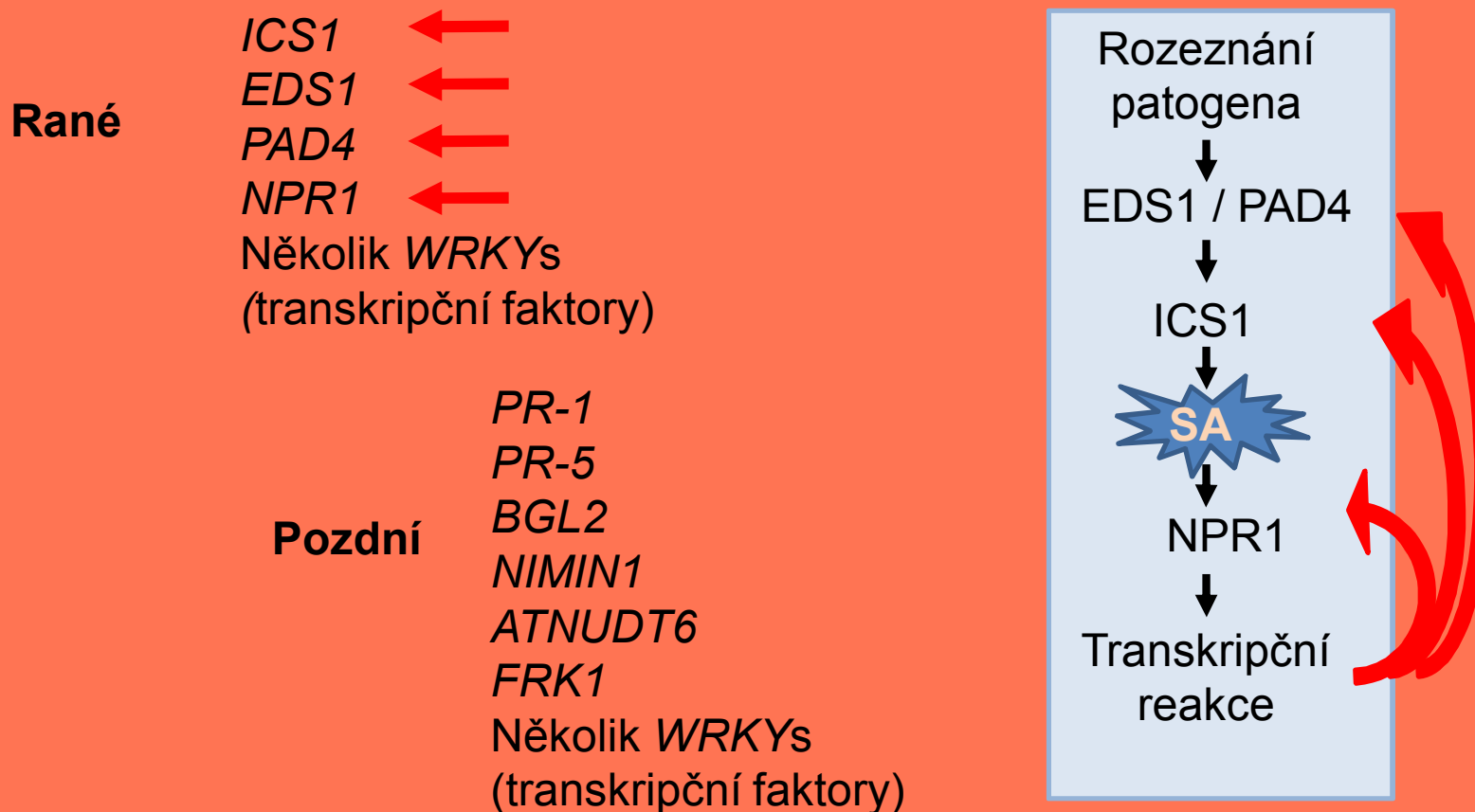
## Signální dráhy SA



PR geny jsou skupinou tzv. pathogenesis related genů. Jsou zapojeny v obraných reakcích rostlin



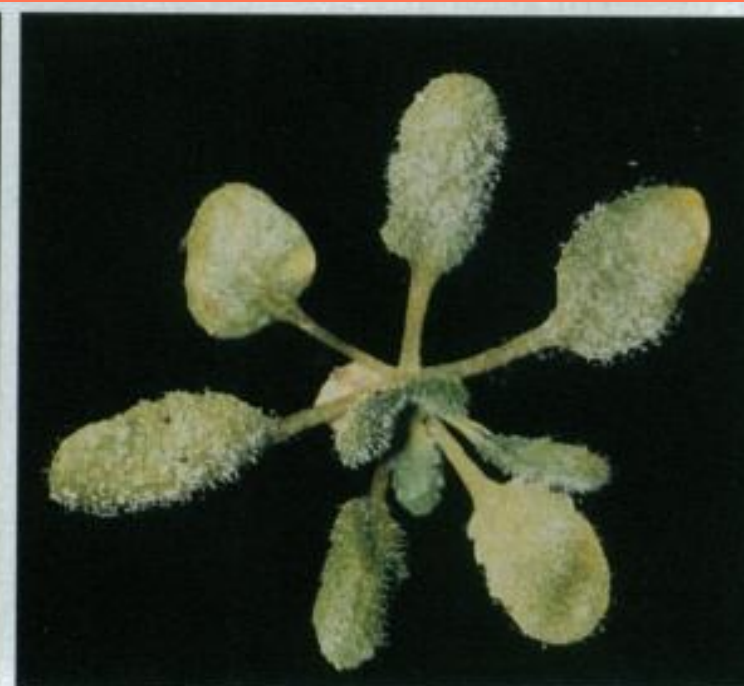
## Mnoho genů reaguje k SA: rané geny zesilují signál



Wild-type

*npr1* (aka *nim1*)

NPR1  
(NONEXPRESSOR OF  
PATHOGENESIS-  
RELATED  
GENES1) je  
nutný v  
obranných  
reakcích a je  
klíčový v SA  
signalizaci.



Rostliny byly ošetřeny SA. Po 3 dnech je rostlina  
ochromena patogenem (*Hyaloperonospora  
arabidopsidis*)



## NPR1 je nezbytný a dostatečný pro downstream signalizaci a obranu rostliny

Loss-of-function mutant:  
**více citlivý**

Wild-type

*npr1*



*Pseudomonas syringae* infection

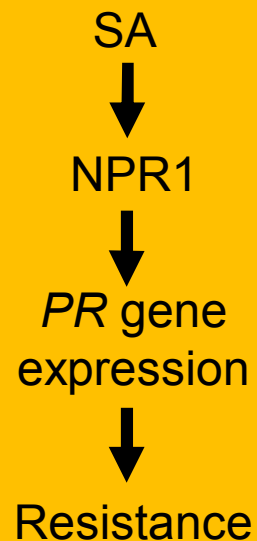
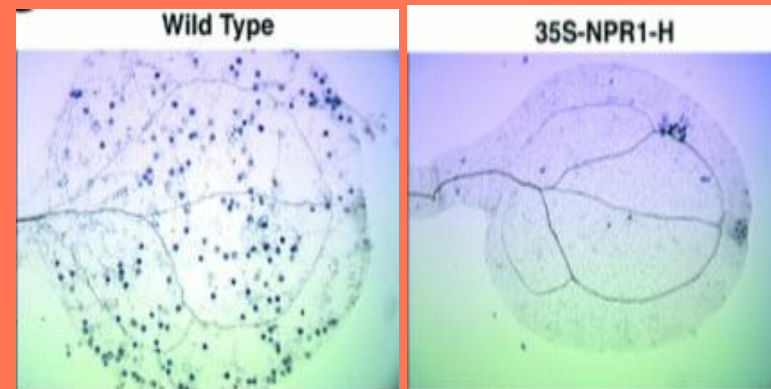


*Bgl2-GUS* (*PR* gene) expression

Gain-of-function mutant:  
**rezistentní**

Wild Type

35S-NPR1-H

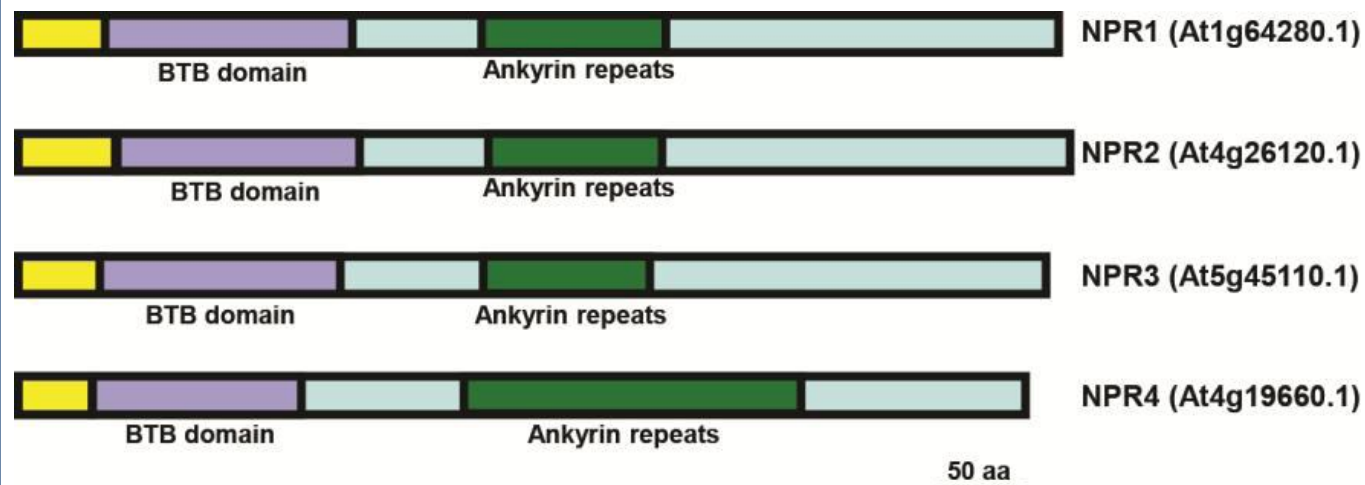


Cao H et al. (1997) Cell 88: 57-63

Cao H et al. (1998) PNAS 95: 6531-6536

## NPR1, NPR3 a NPR4 jsou receptory SA

V roce 2012 dvě skupiny vědců nezávisle na sobě publikovaly závěr, že NPR jsou receptory SA.

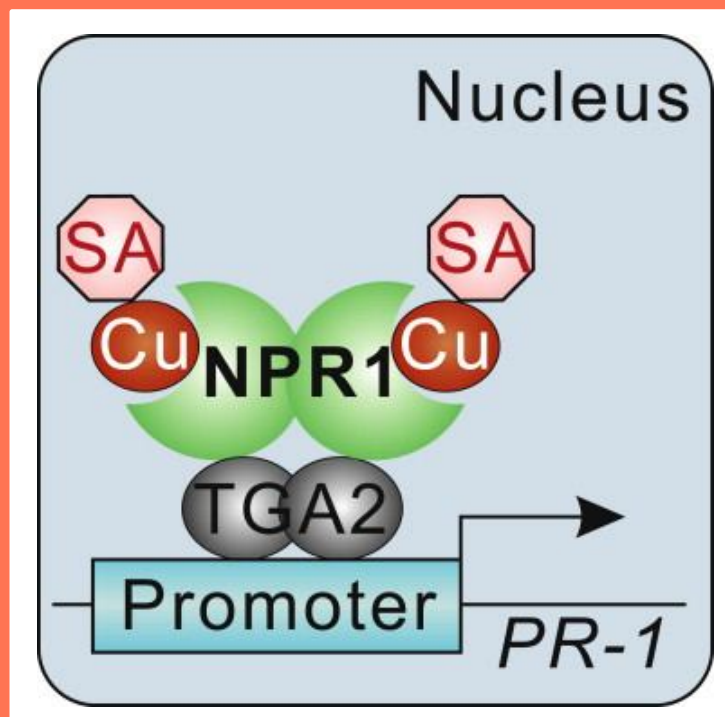


NPR1 je  
regulován přímo  
vazbou SA

**a/nebo**

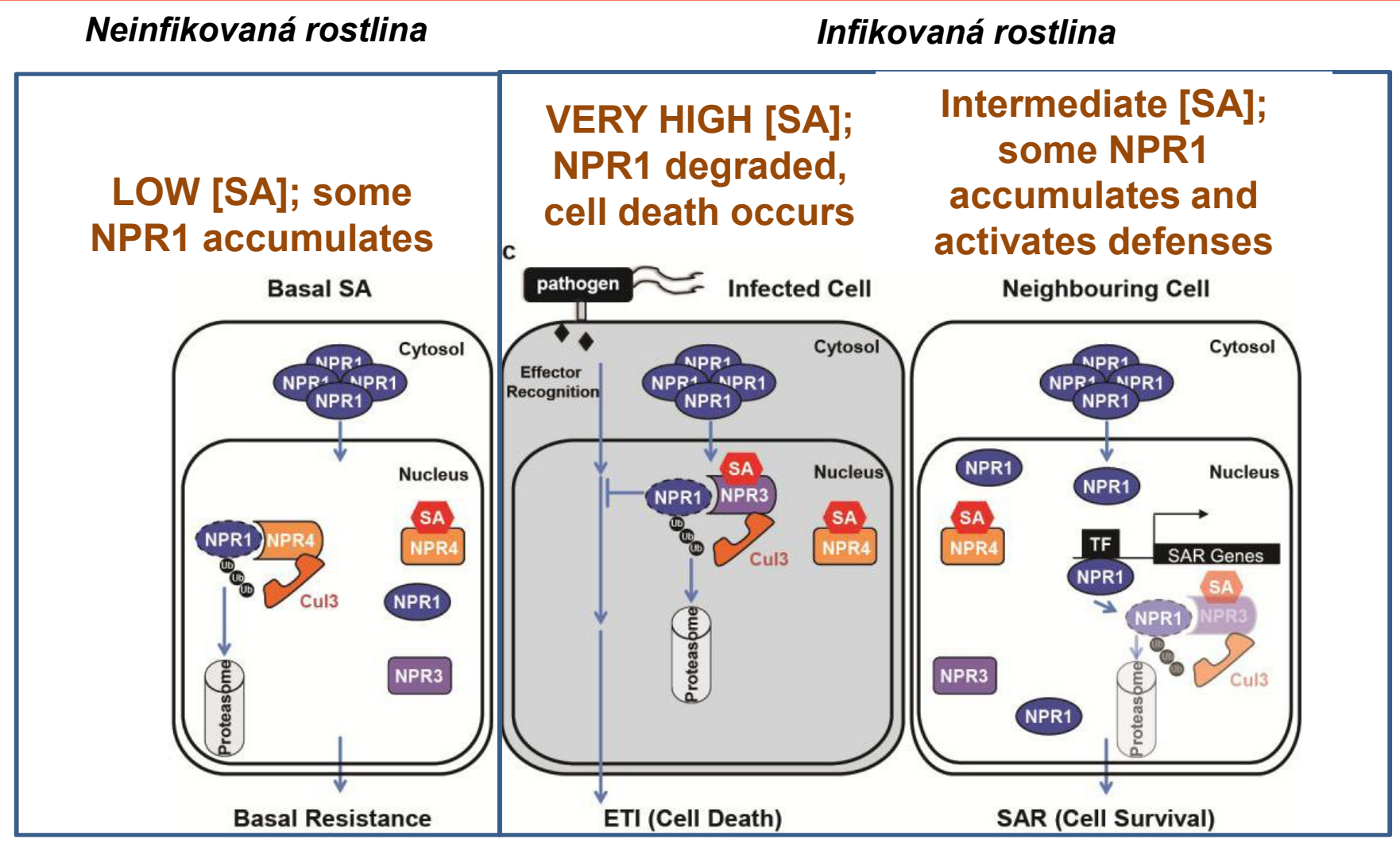
NPR3/4 váže  
SA a reguluje  
NPR1

## NPR1 je aktivován vazbou SA



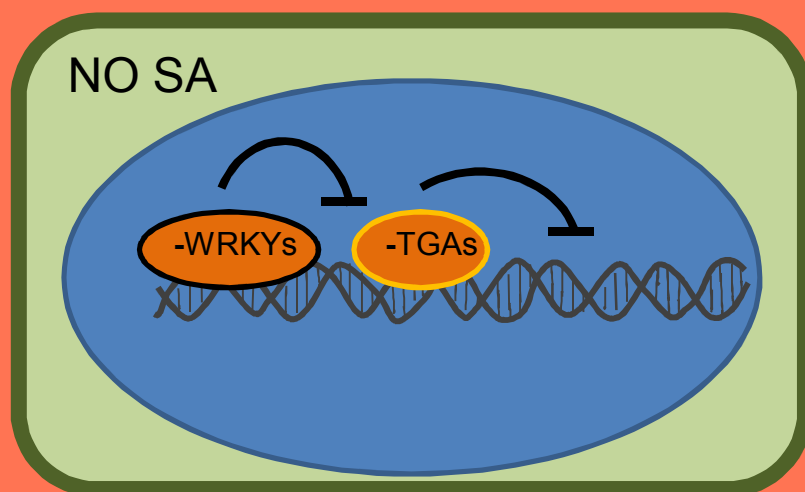
**NPR1 váže SA, dochází ke spuštění konformačních změn, které uvolňují vlastní C-terminální aktivační doménu z inhibice a dochází ke spuštění transkripce.**

# NPR3 a NPR4 regulují proteolytickou likvidaci NPR1

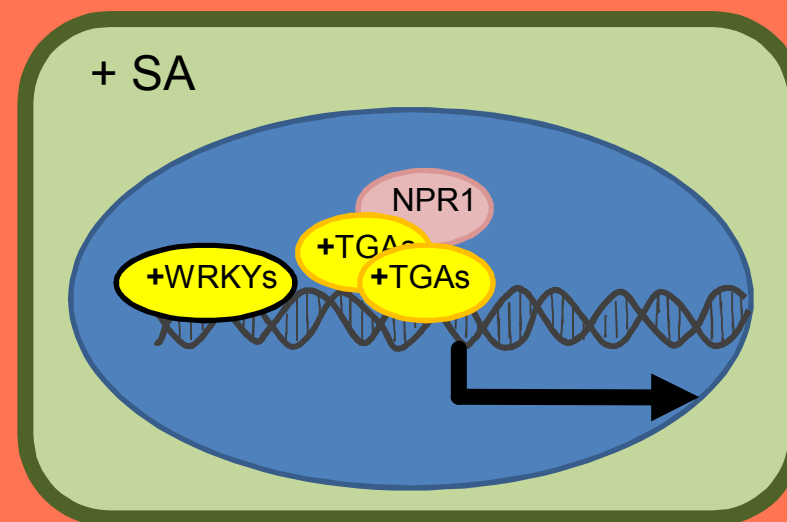


Fu ZQ et al. (2012) Nature 486: 228–232

## Jaderný protein NPR1 aktivovaný SA stimuluje transkripci genů obranných reakcí



Expres obranných genů je potlačena negativními regulátory WRKY.

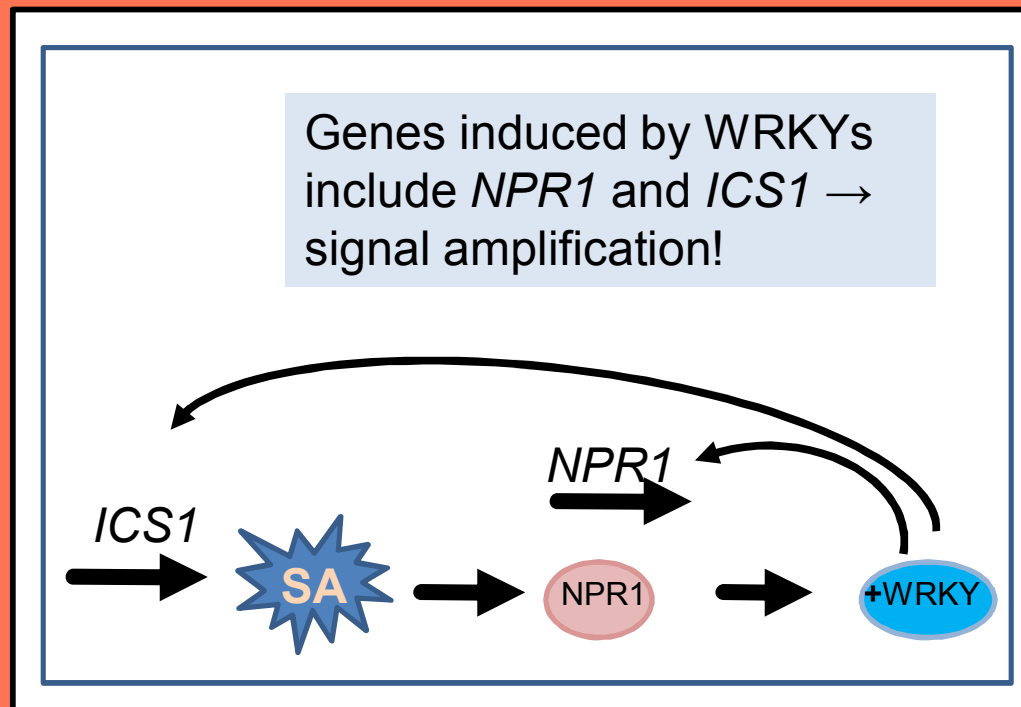
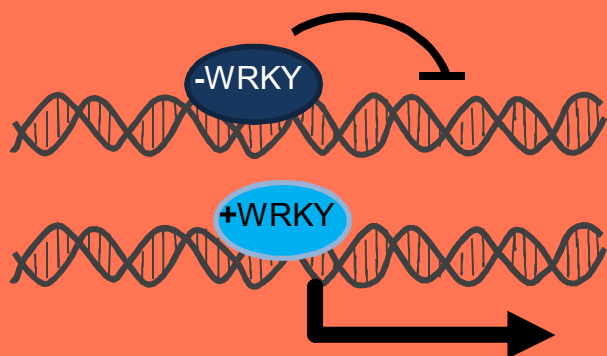


Expres obranných genů je stimulována pozitivními regulátory WRKY.

## WRKYs je velká skupina transkripčních faktorů

*Arabidopsis*: 74 TF WRKY

Rýže: 90 TF WRKY

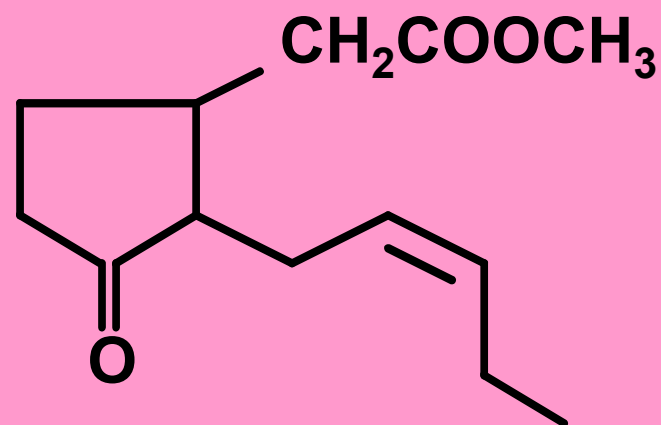


Mnoho TF WRKY je zapojeno v obranné signalizaci. Některé stimulují, některé potlačují transkripci.

## f) Kyselina jasmonová (JA)

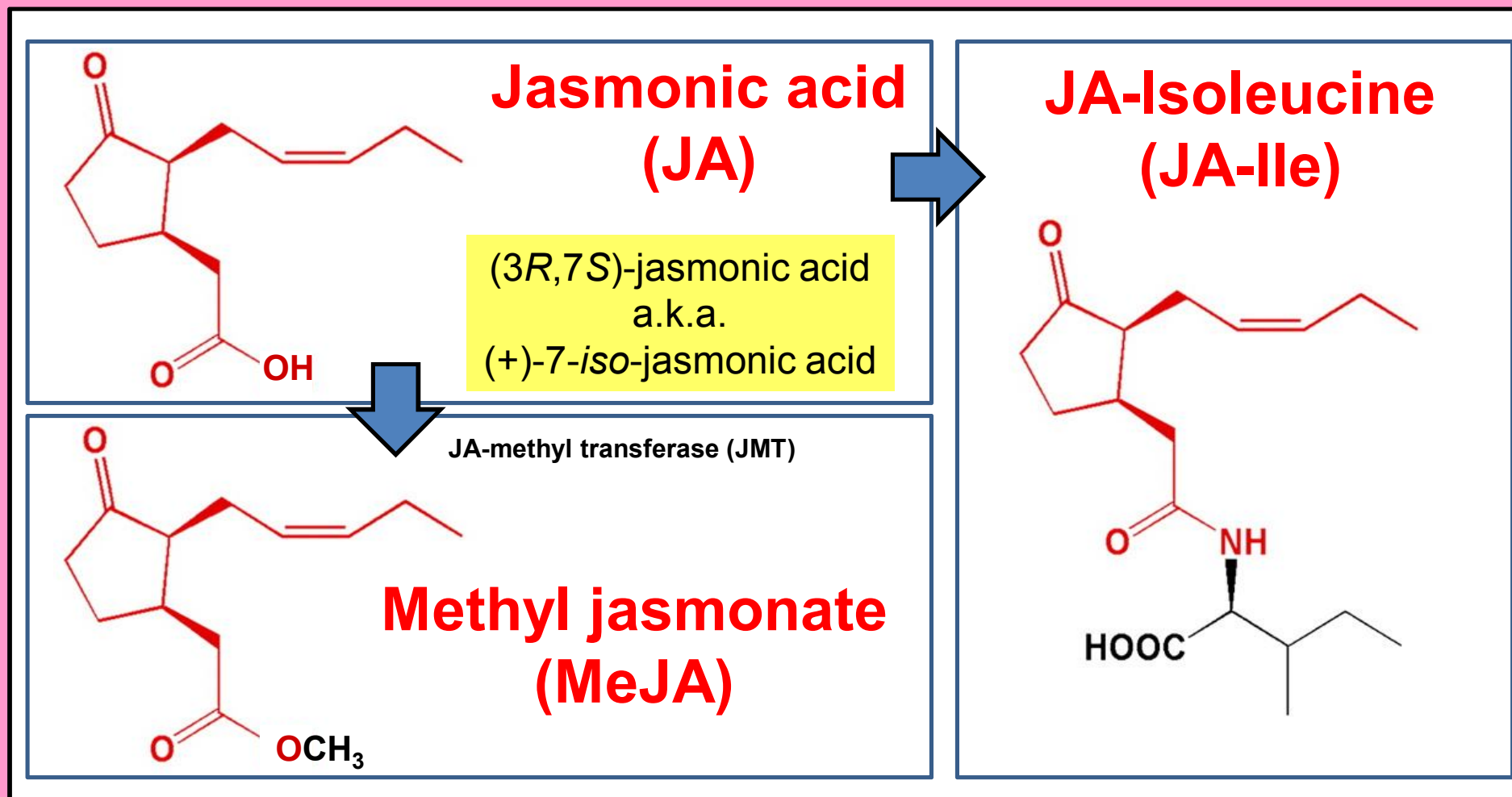
V roce 1962 byl z jasmínu bílého (*Jasminum grandiflorum*) izolován metyl jasmonát

Metyl jasmonát voní jako jiné estery – jde o dominantní vůni jasmínových květů.



Metyl jasmonát

Metyl jasmonát se tvoří z kyseliny jasmonové (jasmínové) (JA)

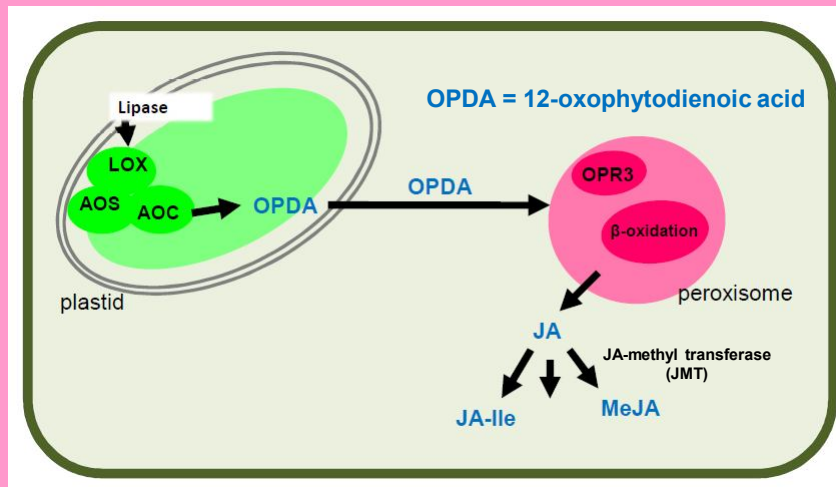


Jasmonoyl izoleucin (JA-Ile) je neúčinnějším jasmonátem.  
MeJA je transportovatelná forma jasmonátů.

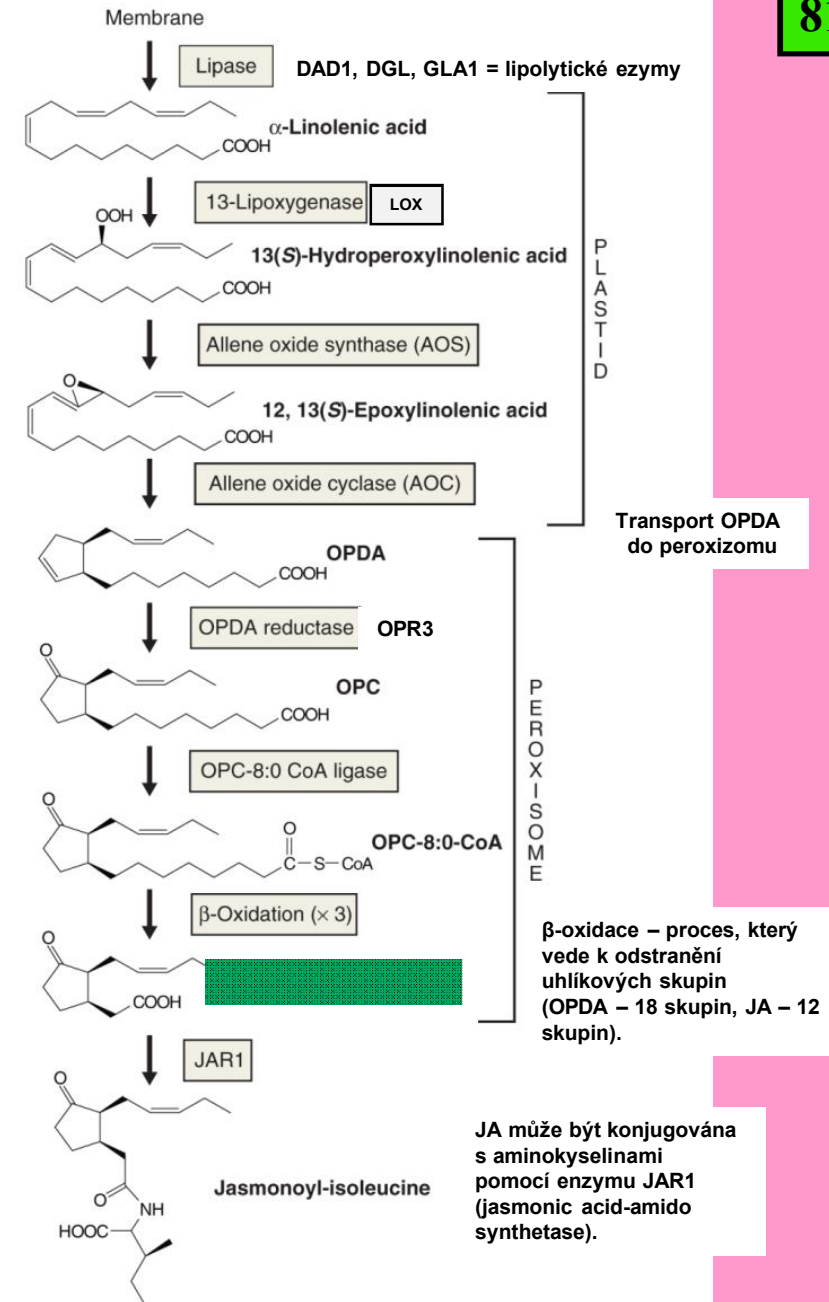


## Biosyntéza JA

Prekurzory jasmonátů jsou odvozeny od membránových lipidů – volných mastných kyselin.



Syntéza jasmonátů probíhá v plastidech, peroxizomech a cytoplasmě.

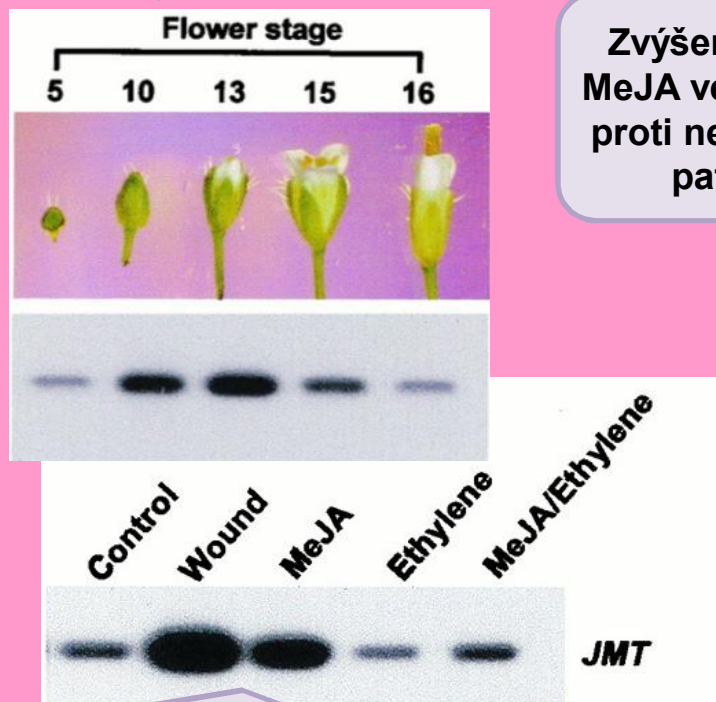


## Fyziologické funkce JA

Produkce MeJA je kontrolována vývojově a indukována poraněním

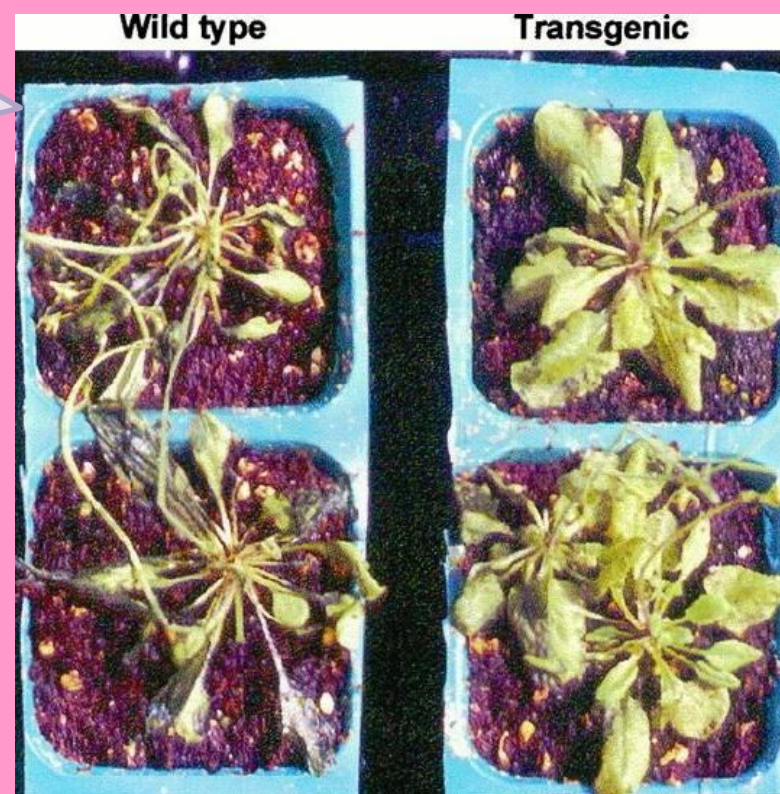
Expres JMT dosahuje maxima při praskání prašníků

JMT - JA-methyl transferase



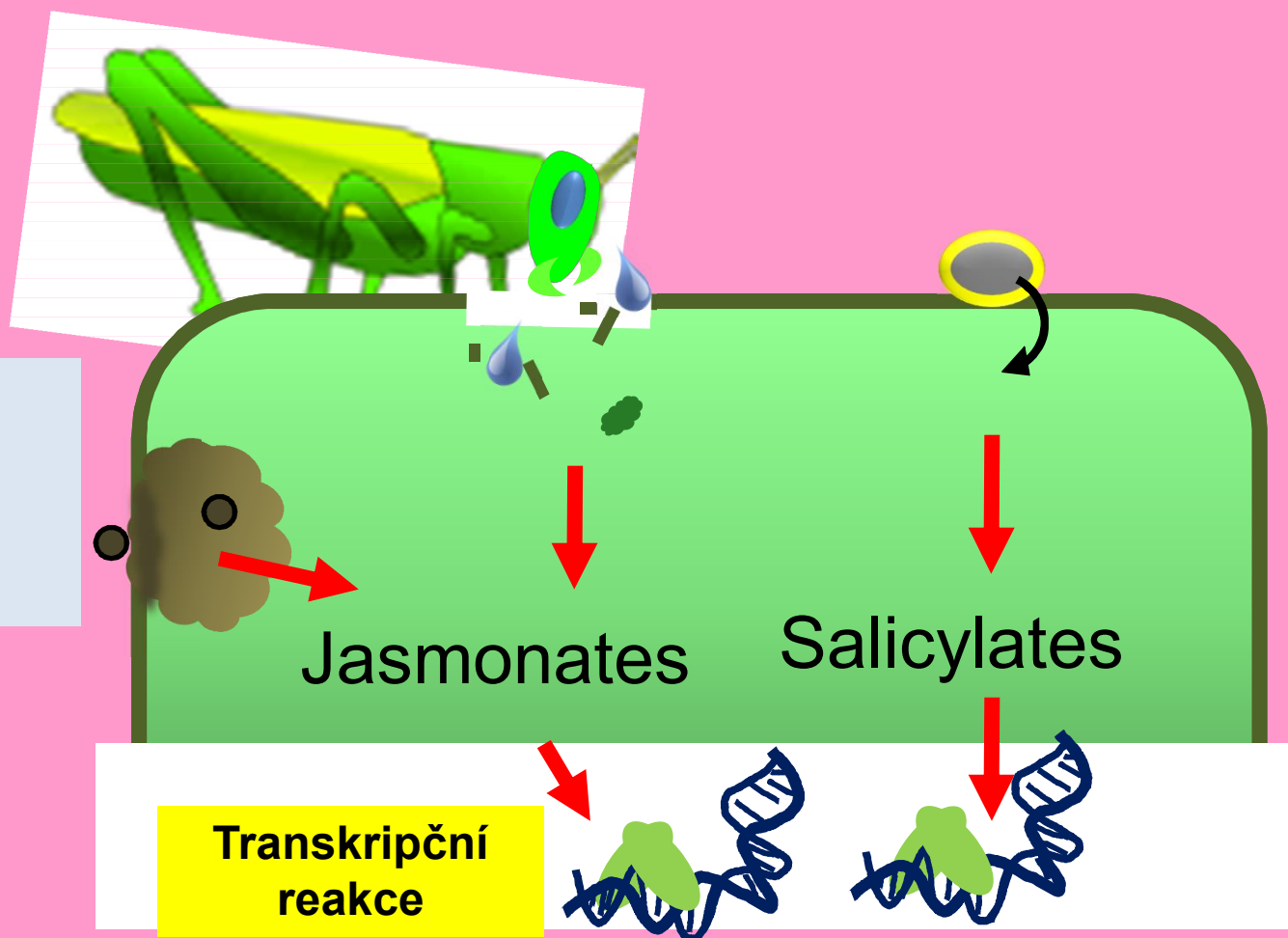
Zvýšená produkce MeJA vede k ochraně proti nekrotrofickým patogenům

JMT je indukována poraněním nebo MeJA



Jasmonáty se podílejí na obraně rostlin k hmyzu a nekrotrofům.

Hmyz a nekrotrofy spouští produkci jasmonátů. Biotrofy spouští produkci salicylátů.



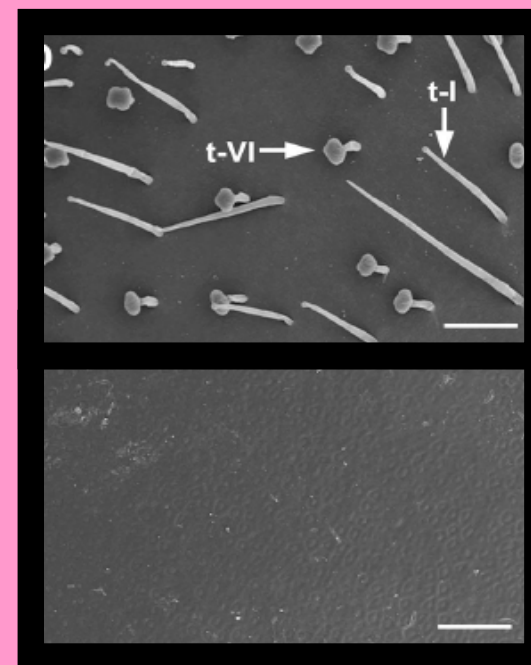
## Jasmonáty přispívají ke kontrole vývoje a růstu

### Samčí a samičí reprodukční vývoj



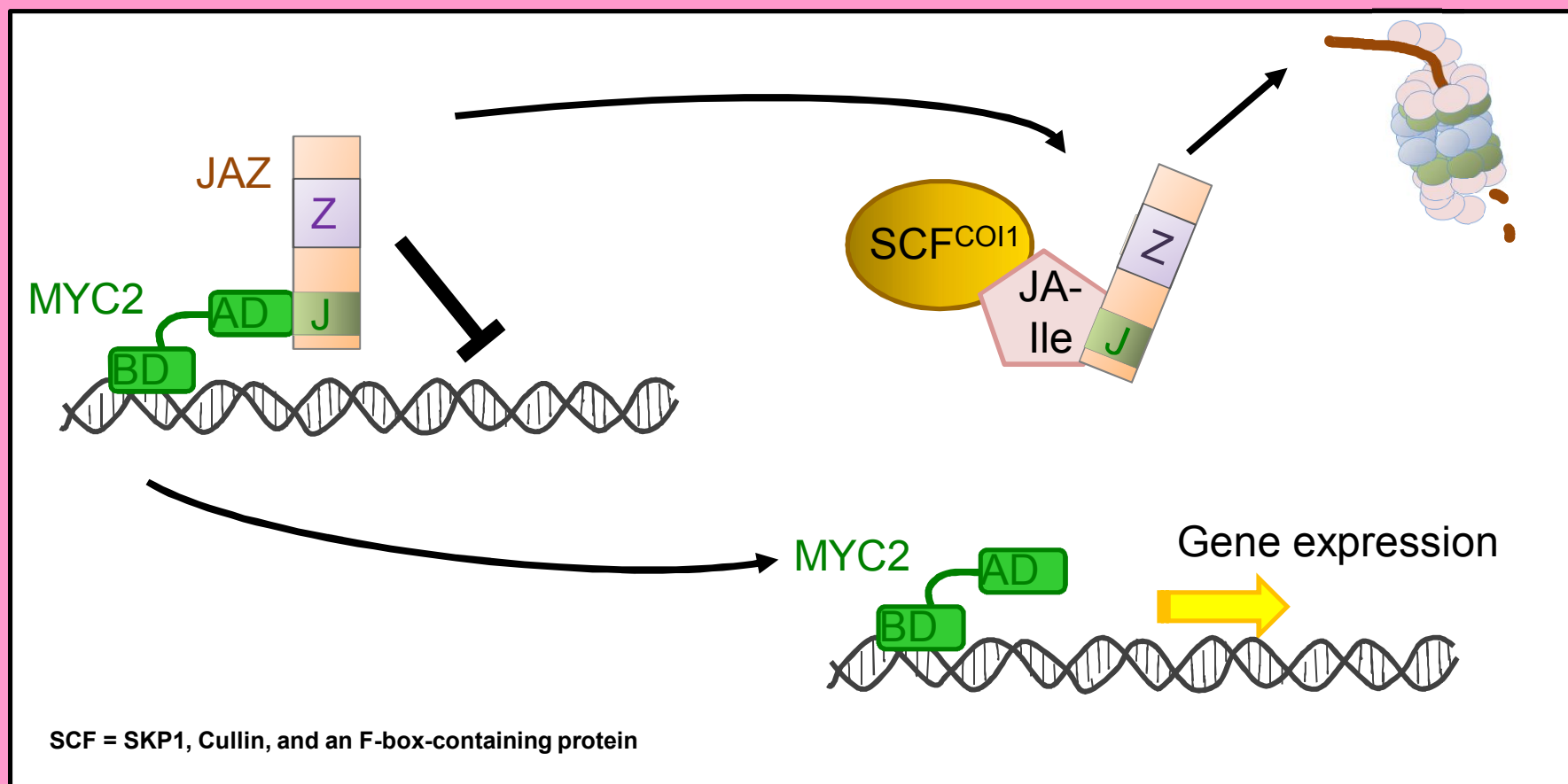
Kontrola buněčného cyklu,  
senescence a vzájemných interakcí.

### Tvorba trichomů

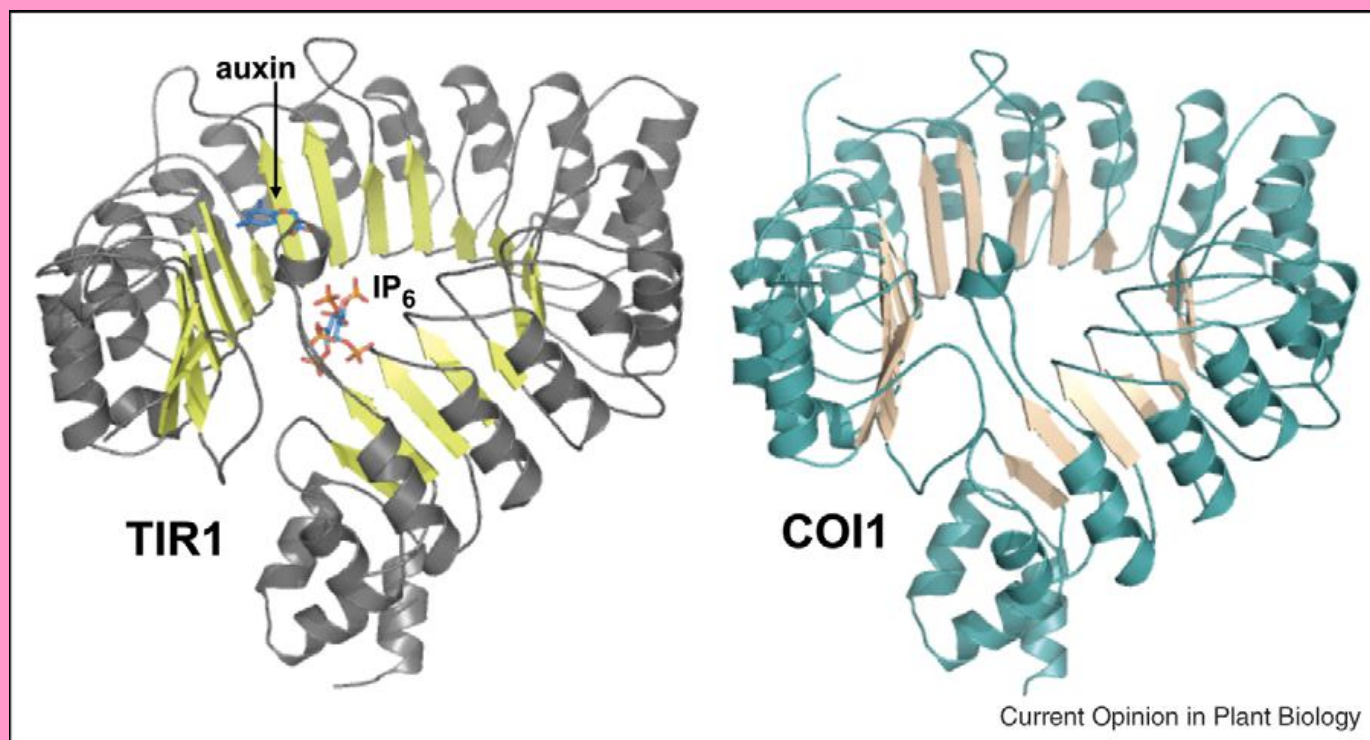


## Signální dráhy JA

- JA-Ile se váže ke co-receptoru COI1-JAZ (součást SCF komplexu)
- Dochází k ubiquitinaci a degradaci proteinů JAZ
- Uvolňuje se transkripční aktivace transkripčních faktorů MYC2
- MYC2 aktivuje expresi obranných genů (kódující např. proteiny toxické pro škůdce)

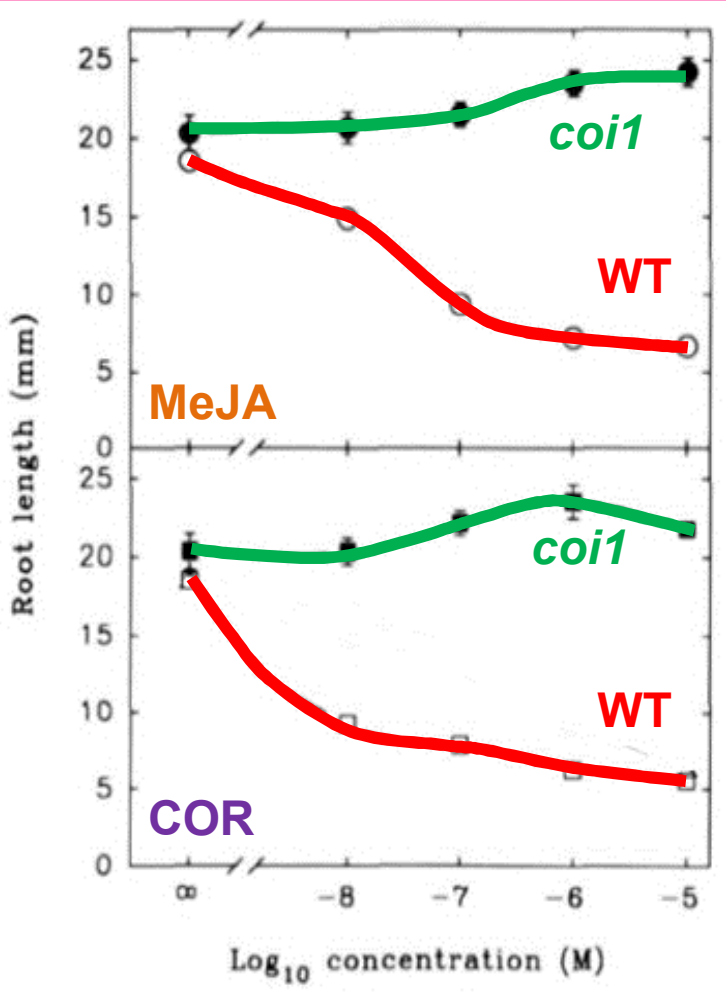
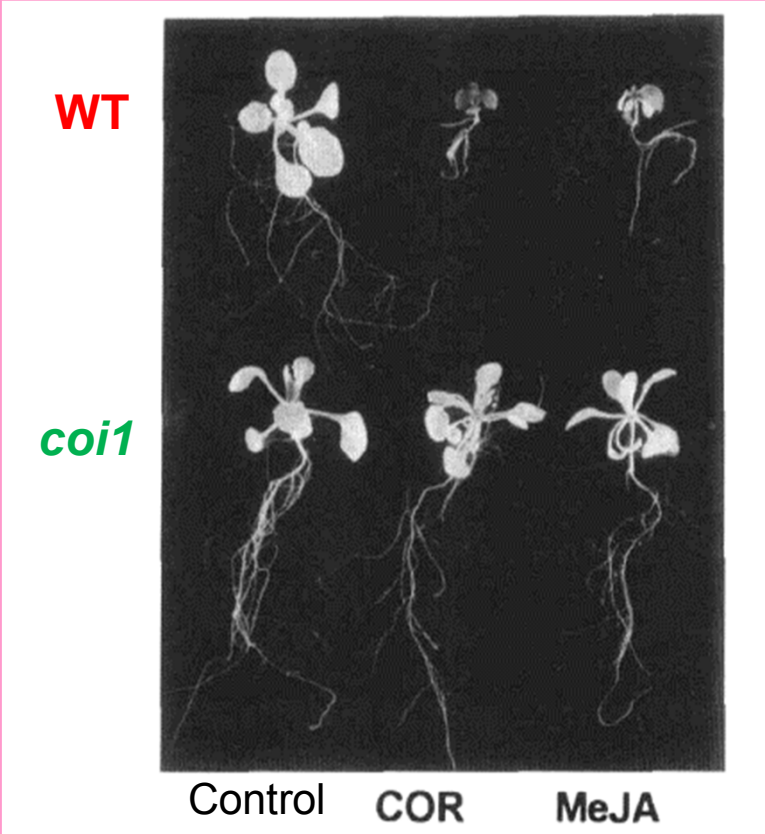


COI1 je F-box protein velice podobný auxinovému receptoru TIR1.

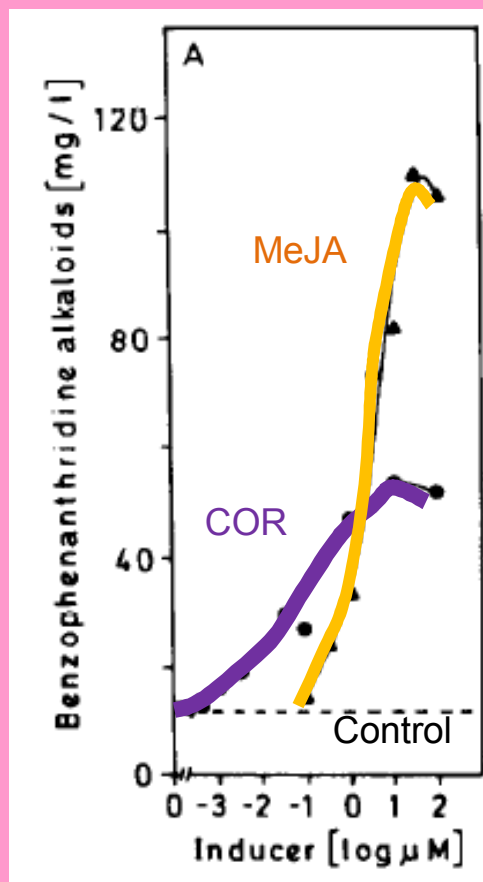


Tato podobnost  
naznačuje princip  
fungování  
systému.

JA receptor COI byl identifikován pomocí *Arabidopsis* mutanta *coi1*, který je necitlivý ke coronatinu a MeJA

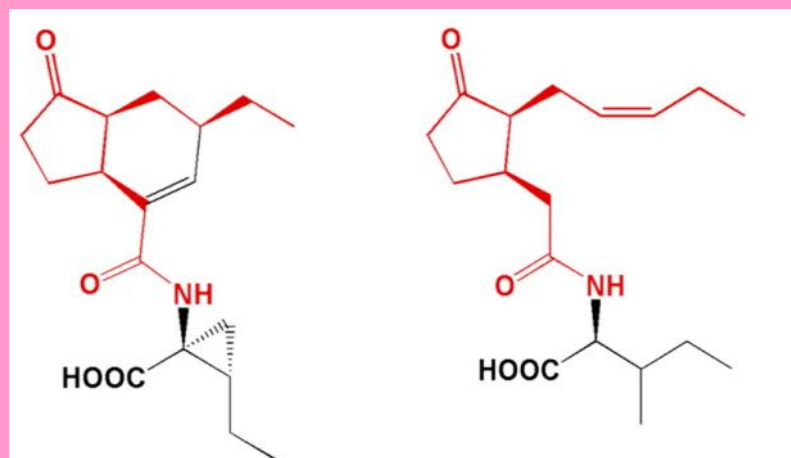


Coronatin je bakteriální látka, které napodobuje účinky jasmonátů.



MeJA nebo coronatin (COR) indukuje obranné látky v kultivovaných buňkách kalifornského máku.

Coronatin (COR) je toxin produkovaný některými patogeními bakteriemi. Coronatin napodobuje účinky jasmonátu a strukturně se podobá JA-Ile.



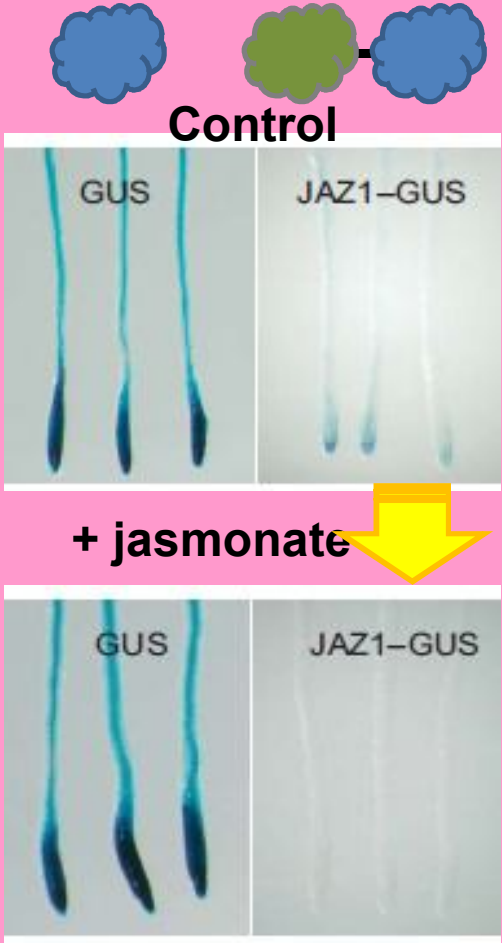
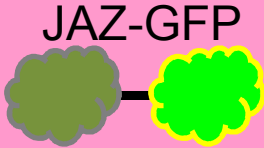
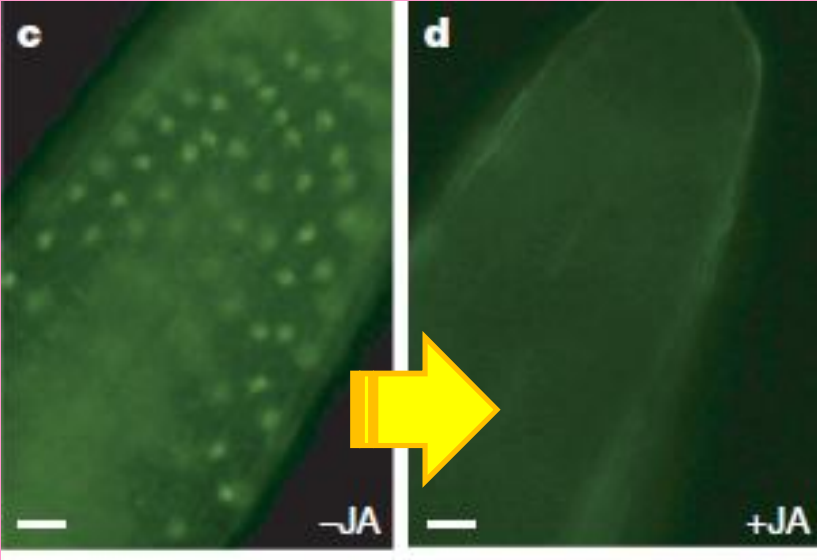
Coronatine

(3R,7S)-JA-Ile

*Eschscholzia californica* – Sluncovka kalifornská

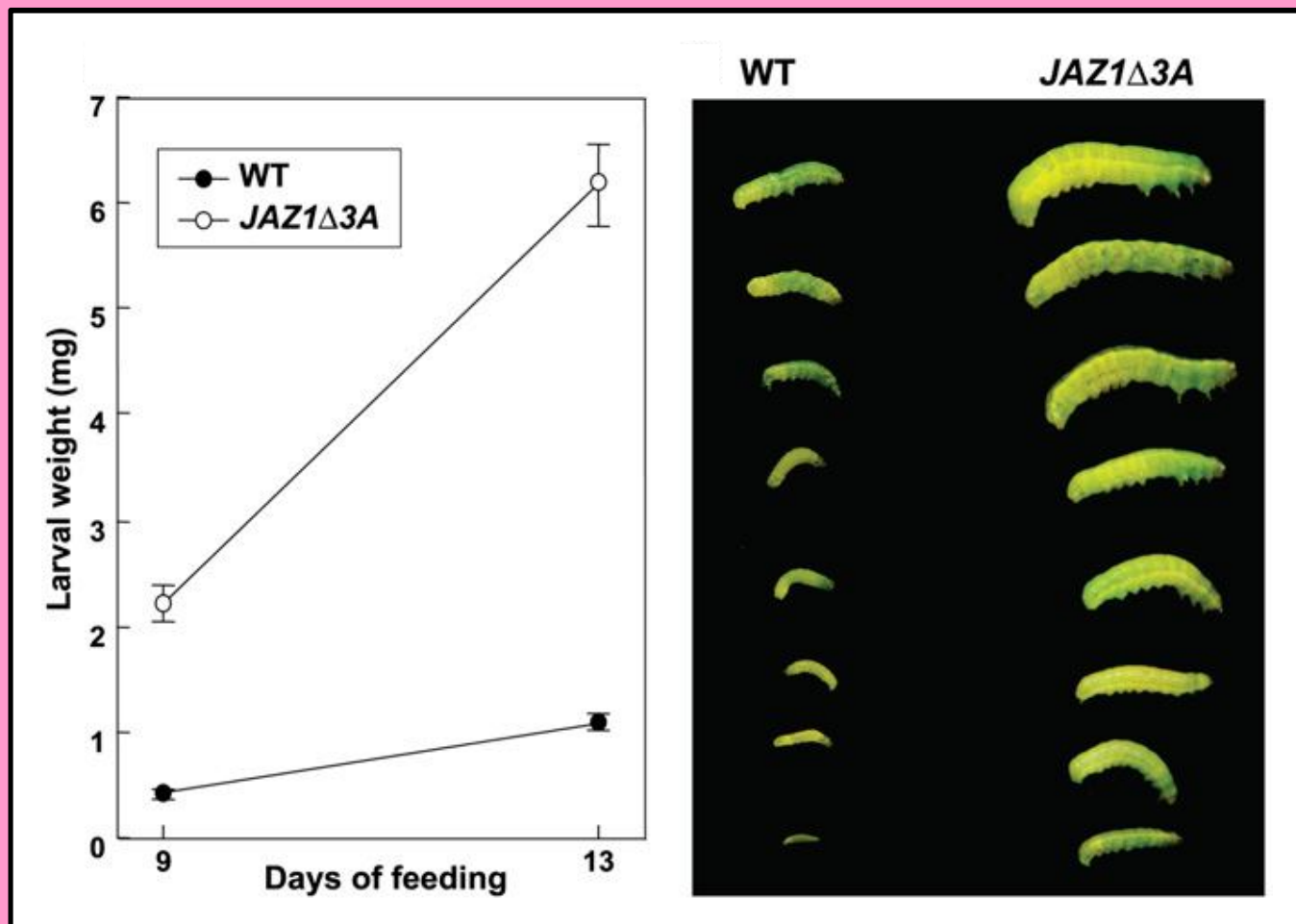


Za přítomnosti jasmonátů proteiny JAZ podléhají rychlé degradaci.



Stabilita proteinů byla testována u transgenních rostlin exprimujících JAZ-GFP nebo JAZ-GUS konstrukty.

Rostlinám exprimujícím stabilizované proteiny JAZ chybí obrana proti hmyzu.



Rostliny se stabilizovanými proteiny JAZ mají defekt v obranných reakcích. Je to vidět na růstu housenek, které se těmito rostlinami živily.

Proteiny JAZ obsahují konzervovanou doménu Jas a doménu ZIM/TIFY.



	TIFY motif	ZIM domain
JAZ1	PLTIFYAGQ	VIVFNDFSAEKAKEVINIA
JAZ2	PLTIFYGGR	VMVFDDFSAEKAKEVIDIA
JAZ3	QLTIFYAGS	VCVYDDISPEKAKAIMLIA
JAZ4	QLTIFYAGS	VLVYQDIAPEKAÇAIMLIA
JAZ5	QLTIFFGGK	VLVYNEFPVDKAKEIMEVA
JAZ6	QLTIFFGGK	VMVFNEFPEDKAKEIMEVA
JAZ7	ILTIIFYNGH	MCVSSDLTHLEANAILSIA
JAZ8	RITIFYNGKM	CFSSDVTHLÇARSIISIA
JAZ9	QLTIFYGGT	ISVFNNISPDKAÇAIMLCA
JAZ10	PMTIFYNGS	VSVF-QVSRNKAGEIMKVA
JAZ11	QLTIIFGGS	SFSVFDGIFAEKVQEILHIA
JAZ12	QLTIFFGGS	SVTVFDGLPSEKVQEILRIA

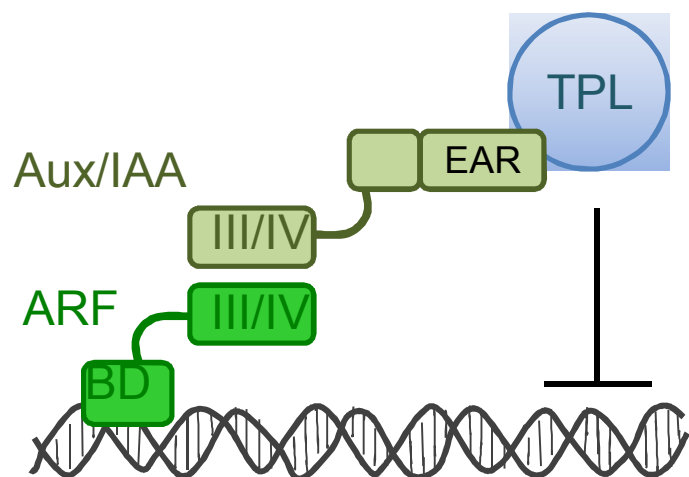
Doména **Jas** usnadňuje interakci JAZ s proteiny COI1 a MYC2. Doména **ZIM** (také zvaná **TIFY**) je dimerizační doména sloužící k interakci s dalšími JAZ proteiny a proteinem NINJA.

Doména ZIM proteinu JAZ umožňuje interakci s proteinem NINJA

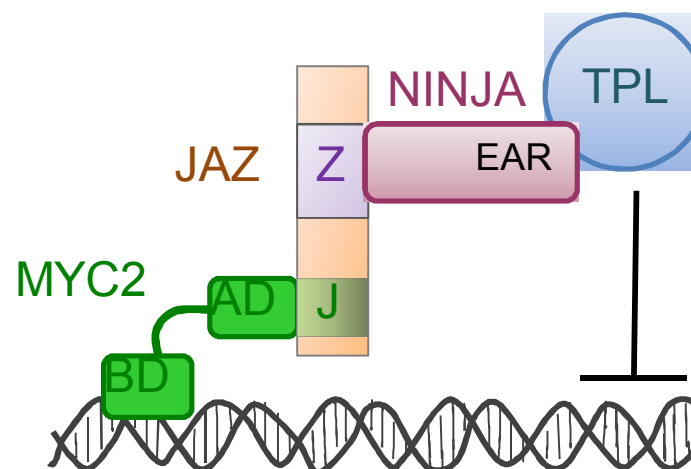


NINJA interaguje s TOPLESS (TPL)

Při absenci hormonů protein TOPLESS potlačuje transkripci.



TOPLESS se váže přímo k EAR doméně represorů Aux/IAA.



TOPLESS se váže nepřímě k JAZ prostřednictvím NINJA.

## Jasmonátová signální dráha

