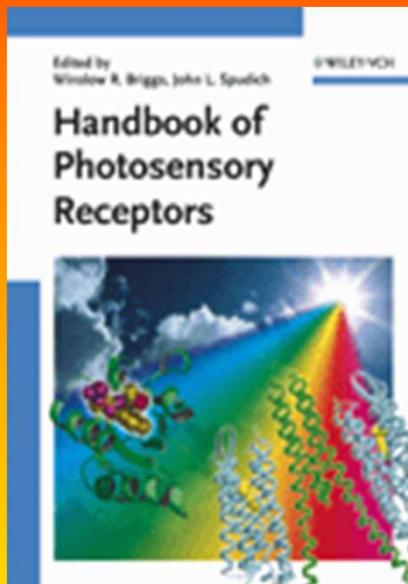
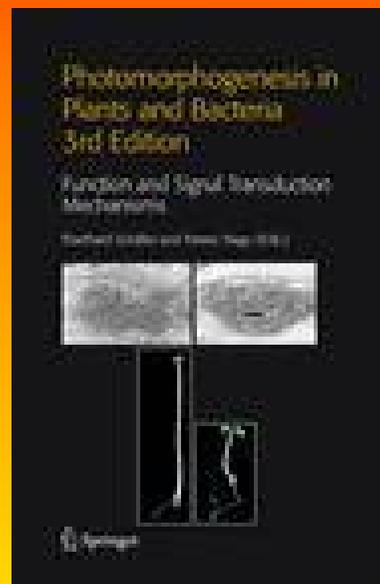


# 1) Úloha červeného světla a fytochromů ve vývoji a růstu rostlin

- Vlastnosti a lokalizace fytochromů
- Reakce rostlin zprostředkované fytochromy
- Ekologické funkce fytochromů
- Buněčný a molekulární mechanismus funkce fytochromů



Briggs WR, Spudich JL (eds) (2005) Handbook of Photosensory Receptors, Wiley-VCH



Schäfer E, Nagy F (eds) (2006) Photomorphogenesis in Plants and Bacteria, 3rd ed., Springer



Smith H (2013) Plant and Light Development. Butterworth-Heinemann

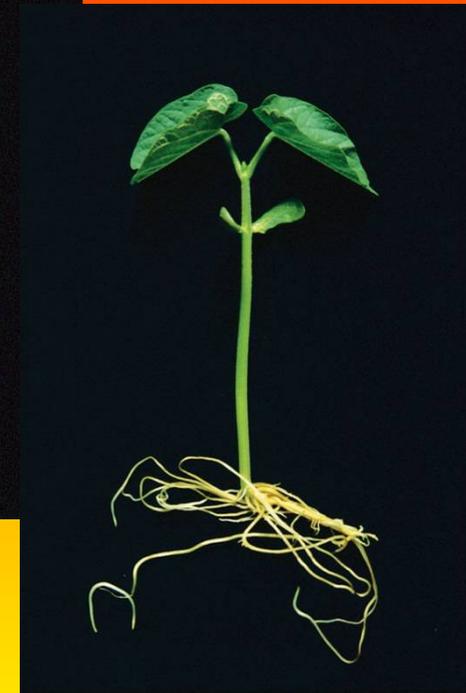
**Růst ve tmě**  
(etioloizovaný růst, skotomorfogeneze)



„Skoto“ = tma



**Růst na světle**  
(fotomorfogeneze)

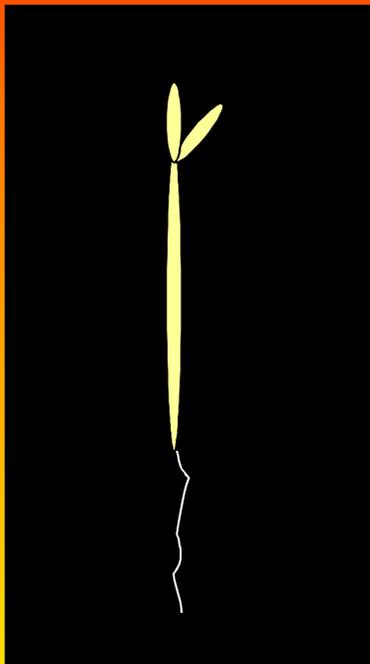


# Fotomorfogeneze

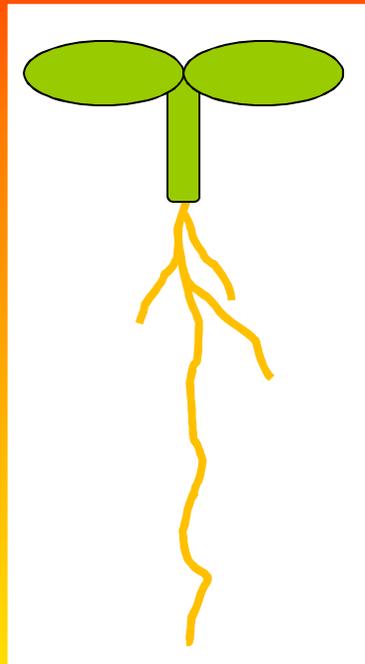
Proces, při kterém světlo jako signál změni vývoj rostliny tak, aby mohla pro svůj další růst využít světlo jako energii.

(Světlo je zdrojem informace pro adaptaci růstu a vývoje k prostředí)

Tma



Světlo



**Základní fotomorfogenní reakce:**

- inhibice prodlužování
- stimulace syntézy chlorofylu
- stimulace růstu listu

Při fotomorfogenezi je světlo zachycováno pigmenty, které jsou součástí **fotoreceptorů**:

- **červeného světla: fytochromy A až E (phytochromes)**
  
- **modrého světla a UV-A: kryptochromy, fototropiny (cryptochromes, phototropins) a LOV-domains/F-box proteiny:**
  - ZTL (ZEITLUPE, německy „zpomalený pohyb“)
  - FKF1 (FLAVIN BINDING, KELC REPEAT, F-BOX PROTEIN 1)
  - LKP2 (LOV KELCH PROTEIN 2)
  
- **UV-B: UVR8 (UV RESISTANCE LOCUS 8)**

Update 2020

Liu H et al. (2020) *Journal of Integrative Plant Biology* 62: 1267-1269

## a) Vlastnosti a lokalizace fytochromů

**Fytochrom = proteinový pigment modré barvy identifikován v r. 1959**

**Reakce rostlin indukované fytochromy:**

- **stimuluje klíčení**
- **stimuluje de-etiolizaci (např. otevírání listů)**
- **stimuluje tvorbu listových primordií a růst listů**

- **inhibuje prodlužování**

**TABLE 17.1**

Typical photoreversible responses induced by phytochrome in a variety of higher and lower plants

Group	Genus	Stage of development	Effect of red light
Angiosperms	<i>Lactuca</i> (lettuce)	Seed	Promotes germination
	<i>Avena</i> (oat)	Seedling (etiolated)	Promotes de-etiolation (e.g., leaf unrolling)
	<i>Sinapis</i> (mustard)	Seedling	Promotes formation of leaf primordia, development of primary leaves, and production of anthocyanin
	<i>Pisum</i> (pea)	Adult	Inhibits internode elongation
	<i>Xanthium</i> (cocklebur)	Adult	Inhibits flowering (photoperiodic response)
Gymnosperms	<i>Pinus</i> (pine)	Seedling	Enhances rate of chlorophyll accumulation
Pteridophytes	<i>Onoclea</i> (sensitive fern)	Young gametophyte	Promotes growth
Bryophytes	<i>Polytrichum</i> (moss)	Germling	Promotes replication of plastids
Chlorophytes	<i>Mougeotia</i> (alga)	Mature gametophyte	Promotes orientation of chloroplasts to directional dim light

PLANT PHYSIOLOGY, Third Edition, Table 17.1 © 2002 Sinauer Associates, Inc.

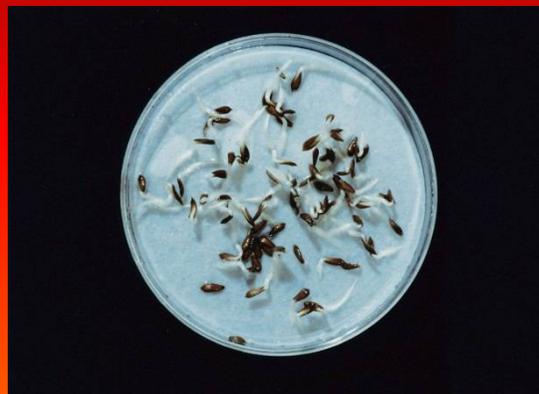
**Přijem světla fytochromy  
a přenos signálu se liší  
v různých orgánech**



Efekt červeného světla (R; 650-680 nm) je eliminován červeným světlem o větší vlnové délce (FR; 710-740 nm)



Dark



R



R

FR



R

FR

R



R

FR

R

FR

→ 2 hypotézy

## 2 hypotézy vysvětlující R – FR reverzibilitu

- 1) Existence dvou pigmentů – pro R a FR – antagonisticky regulují klíčení
- 2) Existence jediného pigmentu – mění svoji formu z R-absorbující na FR-absorbující

Hypotéza potvrzena. Reverzibilní vlastnosti potvrzeny *in vitro*



## 3 následující témata

- 1) Fotoreverzibilita a její vztah k reakci fytochromu
- 2) Struktura fytochromu a konformační změny
- 3) Geny kódující fytochromy a jejich funkce ve fotomorfogenezi

# 1) Fotoreverzibilita a její vztah k reakci fytochromu

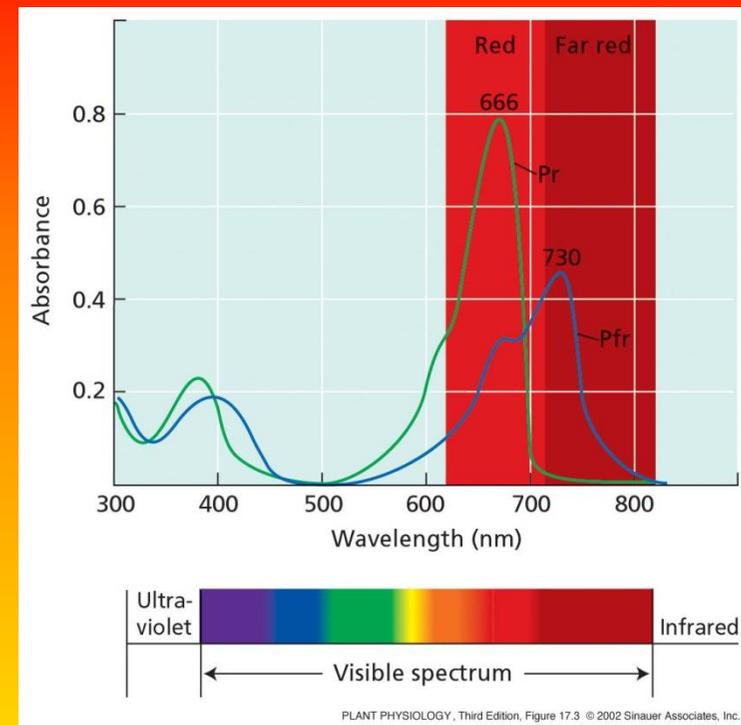


Forma fytochromu absorbující R: **Pr**

**Pr** syntetizován ve tmě *de novo*



Fotostacionární stav: **Pr** : **Pfr** = **98%** : **2%**



[Pfr]  $\cong$  [fyziologická reakce]

[Pr]  $\not\cong$  [fyziologická reakce]



Tma = prodlužování  
(stimulace)

Pr  $\uparrow$   $\rightarrow$  Pfr  $\downarrow$



Světlo = zkracování  
(inhibice)

Pr  $\downarrow$   $\rightarrow$  Pfr  $\uparrow$

**Pfr je fyziologicky aktivní forma fytochromu => absence Pfr způsobuje neschopnost rostliny reagovat na světlo**

## 2) Struktura fytochromu a konformační změny

Fytochrom = rozpustný protein, ~ 250 kDa, 2 podjednotky = dimer

Fytochrom = chromofor + apoprotein  
 (pigment) (polyptid, 125 kDa)

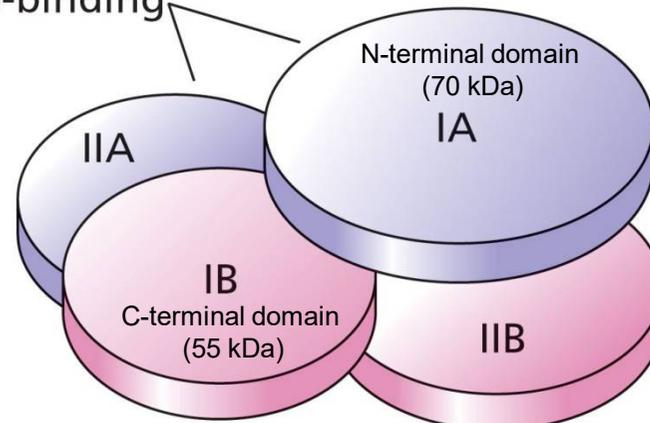
Vyšší rostliny:

Chromofor = lineární tetrapyrrol = fytochromobilin

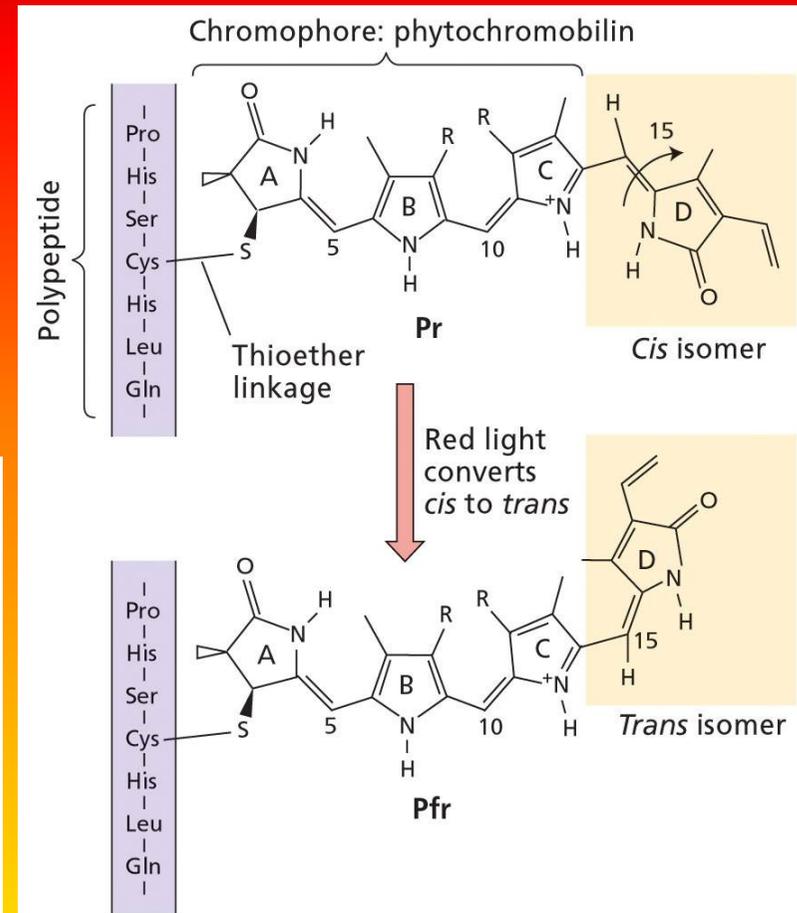
Fytochromobilin + apoprotein = holoprotein

### Dimer fytochromu

Chromophore-binding domains



PLANT PHYSIOLOGY, Third Edition, Figure 17.5 © 2002 Sinauer Associates, Inc.



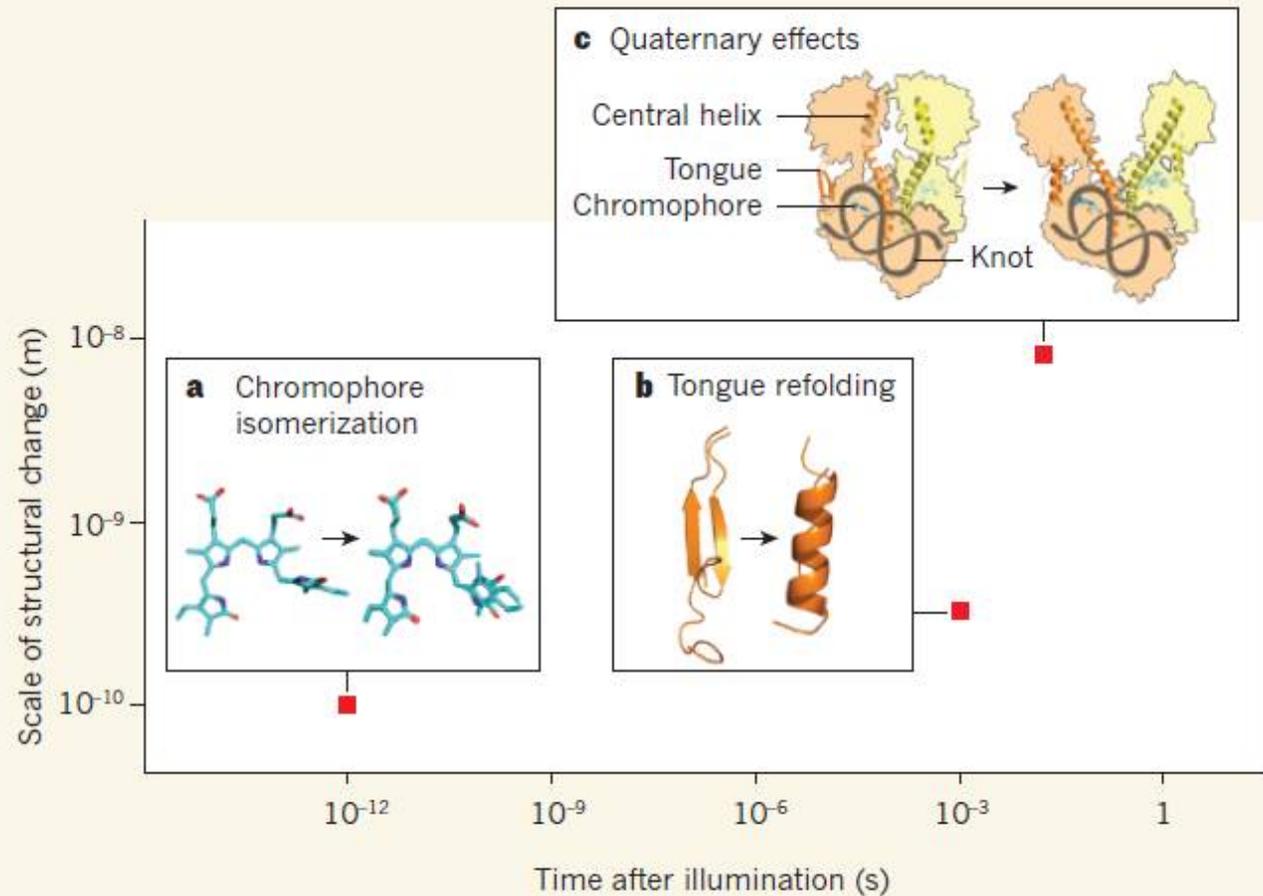
PLANT PHYSIOLOGY, Third Edition, Figure 17.4 © 2002 Sinauer Associates, Inc.

## Update 2014

Baker AW, Forest KT (2014)  
Nature 509: 174–175

Takala et al. (2014)  
Nature 509: 245-258

a) Světlem indukované konformační změny chromoforu z formy *cis* na *trans*



b) Reorganizace klíčové sekundární struktury zvané „tongue“: struktura  $\beta$ -hairpin se mění na strukturu  $\alpha$ -helix (tisícina sekundy).

c) Uzavřená kvarterní struktura fytochromu (vyskytující se ve tmě) se otevírá a vzniká konformace ve tvaru Y; typická pro fytochrom v buňkách na světle (~ setina sekundy).

### 3) Geny kódující fytochromy a jejich funkce ve fotomorfogenezi

Typ I **PHYA**

Typ II **PHYB**

**PHYC**

**PHYD**

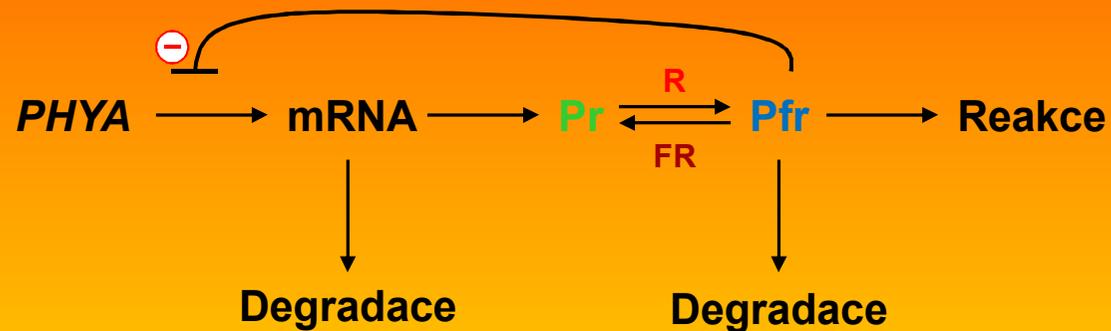
**PHYE**

Konvence:

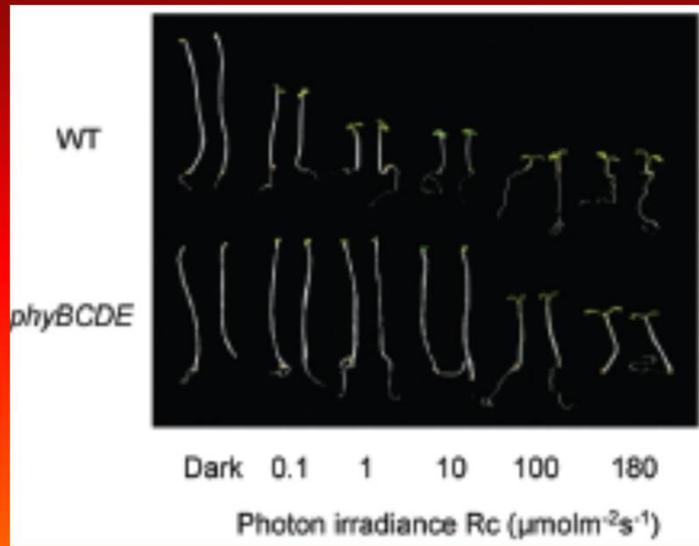
PHYA = apoprotein

phyA = celý fytochrom = apoprotein + chromofor

**PHYA** – exprese inhibována světlem => transkripčně aktivní v etiolizovaných rostlinách (jednoděložné)



❖ dvouděložné – degradace Pfr



Analýza quadruple mutanta při  $160 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$   
*phyBphyCphyDphyE* – de-etiolizace a vývoj  
 rostliny až do kvetení



Při vysokých ozářeních (nad  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ):

- phyA není degradován
- phyA funguje jako světelný senzor

Franklin KE, Whitela GC (2007) Plant Sign Behavior 2: 1-3

Analýza quintuple mutanta u *Arabidopsis* (*phyAphyBphyCphyDphyE*):  
 fytochromy nejsou jedinými receptory červeného světla, ale rostlina  
 bez fytochromů inkubovaná na RL zastavuje svůj růst brzy po vývoji  
 děloh; modré světlo přijímané kryptochromy tuto blokádu vývoje  
 uvolňuje.

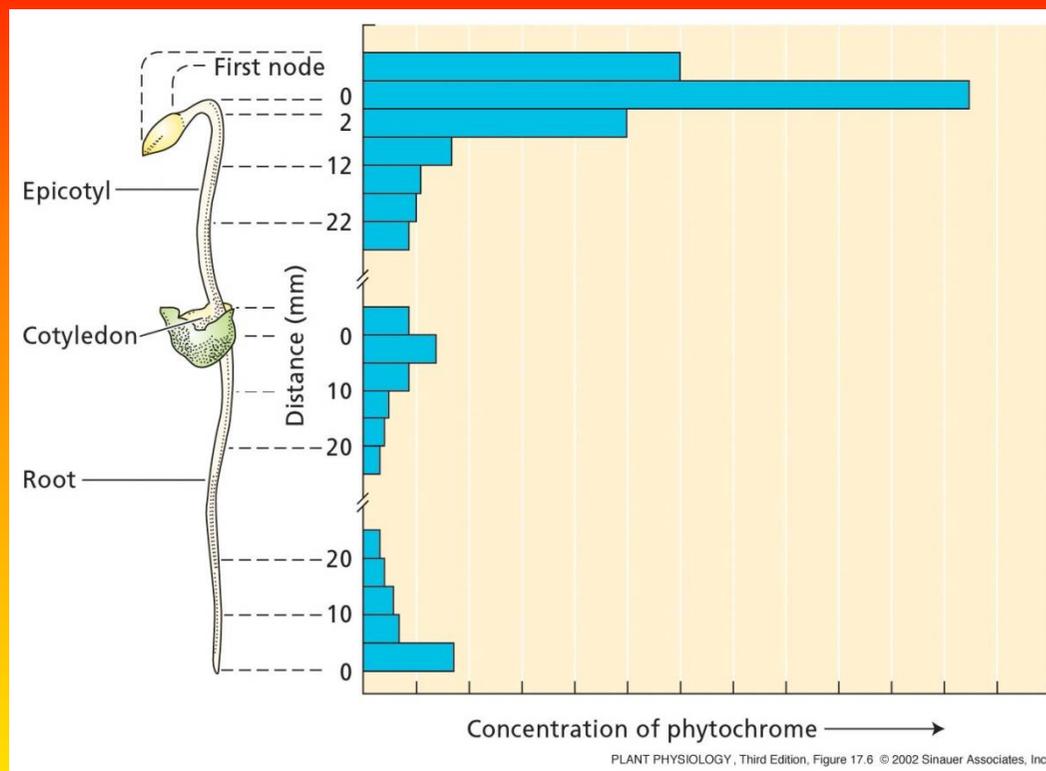
**PHYB - E** – exprese není ovlivňována světlem => transkripčně aktivní v etiolizovaných  
 i zelených rostlinách; proteiny phyB - E jsou stabilnější



## Lokalizace fytochromů v buňkách a pletivech

Znalost lokalizace fytochromů napovídá o jejich funkcích

- Spektrofotometricky – etiolizované rostliny
- Vizualizace genové exprese pomocí reportérového genu *GUS*



## Konstrukt

Promotor *PHYA*

*GUS*



Transformace rostlin



Sledování exprese *PHYA*  
v buňkách a pletivech

## b) Reakce rostlin zprostředkované fytochromy

- 1) Rychlé (např. biochemické) reakce
- 2) Pomalejší morfologické změny ( + pohyb a růst)

**Lag fáze** = čas mezi stimulací světlem a pozorovatelnou reakcí

Krátká – několik minut (zvětšování a smršťování buněk)

Dlouhá – několik týdnů (kvetení)

**Ozářenost (fluence, fotonový proud)** = počet fotonů dopadajících na jednotku plochy ( $\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$ )

**Ozářenost za časovou jednotku (irradiance, fluence rate)** = počet fotonů dopadajících na jednotku plochy za jednotku času ( $\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ )

**Rozdělení reakcí podle rozsahu ozáření, které ji vyvolávají:**

## a) Very-low-fluence responses (VLFRs) (reakce k velmi slabé ozáření)

Indukované ozáření:  $0.0001 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$  ; saturace při  $0.05 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$

- Stimulace růstu koleoptile
- Inhibice růstu mezokotylu
- Stimulace klíčení semen *Arabidopsis*

## b) Low-fluence responses (LFRs) (reakce k nízké ozáření)

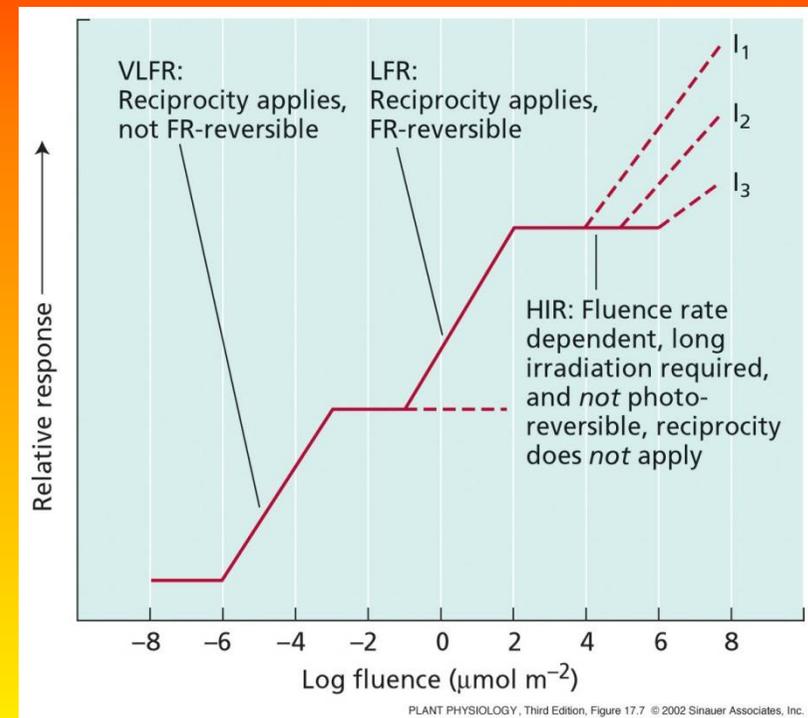
Indukované ozáření:  $1.0 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$  ; saturace při  $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$

- Klíčení semen salátu
- Regulace pohybu listů
- Klíčení semen *Arabidopsis*

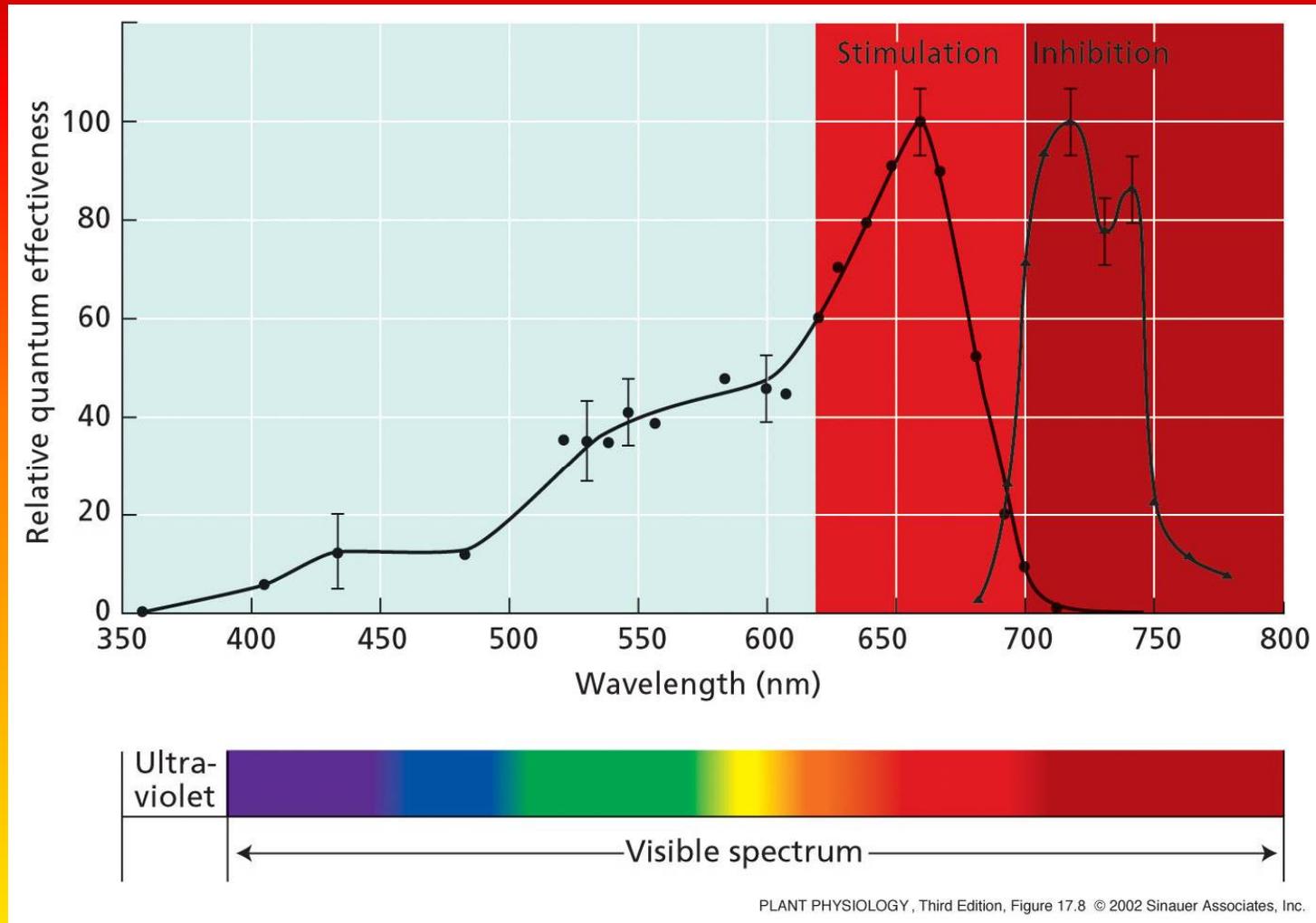
## c) High-irradiance responses (HIRs) (reakce k vysoké ozáření)

Vyžaduje prodloužení světelného impulsu či kontinuální světlo o vysoké intenzitě

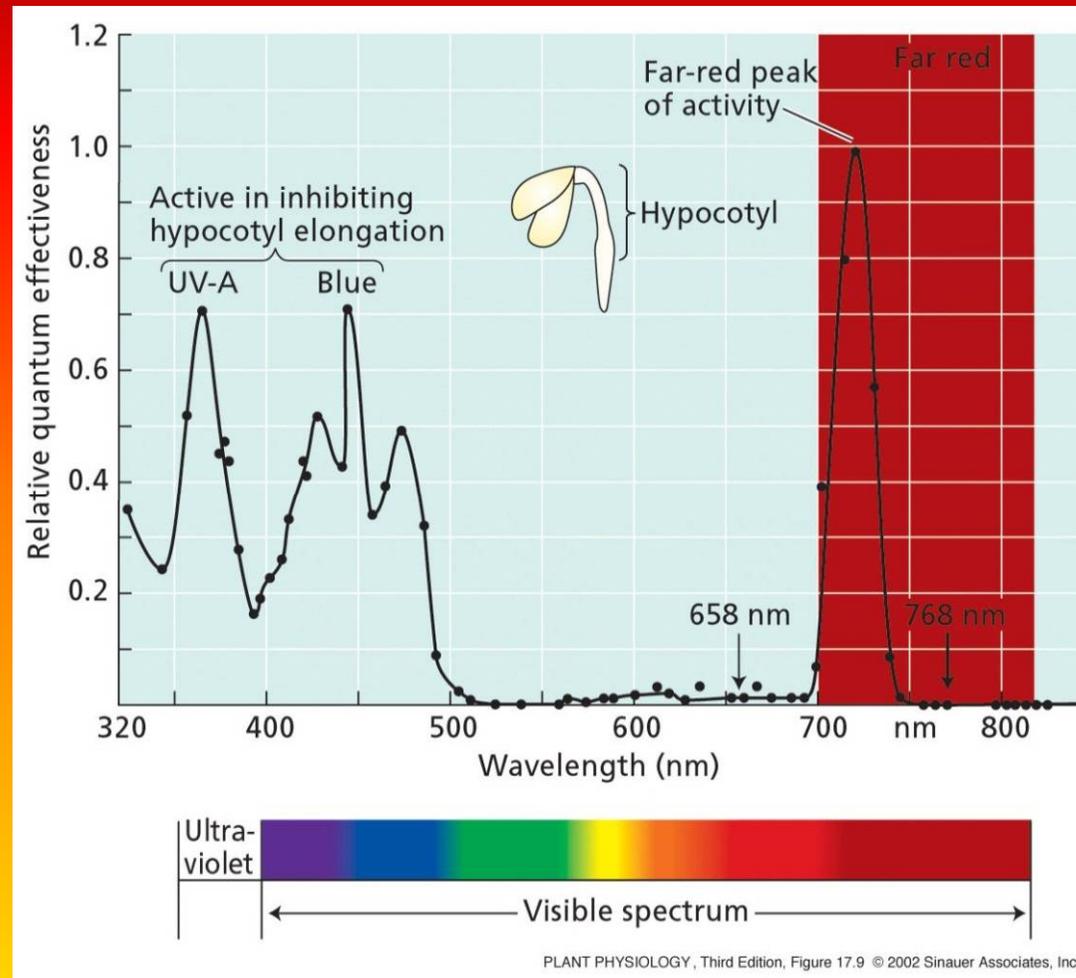
- Indukce syntézy antokyaninů
- Inhibice růstu hypokotylu
- Indukce kvetení
- Indukce produkce etylénu



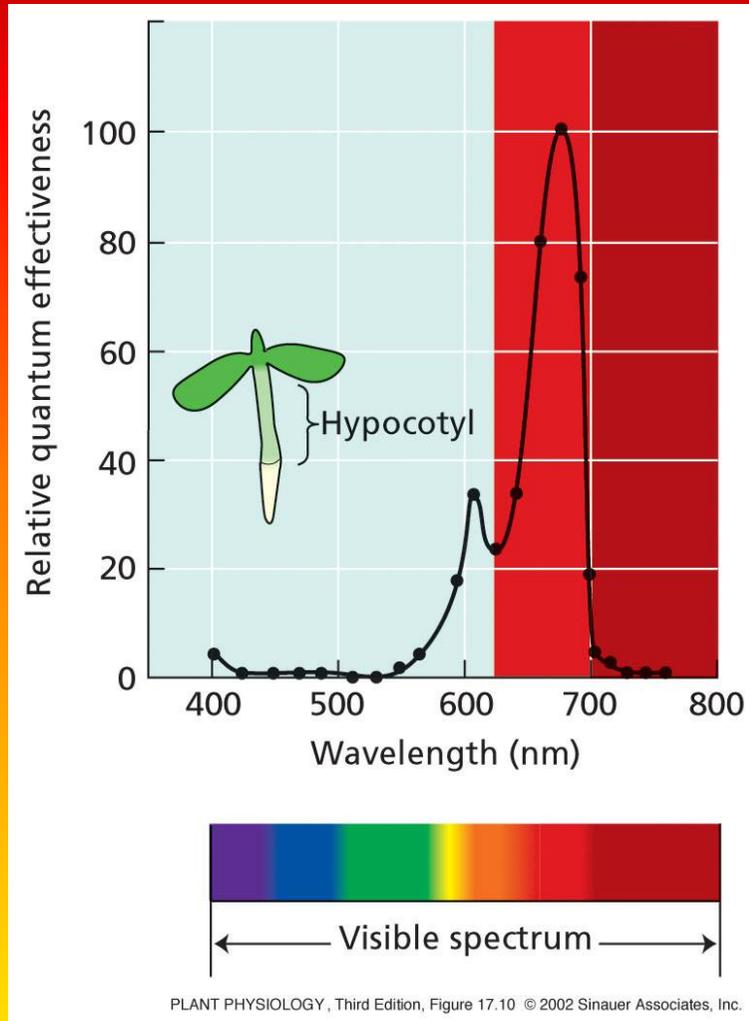
## Akční spektrum LFR pro fotoreverzibilní stimulaci a inhibici klíčení *Arabidopsis* semen



## Akční spektrum HIR pro inhibici prodlužování etiolizovaného hypokotylu



## Akční spektrum HIR pro inhibici prodlužování zeleného hypokotylu



Reakce rostlin k FR se snižuje tím víc, čím více se rostlina stává zelenější.



Akční spektrum HIR u zelených rostlin se posunuje do červené oblasti.

Ztráta citlivosti zelených rostlin k FR koreluje s úbytkem fytochromu typu I = phyA.



HIR etiolizovaných rostlin je zprostředkována phyA

zatímco

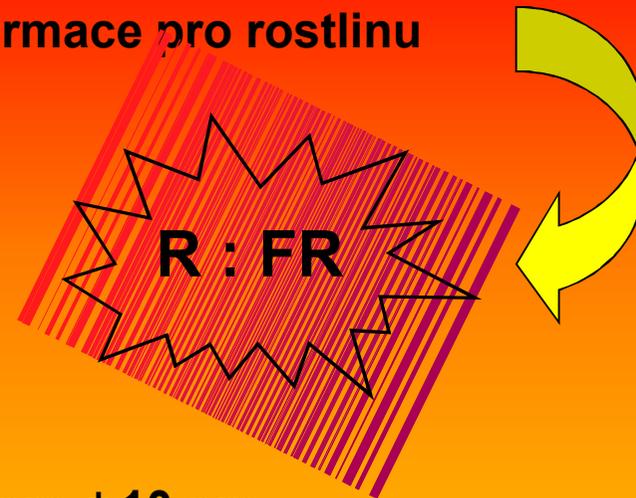
HIR zelených rostlin je zprostředkována phytochromem phyB

## c) Ekologické funkce fytochromů

R/FR reverzibilní pigment



Vlnové délky R a FR = informace pro rostlinu



$$R : FR = \frac{\text{Proud fotonů při } 660 \text{ nm } \pm 10 \text{ nm}}{\text{Proud fotonů při } 730 \text{ nm } \pm 10 \text{ nm}}$$

## R : FR v různých prostředích

**TABLE 17.3**  
Ecologically important light parameters

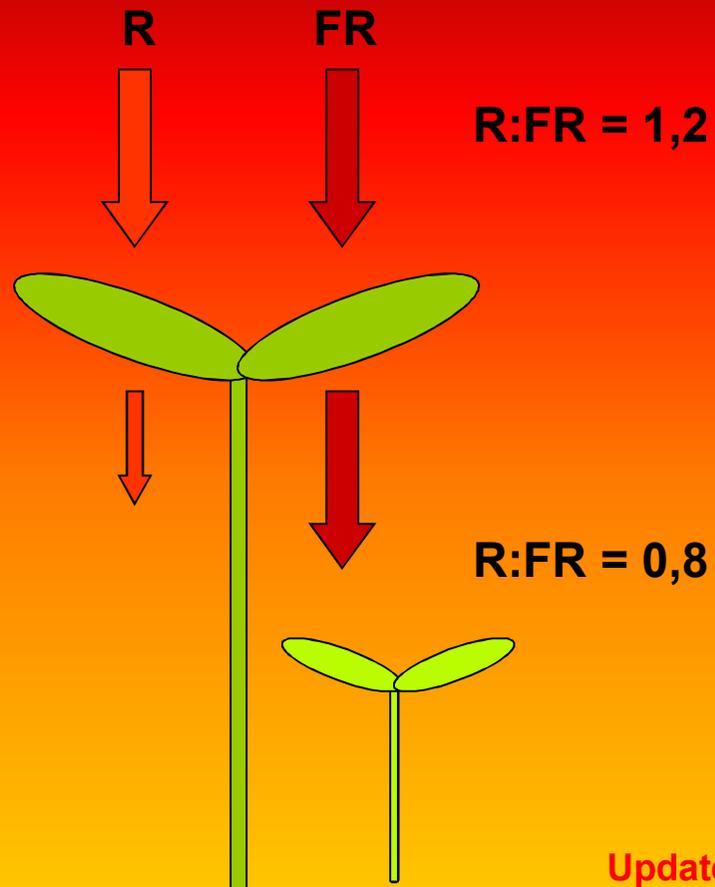
	Photon flux density ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	R/FR <sup>a</sup>
Daylight	1900	1.19
Sunset	26.5	0.96
Moonlight	0.005	0.94
Ivy canopy	17.7	0.13
Lakes, at a depth of 1 m		
Black Loch	680	17.2
Loch Leven	300	3.1
Loch Borrallie	1200	1.2
Soil, at a depth of 5 mm	8.6	0.88

Source: Smith 1982, p. 493.

Note: The light intensity factor (400–800 nm) is given as the photon flux density, and phytochrome-active light is given as the R:FR ratio.

<sup>a</sup>Absolute values taken from spectroradiometer scans; the values should be taken to indicate the relationships between the various natural conditions and not as actual environmental means.

## Shade avoidance (únik ze stínu) = reakce rostlin k zastínění



### Shade-avoidance reakce

- prodlužování
- redukce velikosti listů
- úbytek chlorofylu
- redukce tvorby sec. výhonů

Update 2020

Romero-Montepaone S et al. (2020) Plant Cell Environ 43: 1625-1363

Zvýšená teplota prostředí zvyšuje reakci rostlin k zastínění.

## Denní rytmy (circadian rhythms)

**Denní rytmy** = rytmické změny, při kterých se fáze vyšší aktivity střídají s fázemi o nižší aktivitě

Přetrvávají i bez přítomnosti exogenních faktorů => endogenní

Nutnost existence vnitřních stimulátorů (pacemakers)



### Endogenní oscilátory

- rostliny
- živočichové

- nezávislé na teplotě => funkční v různých klimatických podmínkách
- modulovány světlem => denní rytmus: 24 hodin

## Specializace fytochromů

Geny *PHYA* – *PHYE* jsou velice podobné, funkčně se však liší

***PHYB*** – identifikován analýzou mutanta *hy3* (nyní *phyB*): dlouhý hypokotyl na bílém světle; *PHYB* mRNA redukována, protein phyB není syntetizován.

### Mutant *phyB*:

- nereaguje na stín
- nereaguje k FR aplikovanému na konci dne
- není schopen reagovat na R/FR reverzibilní indukci klíčení

***PHYB*** je zodpovědný za citlivost rostlin k R a zprostředkuje fotoreverzibilní klíčení semen

## PhyA je receptor pro kontinuální FR.

Mutant *phyA*:

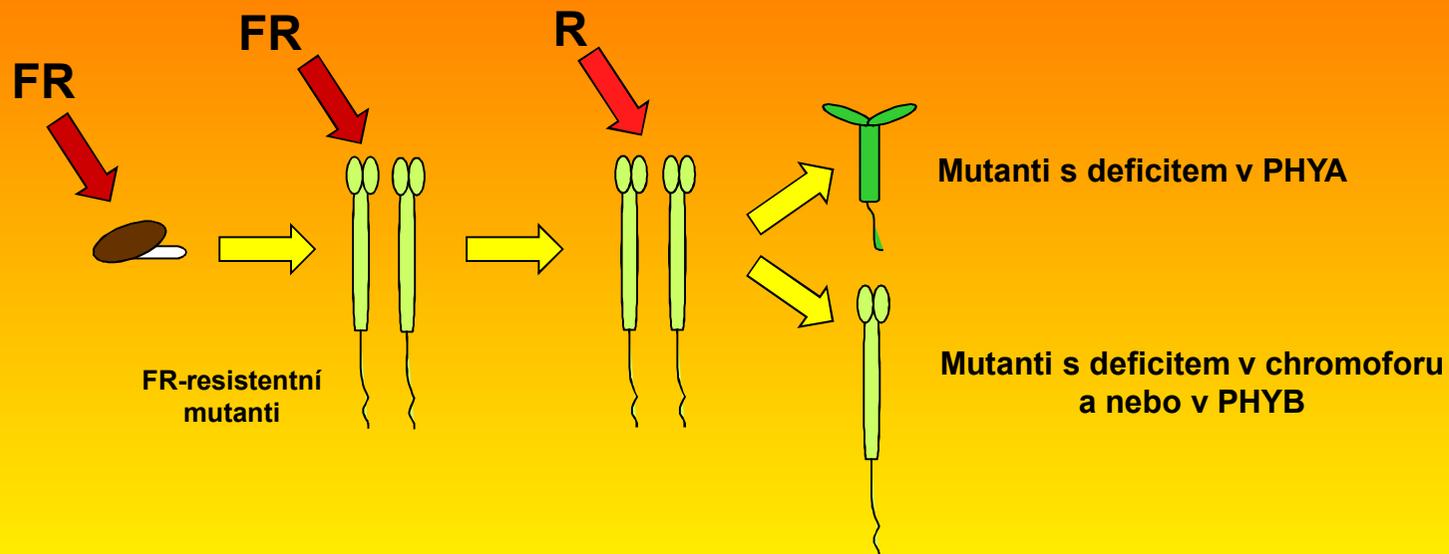
- neukazuje reakci k FR
- vytváří vysoký a tenký fenotyp

=

fenotyp mutantů s defektem  
v chromoforu či phyB



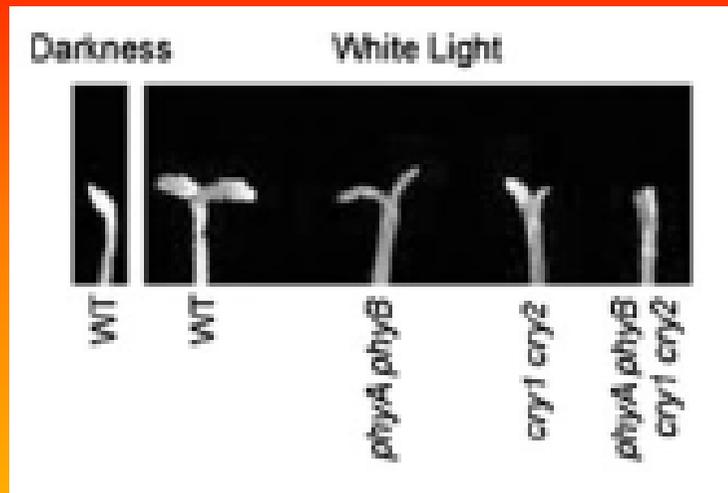
**Obtížné selektovat mutanta se specifickým defektem pouze v proteinu PHYA**



## Role fytochromů C, D a E ve vývoji rostlin

Funkce phyC, D a E se překrývají s funkcemi phyA a phyB. Hrají doplňkové role.

Analýza quadruple mutanta *phyAphyBcry1cry2* = fenotyp rostlin rostoucích ve tmě



ALE transkripční analýza ukázala expresi světlem regulovaných genů!!! Mutant ukazuje reakce denního cyklu!!!



Fotoreceptory phyC, D, E a nový receptor ZEITLUPE zprostředkují tuto expresi a reakce denního cyklu.

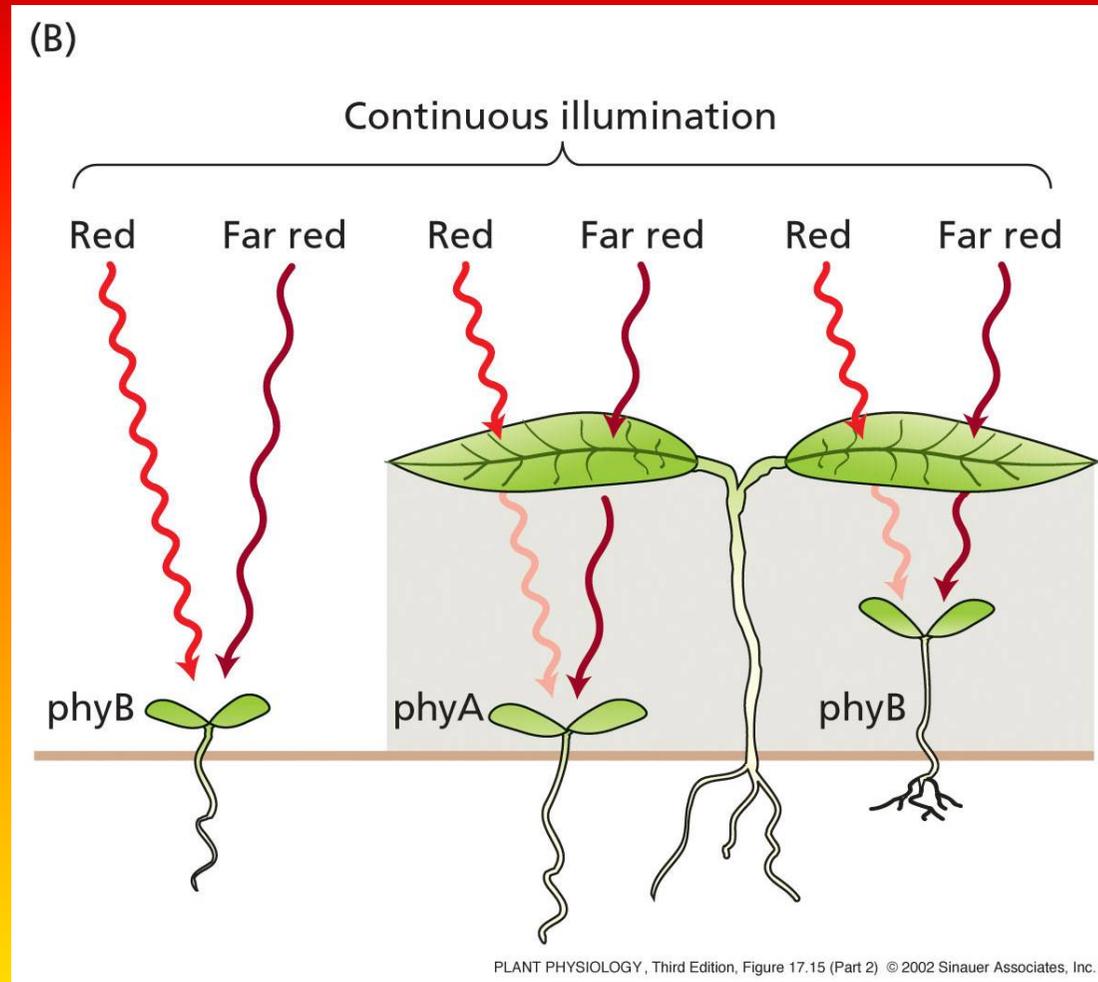
Perelman et al. (2003) Plant Physiol 133: 1717-1725

### Update 2016

Montgomery BL (2016) Frontiers in Plant Science 7, art. no. 480

Kong S-G, Okajima K (2016) Journal of Plant Research 129: 111-114

## Interakce phyA a phyB v shade-avoidance reakci



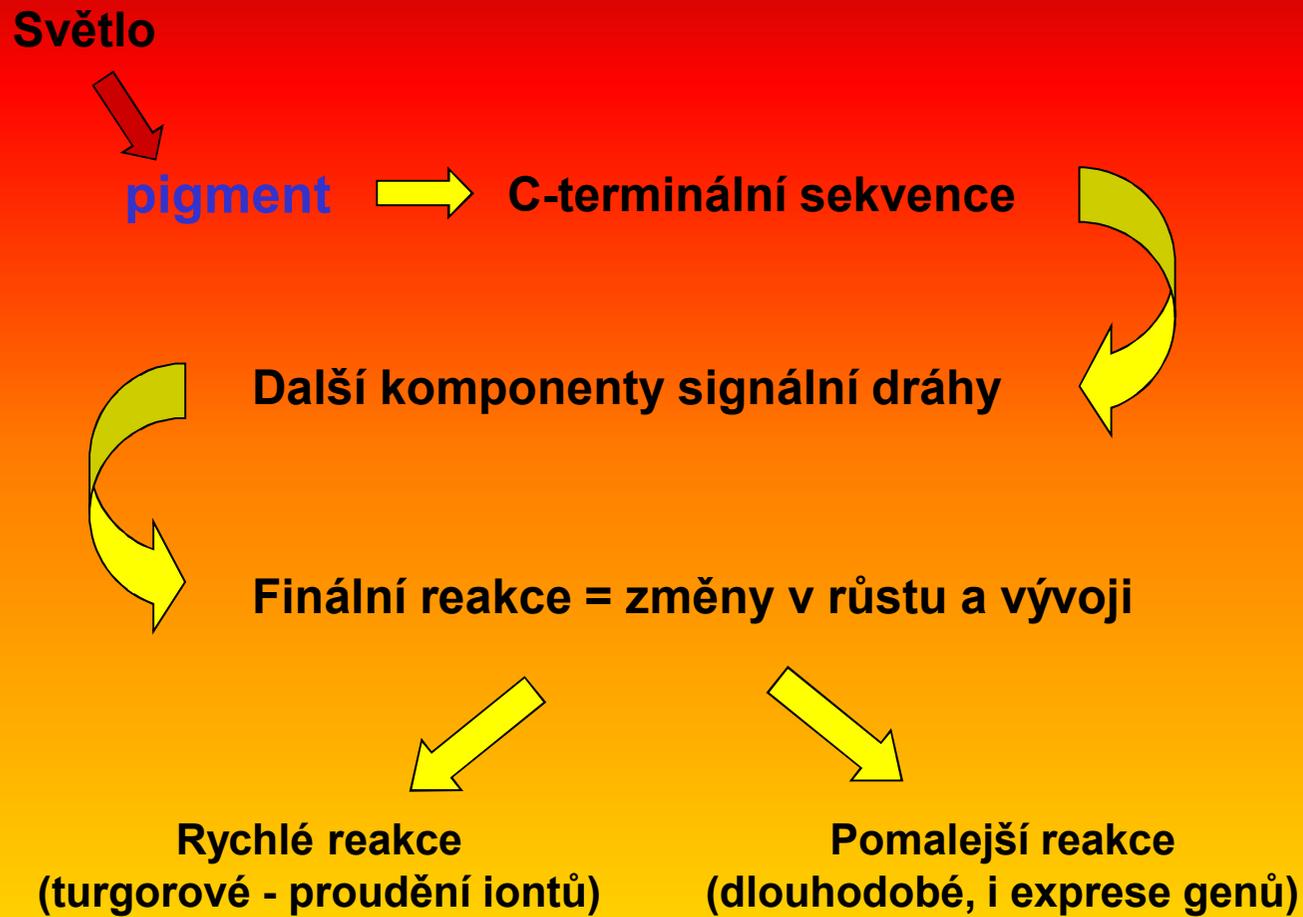
### Přímé sluneční světlo:

Hodně R => de-etiolizace  
řízena phyB

### Stín:

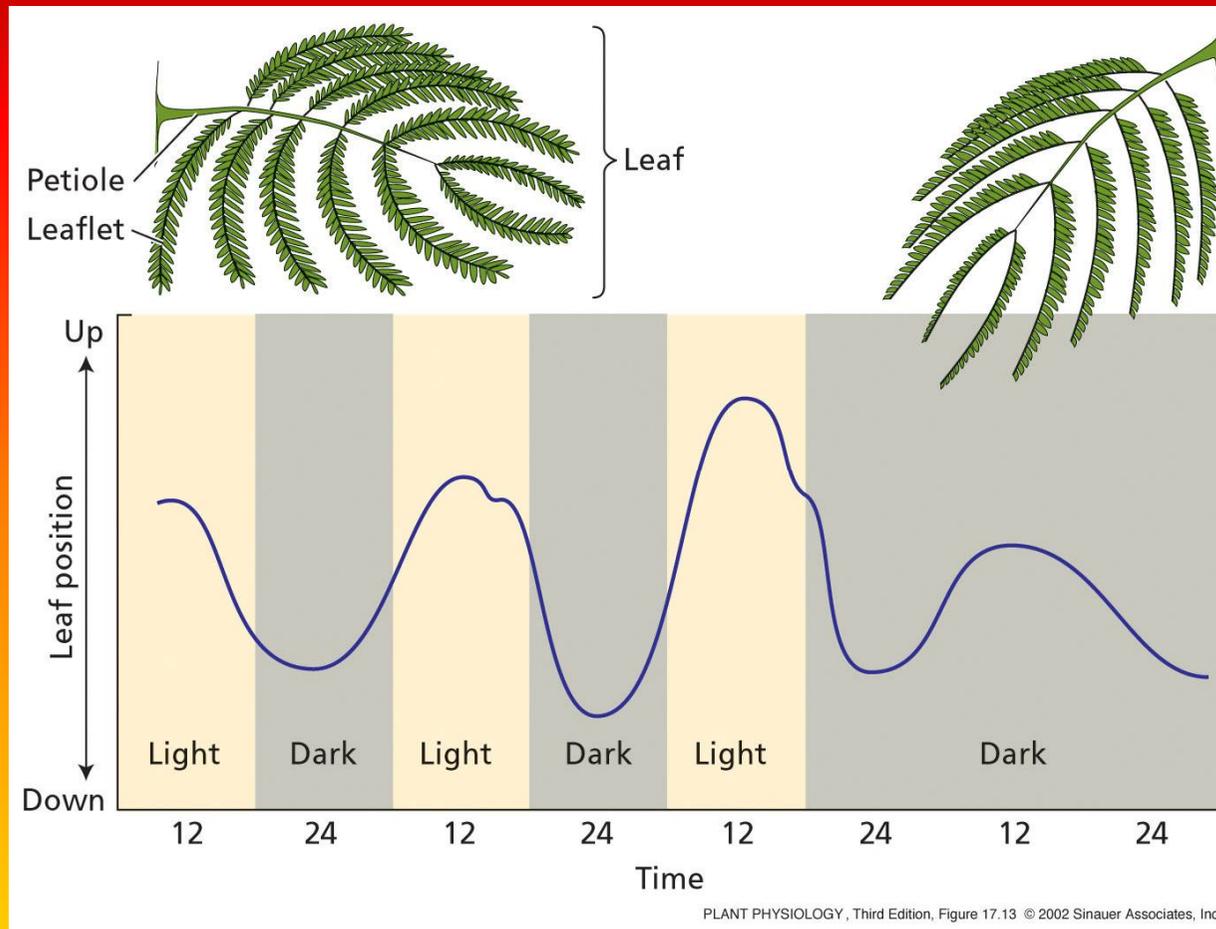
Hodně FR => zpočátku  
de-etiolizace řízena  
phyA. PhyA je labilní =>  
později de-etiolizace  
řízena phyB

## d) Buněčný a molekulární mechanismus funkce fytochromů



## Rychlé reakce

Nyktinastie listů a lístků citlivky stydlivé (*Mimosa*) – spící pohyb, př. cirkadiálního pohybu (střídání maxima a minima během 24 hodin)



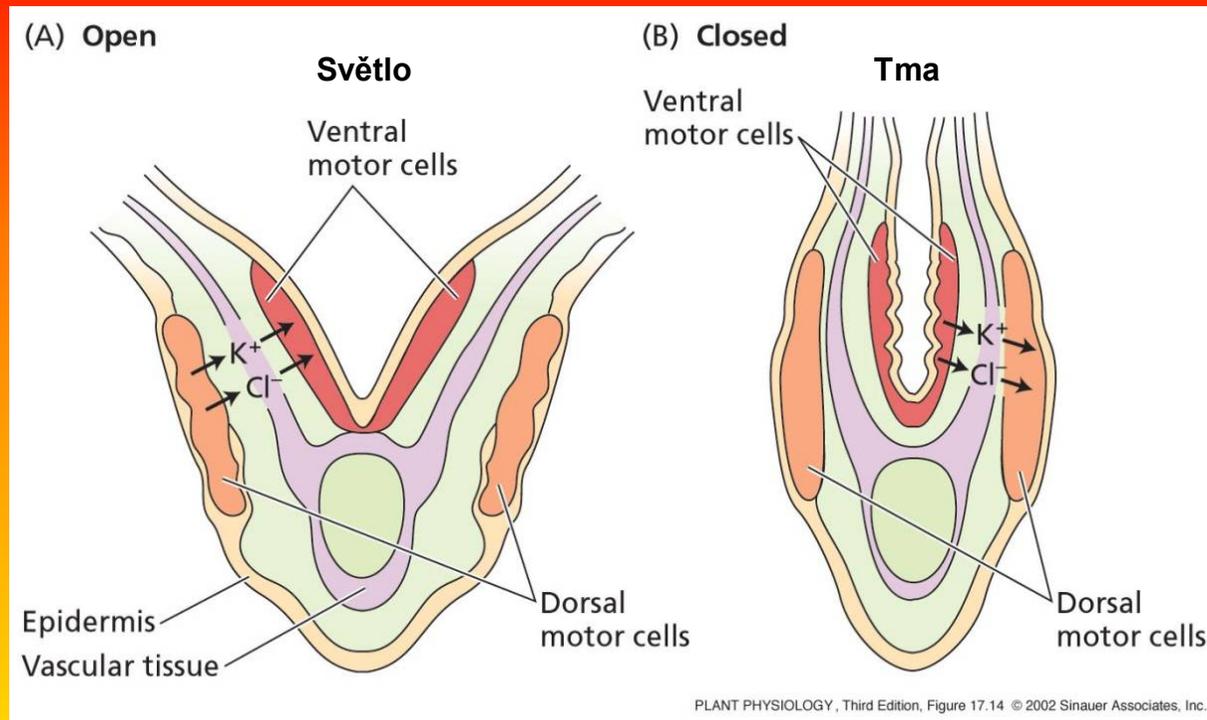
R (červené) a B (modré) světlo stimuluje  
otevírání listů; FR ruší efekt R

⇒ Zapojení fytochromů

## Fyziologický mechanismus pohybu listů – změny v turgoru buněk pulvinia

Změny v turgoru buněk dorzálních a ventrálních buněk  
= změny v proudění  $K^+$  a  $Cl^-$

Akumulace  $K^+$  a  $Cl^-$  ve ventrálních buňkách => zvětšení buněk => **otevírání listů**  
Ventrální buňky ztrácí  $K^+$  a  $Cl^-$  => smršťování buněk => **zavírání listů**



Regulace membránového potenciálu a proudění iontů zprostředkované fytochromy

Lag fáze zavírání listů ~ 5 minut => krátká doba na expresi genů => přímá indukce změny propustnosti membrány prostřednictvím fytochromů

## Pomalé reakce

### Fytochrom reguluje expresi genů



Phytochromy řídí aktivaci transkripčních faktorů (TF). Vstupují do jádra a stimulují transkripci specifických genů.

**Exprese ranných genů** = genů primární reakce (primary response genes) - nezávislá na syntéze proteinů (*MYB* geny)

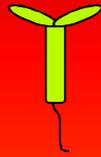
**Exprese pozdějších genů** = genů sekundární reakce (secondary response genes) - závislá na syntéze proteinů (*LHCB* geny)

## Fytochromem řízená regulace exprese genů *MYB* a *LHCB*

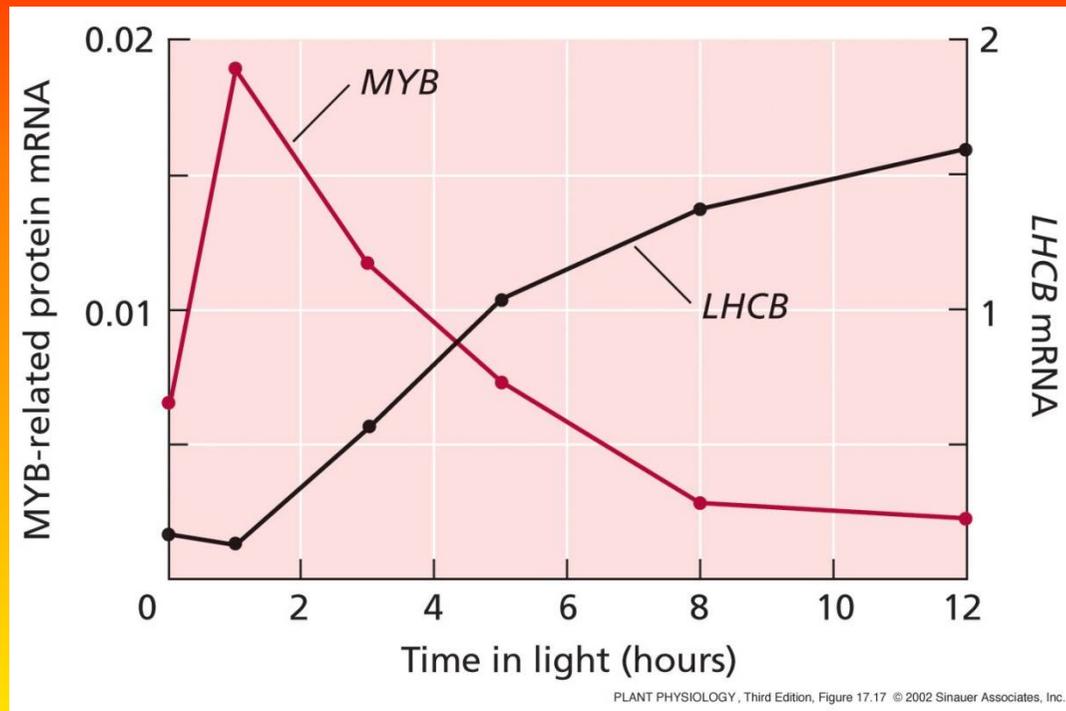
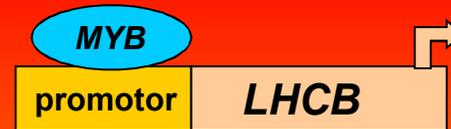
Tma



Světlo



Fytochrom → Transkripční faktor MYB → *LHCB*



*MYB* – geny primární reakce

*LHCB* – gen sekundární reakce

**CCA1 (Circadian Clock Associated1)** (patří k *MYB* genům) – reguluje expresi *LHCB* pomocí denního rytmu; konstitutivní exprese potlačuje denní rytmy, expresi *LHY* a expresi sám sebe

Mutace v *CCA1* vede k narušení regulace exprese *LHCB* denním rytmem a fytochromem

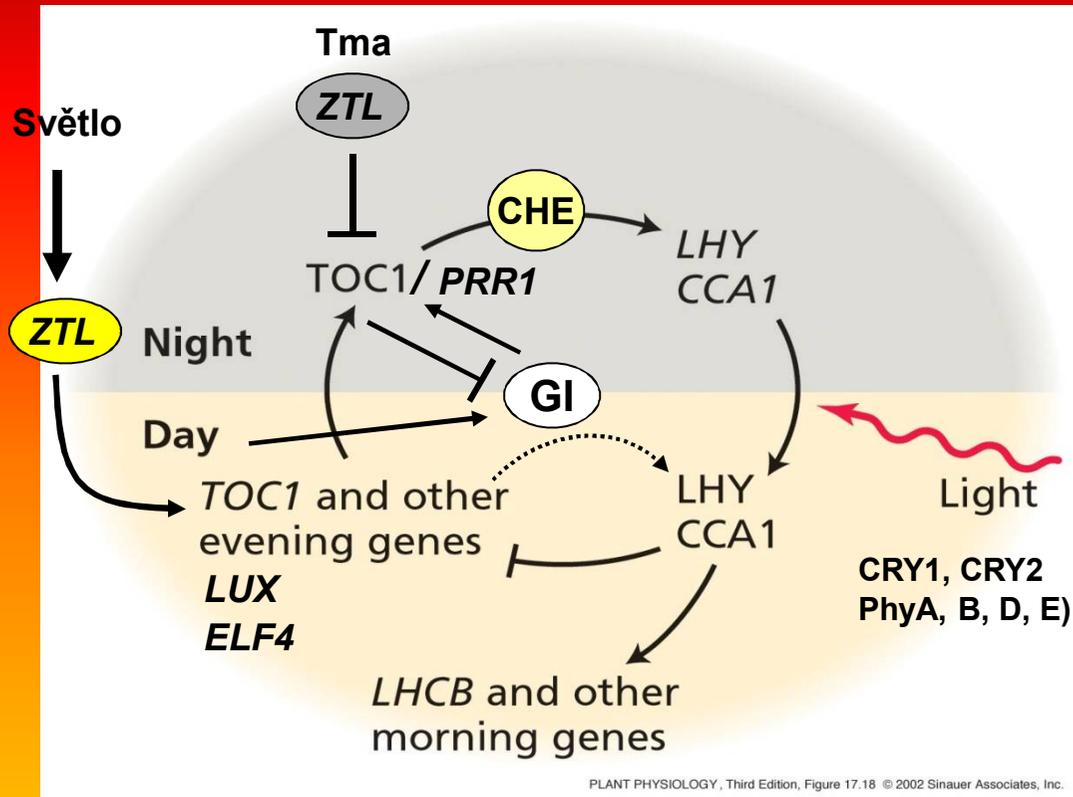
**LHY (Late elongated HYpocotyl)** (patří k *MYB* genům) – transkript osciluje s denním rytmem



**CCA1 a LHY hrají roli v denních rytmech**

## Denní oscilátor - transkripčně-translační negativní zpětná vazba – nalezen u bakterií, hub, hmyzu a savců; synchronizuje fyziologické a vývojové události rostliny s denními a ročními změnami v okolním prostředí

### Denní oscilátor u *Arabidopsis*



Alabadí D et al. (2001) Science 293: 880-883

Model interakce genů *LHY* a *CCA1*, plus genu *TOC1* navržen v r. 2001.

Světlo a *TOC1* aktivují expresi *LHY* a *CCA1* – světlo působí jako zesilovač *TOC1*



Steve Kay



C. Robertson McClung

**CHE** (**C**CA1 **H**iking **E**xpedition) - TF, blokuje expresi *CCA1* vazbou k jeho promotoru. *TOC1* se váže k **CHE**, blokuje **CHE** a uvolňuje expresi *CCA1*.

### Update 2015 a 2016

Romanovski A, Yanovsky MJ (2015) *Frontiers in Plant Science* 6: 1-11

Nohales MA, Kay SA (2016) *Nature Structural & Molecular Biology* 23: 1061-1069

**TOC1=Timing of CAB expression**

**Fytochrom funguje v jádře – aktivuje transkripční faktory. Je však lokalizovaný původně v cytoplazmě => musí být přemístěn do jádra.**

Sharma R (2001) Current Science 80: 178-188

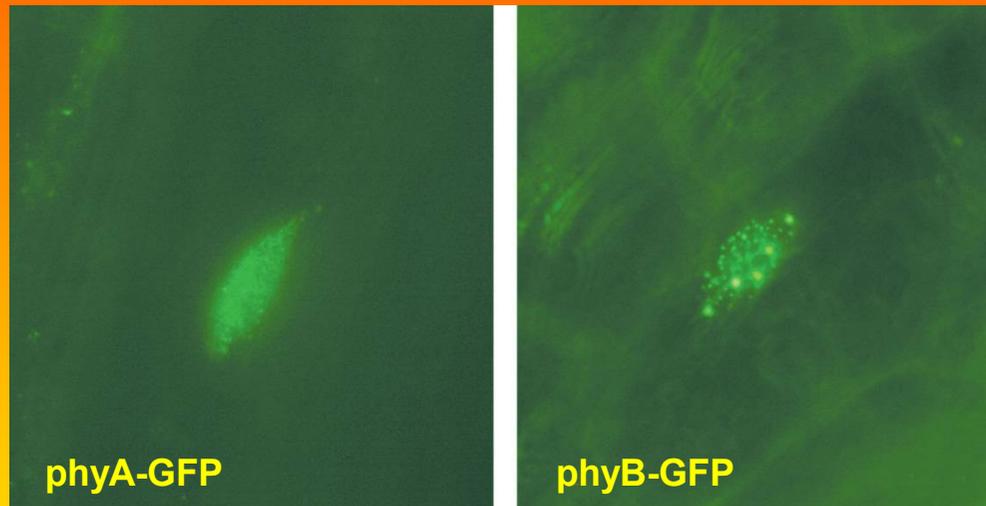


**Fytochrom se přemísťuje do jádra vlivem světla**

- Pohyb phyB – indukován R, inhibován FR; do jádra putuje pouze ve formě Pfr, pohyb je pomalý
- Pohyb phyA – indukován FR; putuje v obou formách; pohyb je rychlý.



**Vizualizace pomocí GFP** (green fluorescent protein; GFP aktivovaný světlem emituje fluorescenční záření)



## Konstrukt

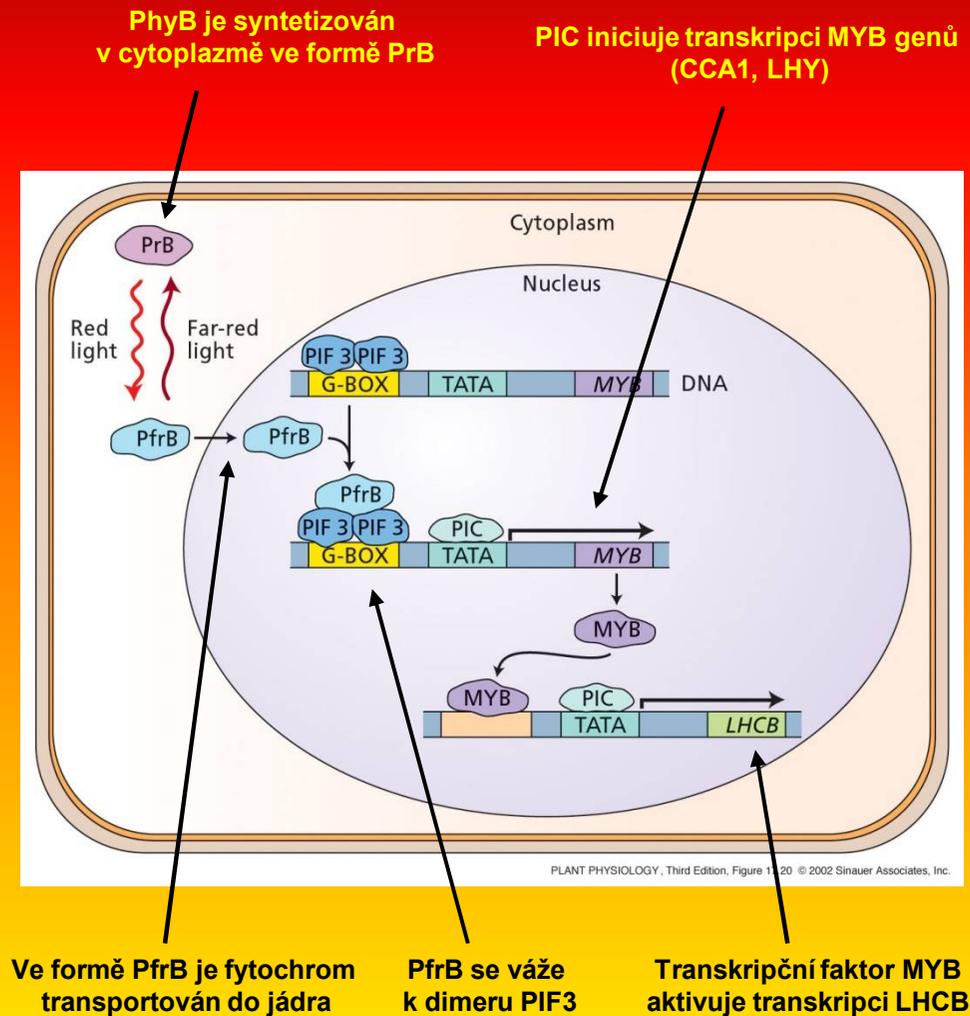


Transformace rostlin



Sledování exprese *PHYB*  
v buňkách a pletivech

## Regulace genové exprese fytochromem B



1) Regulace genové exprese přímo PfrB

2) Regulace genové exprese prostřednictvím blokady PIF3

**PIF3 (phytochrome interacting factor3)**

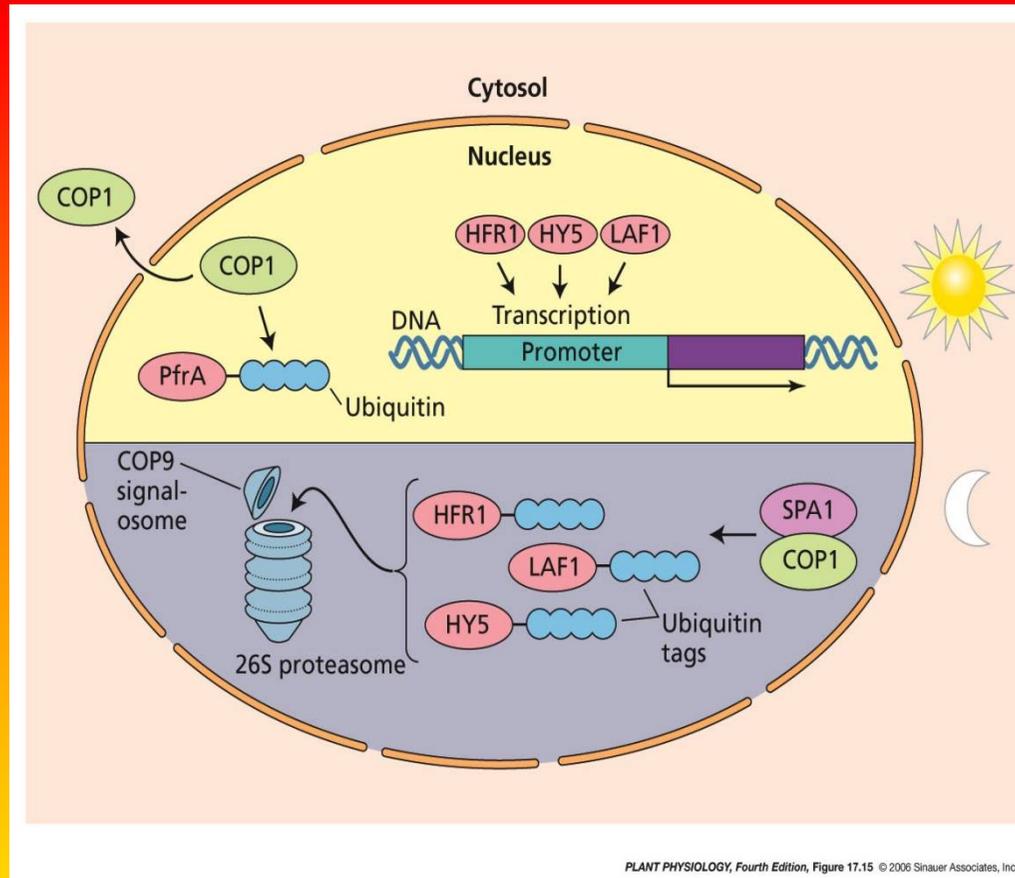
- transkripční faktor bHLH reagující s G-boxem (= část promotoru genu *MYB*) nutný pro skotomorfogenezi (inhibuje fotomorfogenezi)

- reaguje s C-terminálním koncem PfrB => PIF3 a PfrB tvoří komplex

3) Prostřednictvím COP1

## Regulace genové exprese fytochromem A

- 1) Přímou PfrA
- 2) Prostřednictvím PIF3
- 3) Prostřednictvím COP1



### Regulace exprese prostřednictvím COP1:

#### Světlo:

Transport COP1 z jádra do cytoplazmy předáním ubiquitin proteinu PfrA



Obnovení exprese fotomorfogenních genů odblokováním transkripčních faktorů (HY5, HFR1, LAF1,...)

#### Tma:

Akumulace COP1 v jádře



Represe exprese fotomorfogenních genů díky ubiquitinaci transkripčních faktorů (HY5, HFR1, LAF1,...)

Aktivita COP1 ve tmě je zvyšována SUMOylací prostřednictvím E2 sumo konjugačního enzymu SCE1 a E3 ligázy SIZ1.

***cop1* (constitutive photomorphogenesis 1)** - etiolizované rostliny ukazují fenotyp rostlin rostoucích na světle



Xing-Wang Deng

Yale University, New Haven  
Peking University (od 2014)



Nemutovaná rostlina

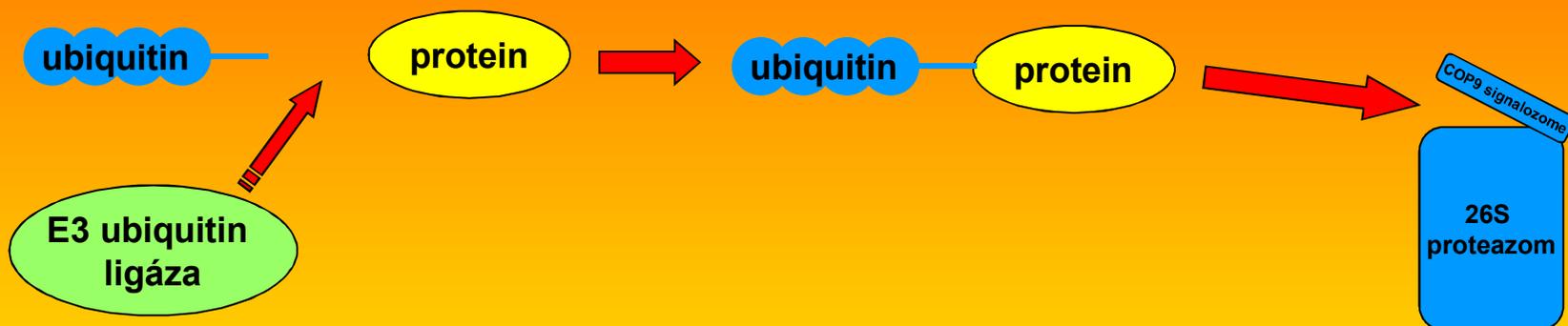
Mutant *cop1*

Zdravý (= funkční) gen *COP1* – negativní regulátor fotomorfogeneze

**COP1** funguje jako E3 ubiquitin ligáza – enzym zajišťující v buňce degradaci proteinů (proteolýzu)

Proteolýza zprostředkovaná proteazomem vyžaduje protein **ubiquitin**.

**Ubiquitinace** – běžný mechanismus degradace proteinů v organizmech



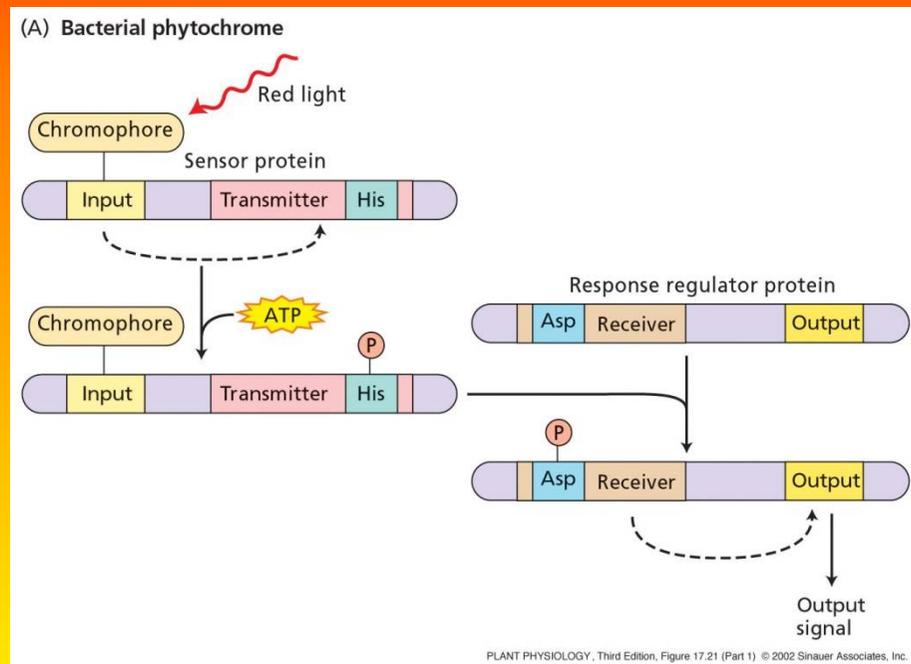
## Fosforylace – důležitý mechanismus fungující v řadě signálních drah, včetně fytochromů

**Fosforylace** reguluje aktivitu transkripčních faktorů (a jiných enzymů)

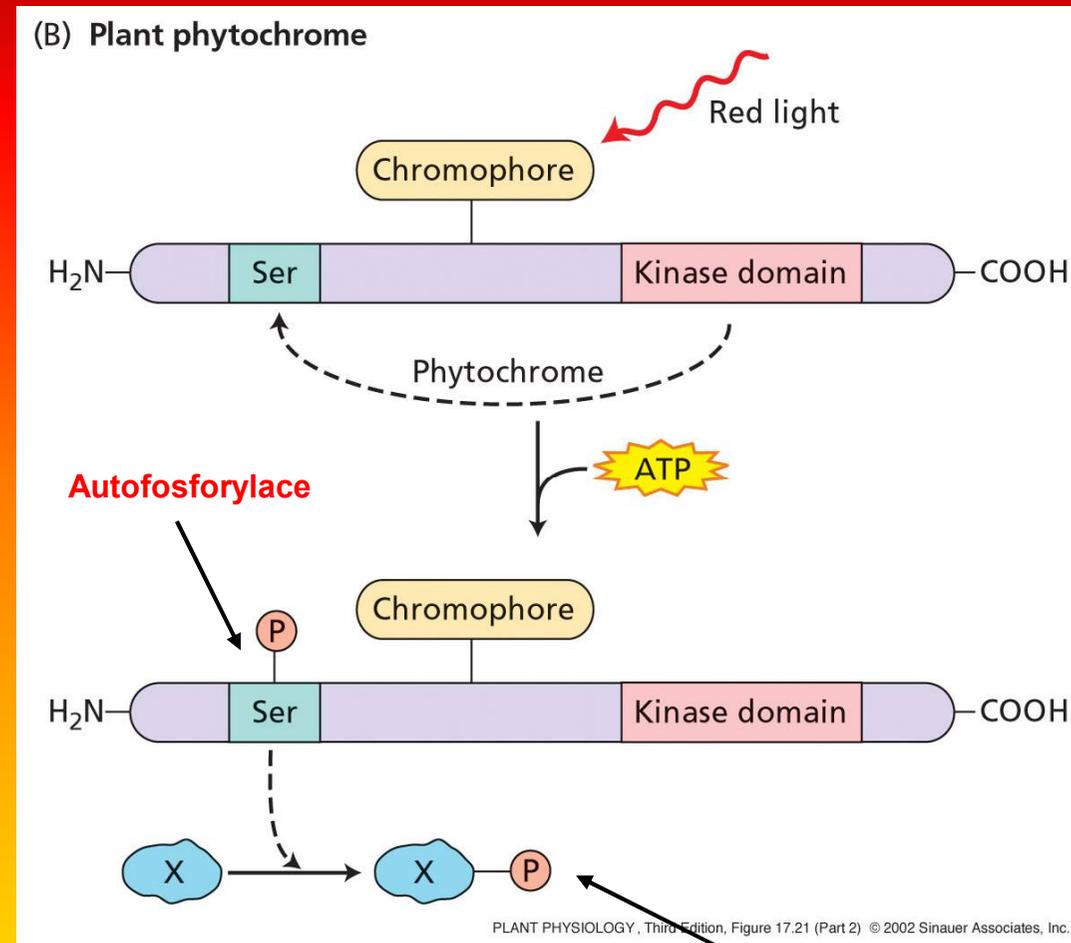
**Fosforylace** = připojení fosfátové skupiny k amikokyselinovému zbytku nějakého proteinu

**Protein kináza** = ATP-závislý enzym, který připojuje fosfátovou skupinu k proteinu. Protein se stává fosforylovaným a tím aktivním.

**Bakteriální fytochrom = histidin kináza, závislá na světle, funguje jako senzorový protein, fosforyluje regulátorový protein**



**Rostlinný fytochrom = serin/threonin kináza, kromě jiných proteinů fosforyluje i sám sebe**

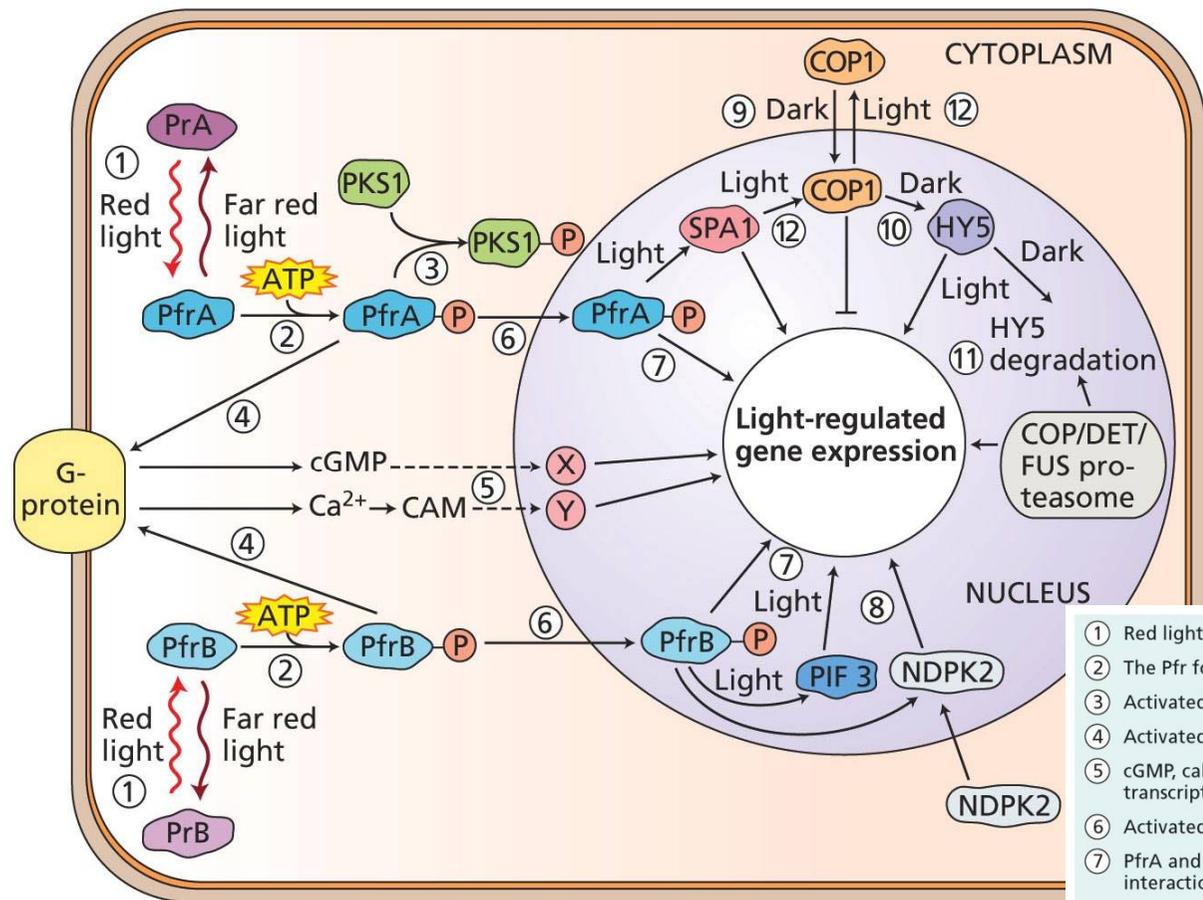


**Fosforylace jiného proteinu**

**PKS1 (phytochrome kinase substrate)** – protein fosforylován fytochromem A v cytoplasmě

**NDPK2 (nukleotid diphosphate kinase2)** – protein fosforylován fytochromem B, kinázová aktivita se zvyšuje v případě Pfr; lokalizace není známa

# Faktory zapojené v expresi genů regulované fytochromy



PLANT PHYSIOLOGY, Third Edition, Figure 17.22 (Part 1) © 2002 S

- ① Red light converts PrA and PrB to their Pfr forms.
- ② The Pfr forms of phyA and phyB phytochrome can autophosphorylate.
- ③ Activated PfrA phosphorylates phytochrome kinase substrate 1.
- ④ Activated PfrA and PfrB may interact with G-proteins.
- ⑤ cGMP, calmodulin, and calcium may activate transcription factors (X and Y).
- ⑥ Activated PfrA and PfrB enter the nucleus.
- ⑦ PfrA and PfrB may regulate transcription directly or through interaction with phytochrome interacting factor 3.
- ⑧ Nucleoside diphosphate kinase 2 is activated by PfrB.
- ⑨ In the dark, COP1 enters the nucleus and suppresses light-regulated genes.
- ⑩ In the dark, COP1, an E3 ligase, ubiquitinates HY5.
- ⑪ In the dark, HY5 is degraded with the assistance of the COP/DET/FUS proteasome complex.
- ⑫ In the light, COP1 interacts directly with SPA1 and is exported to the cytoplasm.

PLANT PHYSIOLOGY, Third Edition, Figure 17.22 (Part 2) © 2002 Sinauer Associates, Inc.

Wu S-H (2014) Annu Rev Plant Biol 65: 311-333

Mechanismy regulace genové exprese: aktivace pozitivních TF, uvolnění chromatinu acetylací histonů, regulace siRNA, alternativní sestřih, fosforylace proteinů, formace transkripčních komplexů, selektivní degradace proteinů, změna funkce individuálních proteinů.

