

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Detekcia fosforylácie vybraných proteínov pomocou  
dvoujrozmernej polyakrylamidovej elektroforézy a  
imunoblotovania**

## **BAKALÁRSKA PRÁCA**

Autor:	<b>Dávid Lukáč</b>
Študijný program:	B1406 Biochémia
Študijný odbor:	Biotechnológie a génové inžinierstvo
Forma štúdia:	Prezenčná
Vedúci práce:	<b>Ing. Tomáš Takáč, Ph.D.</b>
Rok:	2018

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracoval samostatne s vyznačením všetkých použitých prameňov a spoluautorstva. Súhlasím zo zverejnením bakalárskej práce podľa zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, v znení neskorších predpisov. Bol som zoznámený s tým, že se na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, v znení neskorších predpisov.

V Olomouci dňa .....

Chcel by som poďakovať vedúcemu mojej práce Ing. Tomášovi Takáčovi Ph.D. za vecné rady, ochotu, trpezlivosť a venovaný čas pri spracovávaní tejto bakalárskej práce. Ďalej by som chcel poďakovať pánovi prof. RNDr. Jozefovi Šamajovi DrSc. a oddeleniu bunkovej biológie v Centre regiónu Haná pre biotechnologický a zemědělský výskum za príjemné pracovné prostredie. V neposlednej rade chcem poďakovať svojej rodine za podporu pri písaní tejto bakalárskej práce.

## BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKÁCIA

Meno a priezvisko autora:	Dávid Lukáč
Názov práce:	Detekcia fosforylácie vybraných proteínov pomocou dvojrozmernej polyakrylamidovej elektroforézy a imunoblotovania
Typ práce:	Bakalárska
Pracovisko:	Katedra biochémie
Vedúci práce:	Ing. Tomáš Takáč, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2018

**Abstrakt:** Mitogénom aktivované proteínkinázy sa zúčastňujú signalizačných procesov v eukaryotických bunkách. Mitogénom aktivovaná proteínkináza 3 (MPK3) je dôležitou kinázou pri obrane rastliny voči biotickému a abiotickému stresu. Fosfolipázy sú enzýmy, ktoré hydrolyzujú štruktúrne fosfolipidy na kyselinu fosfatidovú a voľné molekuly cholínu. Fosfolipáza D $\alpha$ 1 (PLD $\alpha$ 1) je enzým, ktorý hrá úlohu počas obrany rastlín voči stresu zo sucha, poraneniu, hyperosmotickému stresu a stresu z napadnutia patogénmi. V predloženej bakalárskej práci sme sa zaoberali analýzou fosforylácie PLD $\alpha$ 1 a MPK3 v kontrolných podmienkach a podmienkach stresu zo sucha pomocou dvojrozmernej elektroforézy a imunoblotovania a pomocou Phostag technológie. Fosforyláciu MPK3 sme detekovali použitím dvojrozmernej polyakrylamidovej elektroforézy a imunoblotovania. Detekcia fosforylácie PLD $\alpha$ 1 bola uskutočnená pomocou Phostag technológie. Naše výsledky naznačujú možnú úlohu MPK3 vo fosforylácii PLD $\alpha$ 1. Mutantné rastliny *A. thaliana plda1-1* a *plda1-2* ukázali vyššiu citlivosť na stres zo sucha ako rastliny divého typu. Kombinácia dvojrozmernej elektroforézy a imunoblotovania sa javí ako efektívna metóda pre analýzu fosforylácie MPK3, pričom pre analýzu fosforylácie PLD $\alpha$ 1 je viac citlivá Phostag technológia.

Kľúčové slová:	MPK3, PLD $\alpha$ 1, dvojrozmerná elektroforéza, fosforylácia, stres zo sucha, imunoblotovanie
Počet strán:	72
Jazyk:	Slovenčina

## BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Autor's first name and surname:	David Lukáč
Title:	Detection of protein phosphorylation using twodimensional polyacrylamide electrophoresis and imunoblotting
Type of thesis:	Bachelor
Department:	Department of biochemistry
Supervisor:	Ing. Tomáš Takač, Ph.D.
The year of presentation:	2018

**Abstract:** Mitogene activated protein kinases are involved in signalization processes in eukaryotic cells. Mitogene activated protein kinase 3 is important during plant defense against biotic and abiotic stress. Phospholipases are enzymes hydrolyzing structural phopsholipids to phosphatidic acid cholin as free molecule. Phospholipase D $\alpha$ 1 is enzyme having role in plant defense against drought stress, hyperosmotic stress, as well as biotic stress. Present bachelor thesis aims to detect phosphorylation of PLD $\alpha$ 1 and MPK3 in control and drought stress conditions using two-dimensional polyacrylamide electrophoresis and imunoblotting as well as Phostag technology. We detected double phoshorylation of MPK3 using two-dimensional polyacrylamide electrophoresis combined with imunoblotting. We also detected PLD $\alpha$ 1 phosphorylation using Phostag technology. Our results also point to possible role of MPK3 in PLD $\alpha$ 1 phosphorylation during drought stress. Finally, mutant plants of *A. thaliana plda1-1* and *plda1-2* exerted more sensitivity to drought stress compared to wild type plants. Combination of two-dimensional polyacrylamide electrophoresis and imunoblotting with Phostag technology allowed us to detect chosen proteins in control and stress conditions, which make these methods effective in detecting phosphorylation of chosen proteins. In conclusion, two-dimensional polyacrylamide electrophoresis combined with imunoblotting appears as feasible method for analysis of MPK3 phosphorylation, while Phostag technology is more effective in determination of PLD $\alpha$ 1 phosphorylation.

Keywords:	MPK3, PLD $\alpha$ 1, two-dimensional electrophoresis, phosphorylation, drought stress, immunoblotting
Number of pages:	72
Language:	Slovak

## OBSAH

1	ÚVOD	9
2	SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY	10
2.1	Fosforylácia proteínov	10
2.1.1	Proteínkinázy	11
2.1.2	Proteínové fosfatázy	13
2.1.3	Zmeny konformácie enzýmov spôsobené fosforyláciou	14
2.1.3.1	Ďalšie dôsledky fosforylácie bielkovín	16
2.2	Metódy detekcie fosforylácie proteínov	16
2.2.1	Analýza fosforylácie proteínov s použitím fosfošpecifickej protilátky	16
2.2.1.2	Analýza fosforylácie bielkovín pomocou dvojrozmernej elektroforézy a imunoblotovania	17
2.2.1.3	Analýza fosforylácie bielkovín pomocou Phostag technológie	19
2.2.1.4	Analýza kinázovej aktivity <i>in vitro</i>	19
2.2.1.5	Analýza fosforylácie bielkovín pomocou izoelektrickej fokusácie	20
2.2.2	Proteomické metódy detekcie	20
2.2.2.1	Hmotnostná spektrometria	22
2.2.3	Mikroskopické metódy detekcie	23
2.3	Mitogénom aktivované proteínkinázy	24
2.3.1	Charakteristika MAPK	25
2.3.2	Úloha MAPK v odpovedi na biotický stres	27
2.3.3	Sekundárni poslovia	27
2.3.4	Mitogénom aktivovaná proteínkináza 3 (MPK3)	28
2.4	Fosfolipáza D $\alpha$ 1	29
3	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	32
3.1	Materiál a metódy	32
3.1.1	Biologický materiál	32
3.1.2	Chemikálie	32
3.1.3	Prístroje	34
3.2	Metódy	35
3.2.1	Príprava rastlinného materiálu	35
3.2.2	Ovplyvnenie rastlín stresom zo sucha	35
3.2.3	Extrakcia a precipitácia bielkovín pre 2D elektroforézu	36

3.2.4	Meranie koncentrácie bielkovín	37
3.2.5	Separácia proteínov pomocou dvojrozmernej elektroforézy	38
3.2.6	Imunoblotovanie	39
3.2.7	Detekcia fosforylácie pomocou Phostag technológie	40
3.2.8	Defosforylácia bielkovín pomocou lambda fosfatázy	42
4	VÝSLEDKY	43
4.1	Detekcia MPK3 pomocou dvojrozmernej elektroforézy a imunoblotovania	44
4.2	Detekcia PLD $\alpha$ 1 pomocou dvojrozmernej elektroforézy	46
4.3	Optimalizácia zloženia rehydratačného pufru pre detekciu PLD $\alpha$ 1	46
4.4	Detekcia fosforylácie PLD $\alpha$ 1 pomocou Phostag technológie	47
4.5	Fyziologický stav rastlín v <i>ex vitro</i> podmienkach ovplyvnených suchom	49
4.6	Predikcia fosforylačných miest v aminokyselinovej sekvencii PLD $\alpha$ 1	50
5	DISKUSIA	53
6	ZÁVER	56
7	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	57
8	ZOZNAM SKRATIEK	71

## **CIELE PRÁCE**

### **Teoretické ciele:**

Vypracovanie literárnej rešerše na tému fosforylácie proteínov a ich význam pre signalizáciu

Metódy detekcie fosforylácie proteínov

Mitogénom aktivované proteín kinázy a MPK3

Fosfolipázy D $\alpha$ 1

### **Praktické ciele:**

Osvojenie si metodiky pestovania rastlín v *in vitro* podmienkach a aplikácii abiotického stresu

Osvojenie si metodiky dvojrozmernej elektroforézy a imunoblotovania

Detekcia fosforylácie MPK3 a PLD $\alpha$ 1 v podmienkach vybraného abiotického stresu pomocou kombinácie dvojrozmernej elektroforézy a imunoblotovania

Fenotypová analýzy mutantu *pld $\alpha$ 1* v podmienkach vybraného abiotického stresu



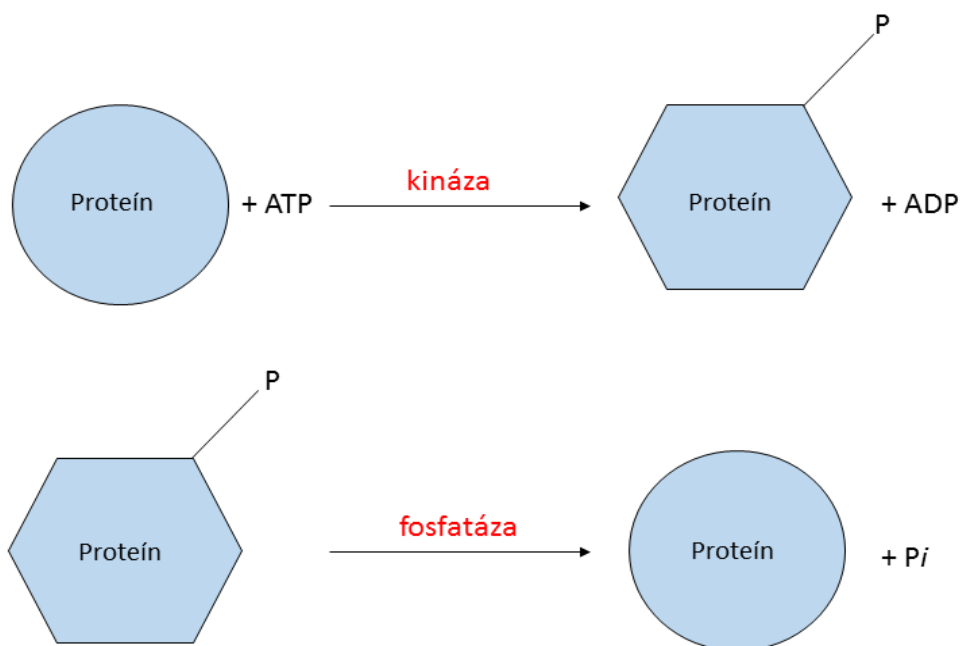
# 1 ÚVOD

Fosforylácia je jednou z najčastejšie sa vyskytujúcich posttranslačných modifikácií bielkovín v eukaryotických bunkách. Ovplyvňuje celú radu životne dôležitých procesov a má nezastupiteľnú rolu v signalizácii a zabezpečení odpovede buniek na zmeny vonkajšieho prostredia. Detekcia fosforylácie je náročná a je veľmi dôležitá v laboratórnych podmienkach. Existuje mnoho metód pre detekciu fosforylácie od biochemických metód, proteomických metód až po mikroskopické metódy detekcie. Ku každej bielkovine je ale treba pristupovať individuálne v závislosti na jeho vlastnostiach a štruktúre. Fosfolipázy sú dôležité enzýmy, ktoré sú zodpovedné za hydrolýzu štruktúrnych fosfolipidov, pričom produkujú signálne molekuly. Funkcia fosfolipáz je pravdepodobne regulovaná fosforyláciou pri rôznych enviromentálnych podmienkach. Z týchto dôvodov je dôležité mať jednoduchú metódu pre rýchlu a efektívnu detekciu fosforylácie.

## 2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

### 2.1 Fosforylácia proteínov

Fosforylácia je chemická reakcia, pri ktorej dochádza k väzbe fosfátovej skupiny na organické molekuly, ktoré menia svoju štruktúru, aktivitu a funkciu. K najčastejším organickým molekulám, ktoré sú fosforylované patria bielkoviny, lipidy alebo cukry (Olieviera a Sauer, 2012). Fosforylácia patrí k post-translačným modifikáciám, ktorá je uskutočňovaná pomocou proteínkináz. Fosforylácia má dôležitú úlohu predovšetkým v signalizačných procesoch, v bunkovom metabolizme, delení, raste, membránovom transporte a regulácii enzymatickej aktivity (Johnson a Bradford, 1993). Defosforylácia proteínov je proces, v ktorom dochádza k narušeniu väzby medzi fosfátovou skupinou a substrátom, pričom dochádza k jej uvoľneniu. Defosforyláciu zabezpečujú špecifické enzýmy nazývané proteínové fosfatázy (Obr.1; Hunter, 1994). Kinázy a fosfatázy reagujú na odlišné bunkové stimuly a fosforylácia a defosforylácia sú oddelené, na sebe nezávislé procesy.



(Obr.1) Schéma fosforylácie a defosforylácie. Proteínkináza za spotreby energie fosforyluje proteínový substrát. Reverzibilný proces defosforylácie spôsobujú proteínové fosfatázy za uvoľnenia fosfátového iónu.

### 2.1.1 Proteínkinázy

Proteínkinázy alebo fosfotransferázy majú za úlohu chemické pripojenie fosfátovej skupiny z ATP na aminokyselinové zvyšky serínu, treonínu, tyrozínu či histidínu za spotreby energie. Dochádza k substitúcii hydroxylovej skupiny za fosfátovú (Lehti-Shiu a Shiu, 2012). Podľa fosforylovanej aminokyseliny sa delia na serín/treonin-kinázy, tyrozin-kinázy a kinázy s duálnou funkciou, ktoré fosforylujú serín, treonín a tyrozín. Viac ako 86,4 % fosforylovaných aminokyselinových zvyškov patrí serínu, 11,8 % treonínu a 1,8 % tyrozínu. Netradičné fosforylácie môžu prebiehať aj na histidíne (histidínkinázy) a aspartáte, tie sú však menej stabilné ako na seríne, treoníne a tyrozíne (Ardito *et al.*, 2017). Fosforylácia v modelovom organizme *Arabidopsis thaliana* prebieha hlavne na serínových a treonínových aminokyselinových zvyškoch, pričom fosforylácia na tyrozíne sa oproti fosforyláciám na seríne a treoníne vyskytuje menej (Bentem *et al.*, 2009). Existujú dôkazy o fosforylácií histidínu, ktorá má dôležitú úlohu v signálnych procesoch spojených s cytokíninmi (Nongpiur *et al.*, 2012). V genóme *A. thaliana* bolo identifikovaných viac ako 1000 proteínkináz, čo tvorí približne 5,5 % genómu *A. thaliana*. Proteínkinázy môžu existovať v aktívnej alebo inaktívnej konformačnej forme v závislosti na aktivite regulačných mechanizmov (Huse a Kuriyan, 2002).

Proteínkinázy sú rozdelené do piatich podskupín (A-E). Do podskupiny A s názvom AGC skupina, patria cyklické kinázy závislé na nukleotidoch PKA, PKG, PKC (proteínkinázy A, G, C). U rastlín nie je táto skupina kináz veľmi rozšírená. V *A. thaliana* boli identifikované gény *AtPK1* a *AtPK2*, ktoré kódujú ribozomálne proteínkinázy patriace do skupiny AGC kináz (Zhang *et al.*, 1994). Pre túto skupinu je typická regulácia sekundárnymi poslami ako sú  $Ca^{2+}$ , fosfolipidy alebo diacylglyceroly (Newton, 2009). V podskupine B sa nachádza CaMK skupina, kam patria kinázy závislé na vápniku/kalmodulíne a SNF1/AMP-aktivované proteínkinázy (Swulius a Waxham, 2008; Schmidt a McCartney, 2000). Ako v prípade AGC-kináz, aj táto skupina je regulovaná sekundárnymi poslami (Braun a Schulman, 1995). Kinázy závislé na vápenatých iónoch (Calcium dependent protein kinases; CDPK) sú dominantné v rastlinných druhoch. Boli objavené CDPK, ktoré sú asociované s plazmatickou membránou (Lu a Hrabak, 2013) alebo cytoskeletom (Huang *et al.*, 2014). Jedným zo substrátov CDPK je  $H^+$ -ATPáza ktorá sa nachádza na plazmatickej membráne (Roberts a Hannon, 1992). SNF1 kinázy sú serín/treonin-kinázy, ktoré hrajú úlohu v bunkových odpovediach na environmetálne

podmienky prostredníctvom metabolických dráh. Tieto kinázy sa zúčastňujú dráh zodpovedných pri signalizácii, ktoré súvisia s nedostatkom energie alebo živín (McCartney *et al.*, 2016). V podskupine C sa nachádza CMGC skupina kam patria kinázy závislé na cyklíne (CDK), mitogénom aktivované proteínkinázy (MAPK), glykogénsyntáza kináza (GSK) a kazeínkinázy I a II (CK I,II; Varjosalo *et al.*, 2013). Pre kinázy v tejto skupine je charakteristické, že sú regulované fosforyláciou na rozdiel od AGC a CaMK-kináz (Oruganty a Kannan, 2012). CDK hrajú úlohu pri regulácii bunkového cyklu v eukaryotických bunkách (Malumbres, 2014). GSK-3 kinázy sú dôležité vo vývine rastlín. V *A. thaliana* bolo identifikovaných 5 génov ASK (*Arabidopsis SKP-1* homologue), ktoré kódujú GSK-3 homológy. ASK1 a ASK2 gény majú dôležitú úlohu pri embryogenéze, bunkovom delení a pri vývine semena (Liu *et al.*, 2004). Rastliny s chýbajúcou expresiou génov ASK1 a ASK2 majú poruchy v embryogenéze, a v tvorbe semenáčikov bez koreňa (Smet *et al.*, 2010). Dve rekombinantné ASK autofosforylujú Ser/Thr/Tyr (Bianchi *et al.*, 1994). Úloha CK II kináz spočíva v regulácii bunkového delenia, DNA replikácií a oprave, svetlom indukovanej génovej expresie alebo odpoveďou na hormóny (Riera *et al.*, 2013; Mulekar a Hug, 2014). CK II fosforyluje a zlepšuje naviazanie DNA na transkripcionálny faktor GBF1 (G-box binding factor 1), ktorý interaguje s promotorom G-box potrebným na expresiu génov indukovaných svetlom v *A. thaliana* (Klimczak *et al.*, 1995). Problematika MAPK je podrobne opísaná v kapitole 2.3. V podskupine D sa nachádza PTK skupina, kam patria proteíntyrozínové kinázy. V podskupine D sa nachádza PTK skupina, kam patria proteíntyrozín kinázy. Úloha proteíntyrozínových kináz spočíva vo vývine embrya, metabolizme a odpovediach rastlín na environmentálny stres (Hubbard a Till, 2000). Najväčšia skupina tyrozínkináz sú receptorové tyrozínkinázy (Receptor tyrosine kinases; RTK). Tieto kinázy majú úlohu v zachytení extracelulárneho signálu a následný prenos. RTK môžu spúšťať fosforylačné MAPK kaskády v ľudských bunkách (Zwick *et al.*, 2001). V podskupine E sa nachádza skupina kináz, ktoré sa odlišujú od prvých 4 podskupín. Najdôležitejšia z týchto je skupina kináz podobné receptorom (Receptor like kinases, RLK). RLK sa skladajú z extracelulárnej domény a C-terminálnej Ser/Thr kinázovej domény, ktorá je na cytozolovej strane membrány. Transmembránová doména má za úlohu ukotviť receptor na bunkovej membráne (Stone a Walker, 1995). Bolo identifikovaných 610 RLK génov, ktoré kódujú RLK v *A. thaliana* (Shiu a Blecker, 2001). RLK rozpoznávajú extracelulárne ligandy a majú tak úlohu v obrane rastliny proti biotickému a abiotickému stresu (Lehti-Shiu *et al.*, 2010). RLK heterodimerizujú ak je na

nich naviazaný ligand a dochádza tak k autofosforylácií na ich kinázovej doméne (Gish a Clark, 2011).

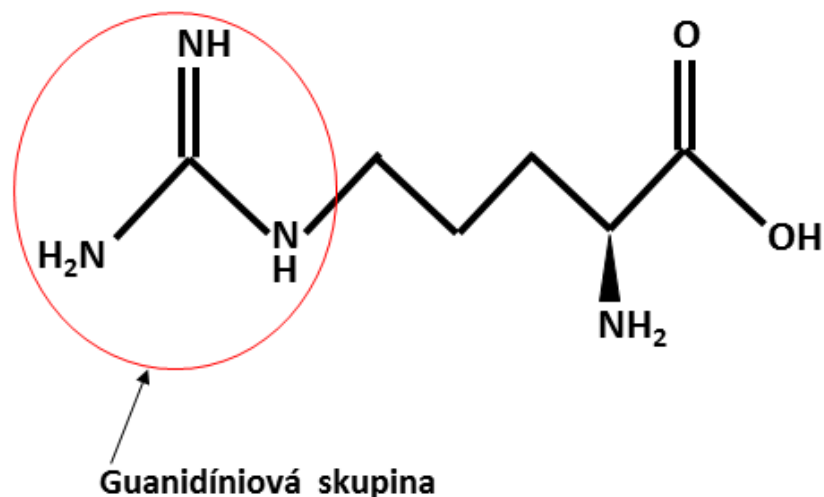
### 2.1.2 Proteínové fosfatázy

Proteínfosfatázy majú za úlohu odštiepiť fosfátovú skupinu z fosforylovanej aminokyseliny (defosforylácia). Odštiepená fosfátová skupina je uvoľnená vo forme voľného iónu, nie je naviazaná na ATP kvôli spotrebe energie. Väčšina defosforylácií fosfoserínu a fosfotreonínu je spôsobená fosfoproteínovými fosfatázami (Phosphoprotein phosphatases; PPP), kam patria PP1, PP2A, PP2B, PP4-7 a proteínfosfatázami závislými na manganatých či horečnatých iónoch (Protein phosphatases dependent on manganese/magnesium, PPM). PP1, PP2A, PP2B sú príbuzné enzýmy na základe ich sekvencie. PPP a PPM fosfatázy nemajú žiadny vzájomný vzťah vzhľadom k ich sekvenciám, vyvinuli sa z dvoch nezávislých, odlišných génov (Johnson, 2009). Katalytická doména PPP fosfatáz má približne 280 aminokyselín a je konzervovaná aj medzi ostatnými členmi PPP fosfatáz, pričom ich nekatalytické N- a C- terminálne konce sú variabilné. PPP fosfatázy sú dôležité pri regulácii membránových kanálov, vývojových procesoch a pri kontrole bunkového cyklu (Smith a Walker, 1996; Luan, 2003). Podskupina PPM fosfatáz potrebuje pre svoju katalytickú aktivitu  $Mg^{2+}$  a  $Mn^{2+}$  katióny. V genóme *A. thaliana* bolo identifikovaných 69 PPM fosfatáz (Kerk *et al.*, 2002). Katalytické domény jednotlivých PPM majú rozdielne N- a C- terminálne konce. Preto sa PPM fosfatázy líšia v rôznych typoch bunkovej regulácie, substrátovej špecificity a bunkovej kolokalizácie (Schweighofer *et al.*, 2004). Rovnako odlišné sú aj PTP fosfatázy (proteínytyrozínové fosfatázy). PTP sa delia na fosfatázy špecifické pre tyrozín a fosfatázy „duálnej funkcie“, ktoré dokážu defosforylovať fosfotyrozín a fosfoserín/fosfotreonín. V genóme *A. thaliana* sa nachádza 18 PTP (Kerk *et al.*, 2002). PTP fosfatázy hrajú rolu pri bunkovej odpovedi na rôzne typy environmentálneho stresu. Napríklad, expresia génu *AtPTP1* je silne indukovaná pri ovplyvnení soľným stresom. PTP1 je inaktivovaná peroxidom vodíku, čo naznačuje, že PTP1 môže mať úlohu v odpovedi rastlín na oxidatívny stres (Gupta a Luan, 2003). MKP1 (MAPK phosphatase 1) interaguje s MPK3, MPK4 a MPK6, čo sú kľúčové signalizačné komponenty pri odpovedi na environmentálny stres. PTP sú zahrnuté aj v auxínovej signalizácii a signalizácii kyseliny abscisovej (ABA; Monroe-Augustus *et al.*, 2003).

### 2.1.3 Zmeny konformácie enzýmov spôsobené fosforyláciou

Fosforylácia aktivuje/inhibuje enzymatickú aktivitu cez zmeny konformácie enzýmu (Russo *et al.*, 1996). Podľa Monod-Wyman-Changeux teórie, enzým existuje v dvoch funkčných stavoch: T stav (z angl. *tense*, napätý), ktorý je menej aktívny, a R stav (z angl. *relaxed*, uvoľnený; Monod *et al.*, 1965). Príkladom enzýmu s veľkými konformačnými zmenami spôsobenými fosforyláciou je hexamerická aspartáttranskarbamoyltransferáza z *Escherichia coli*. Tá existuje v neaktívnom T stave, kedy má malú aktivitu a afinitu, a aj v aktívnom R stave, kedy má vysokú aktivitu aj afinitu. Väzba substrátu na katalytické podjednotky spôsobí prechod do R stavu, zatiaľ čo väzba substrátu na regulačné podjednotky spôsobí prechod do T stavu. Na regulačnú podjednotku sa môže naviazať aj ATP, čo vyústi prechodom do R stavu (Changeux, 2011). Obe tieto stavy, ktoré sú interkonvertibilné, môžu byť kontrolované nekovalentnými ligandmi a fosforyláciou. Fosforylácia môže mať veľké účinky na funkciu proteínu. Fosfátová skupina s  $pK_a \sim 6,7$  bude pri fyziologickom pH prevažne anionická a spôsobí zdvojnásobenie negatívneho náboja proteínu. Táto zmena spolu so schopnosťou kyslíku tvoriť na fosfátovej skupine vodíkové väzby poskytuje špeciálne vlastnosti proteínov. Pri fosforylácii substrátu sú vytvárané vodíkové väzby medzi fosfátovou skupinou a bočným reťazcom aminokyselinových zvyškov. Vodíková väzba medzi protónom amidovej skupiny fosforylovaného aminokyselinového zvyšku a nabitou fosfátovou skupinou môže byť hnacou silou pre priame štruktúrne zmeny serínových a treonínových fosforylácií. Tento efekt však chýba pri fosforylácii tyrozínu. Možný dôvod absencie je ochrana aromatického jadra, ktoré zmiernuje možné interakcie medzi nabitou fosfátovou skupinou a aminokyselinovým zvyškom (Kang *et al.*, 2010).

Pri fosforylácii prebiehajú dva typy interakcií v terciárnej štruktúre bielkovín. Prvý typ interakcie prebieha na tesných väzobných miestach, ktoré majú za úlohu stabilizovať konformačnú štruktúru proteínu. Fosfátová ( $PO_4^{3-}$ ) skupina, naviazaná na aminokyselinu, interaguje s bočným reťazcom jedného alebo viacerých arginínových zvyškov. Guanidíniová skupina na arginíne je vhodná pre tento typ interakcií, kvôli jej planárnej štruktúre a jej schopnosti tvoriť vodíkové väzby (Obr. 2). Guanidíniová skupina ( $pK_a < 12$ ) je slabý protónový donor. Pri hydrolýze fosforylovaných aminokyselín nemôže zastávať funkciu obcej kyseliny. Teoretické hodnoty sily vodíkových väzieb sú omnoho silnejšie na guanidíniovej skupine v arginíne, ako na aminoskupinách v postranných reťazcoch lyzínu (Mandell *et al.*, 2007). Druhý typ interakcie prebieha na



(Obr. 2) Štruktúrny vzorec arginínu s vyznačenou guanidíniovou skupinou.

menej tesných väzobných miestach, kedy sa fosfátové skupiny viažu na dusíky hlavných reťazcov  $\alpha$ -helixu. Toto naviazanie spôsobuje kladný náboj helixového dipólu.

Inhibícia enzýmovej aktivity fosforyláciou nemusí byť spôsobená len zmenou konformácie. U izocitrátdehydrogenázy sa fosfátová skupina správa ako blokovácia doména a nespôsobuje konformačné zmeny enzýmu. Fosforylácia izocitrátdehydrogenázy prebieha na seríne v pozícii 113. Inhibícia väzby na substrát je spôsobená záporným nabitím serínu v pozícii 113 a zabraňuje následnej väzbe izocitrátu na enzým (Hurley *et al.*, 1990). Enzymatická aktivita je inhibovaná aj u CDK2 (Cyclin-dependent kinase 2), kedy fosforylácia tyrozínového zvyšku prekáža väzbe kinázy na špecifické miesta daného proteínového substrátu (Welburn *et al.*, 2007). Fosforylácia Src (z angl. *sarcoma*, sarkóm) tyrozínkinázy spôsobená Csk (C-terminálna Src kináza) inaktivuje Src kinázu pôsobením konformačnej zmeny, čím zakryje jej kinázovú doménu (Cole *et al.*, 2003). Fosforylácia môže učiniť aj konformačné zmeny, ktoré vedú k interakciám bielkovín. Tieto zmeny boli zistené u ERK (extracellular-signal-regulated-kinase; Canagarajah *et al.*, 1997) a STAT (signal transducer and activator of transcription; Becker *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1998) bielkovín a ich premiestenie do jadra. Fosforylácia dokáže tiež štiepiť proteín-proteínové väzby. CDK fosforyluje substrát pRb (retinoblastoma protein) a spôsobuje jeho odštiepenie od transkripčných faktorov EZF (Endothelial zinc finger protein)/DP1 (Dimerization partner 1) v cicavčích bunkách (Rubin *et al.*, 2005).

### **2.1.3.1 Ďalšie dôsledky fosforylácie bielkovín**

Fosforylácia môže byť tiež impulzom pre následnú degradáciu bielkovín. Fosforylácia určitých bielkovín spôsobuje ich degradáciu ubikvitínovou/proteázovou signálnou dráhou závislej na ATP. Tieto cieľové bielkoviny sa stávajú substrátmi určitých E3 ubikvitínových ligáz len vtedy, ak sú fosforylované. Transkripčný faktor CO (CONSTANS) reguluje kvitnutie rastlín na jar. CO môže byť fosforylovaný, pričom fosforylované formy CO majú vyššiu abundanciu v dennom cykle a menšiu v nočnom. Fosforylovaná forma CO je degradovaná pri nočnom cykle COP1-E3 (Constitutive photomorphogenic 1) komplexom (Sarid-Krebs *et al.*, 2015). WRKY sú transkripčné faktory, ktoré sú rastlinne špecifické a patria k najdôležitejším regulátorom pri vývine a obrane rastliny na environmentálny stres (Rushton *et al.*, 2010). WRKY je fosforylovaný v doméne WRKYGQK na tyrozíne v pozícii 115. Fosforylácia tohto transkripčného faktora spôsobuje rapidnú degradáciu WRKY, ako aj inhibíciu transkripčnej aktivity (Yamada a Sato, 2016).

## **2.2 Metódy detekcie fosforylácie bielkovín**

Pre detekciu fosforylácie bielkovín sa využíva široká škála metód. Tieto metódy sa delia do troch podskupín. V prvej podskupine sú biochemické metódy detekcie. Sem zahrňame imunoblotovanie s použitím fosfošpecifických protilátok, izoelektrickú fokusáciu (IEF), dvojrozmernú (2D) elektroforézu spojenú s imunoblotovaním, metódu Phostag a *in vitro* kinázovú analýzu. V druhej podskupine sa nachádzajú proteomické metódy detekcie. Patria sem gélové a bezgélové metódy separácie spojené s hmotnostnou spektrometriou. V poslednej podskupine sa nachádzajú mikroskopické metódy detekcie, kde sa využíva imunoznačenie s použitím fosfošpecifických protilátok.

### **2.2.1 Biochemické metódy detekcie**

#### **2.2.1.1 Analýza fosforylácie proteínov pomocou imunoblotovania s použitím fosfošpecifickej protilátky**

Imunoblotovanie (angl. western blotting) je analytická technika, ktorá využíva detekciu konkrétnej bielkoviny vo vzorke prostredníctvom špecifických protilátok. Imunoblotovanie s použitím fosfošpecifickej protilátky využíva prvotnú separáciu

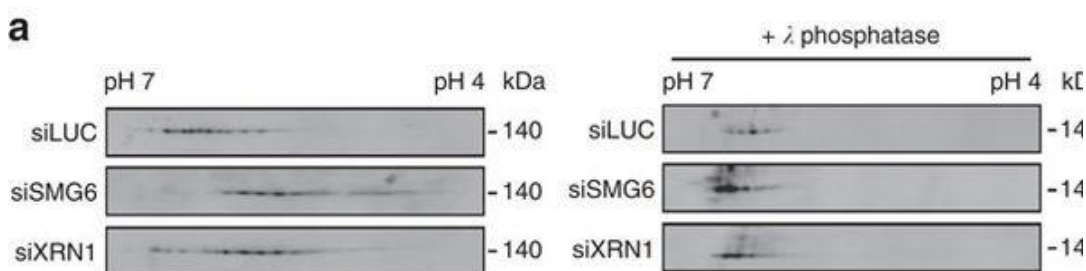


bielkovín na základe ich molekulovej hmotnosti  $M_r$ , prenos bielkovín na membránu s vlastnosťami ireverzibilne viazať bielkoviny a následne imunologickú detekciu. Na separáciu bielkovín sa zvyčajne využíva polyakrylamidová gélová elektroforéza (SDS-PAGE). Po separácii SDS-PAGE sa bielkoviny z gélu prenášajú na PVDF (Polyvinilidén difluorid) alebo na nitrocelulóзовú membránu. Záporne nabité bielkoviny sú pod elektrickým prúdom prenesené a ireverzibilne viazané na membránu. Po prenose je možné požadovanú bielkovinu identifikovať pomocou fosfošpecifických protilátok (Towbin *et al.*, 1979). Prvá fosfošpecifická protilátka pochádzala z kráľika, ktorý bol imunizovaný benzonylfosfonátom konjugovaným s KLH proteínom (Keyhole limpet hemocyanin). Táto protilátka rozpoznávala bielkoviny s fosfotyrozínovým aminokyselinovým zvyškom. (Ross *et al.*, 1981). Špecifické rozpoznávanie fosforylovaných epitópov protilátkami je docielené použitím syntetických peptidov. Tieto peptidy majú komplementárnu aminokyselinovú sekvenciu k miestu fosforylácie bielkovinového substrátu. Peptidy musia obsahovať aminokyselinové zvyšky, ktoré môžu byť fosforylované danými kinázami (Czernik *et al.*, 1991). Pri štúdiu MAPK kináz sa využíva predovšetkým pERK fosfošpecifická protilátka. Aminokyselinová sekvencia aktivačnej slučky MAPK je konzervovaná u všetkých MAPK. Fosforylačný motív TXY je preto rovnaký vo všetkých rastlinných MAPK, ktoré sú podobné živočíšnym ERK Willman *et al.*, 2014). Fosfošpecifické protilátky p44/42 MAPK, ktoré sú špecifické pre ľudské p44/42 ERK1 a ERK2 kinázy, taktiež dokážu detekovať MAPK aktivitu v rastlinách. Táto fosfošpecifická protilátka rozpoznáva aj fosforylované formy MPK3 a MPK6 v rastlinách (Ovečka *et al.*, 2014). Fosfošpecifické protilátky teda rozpoznávajú fosforylované formy proteínu s veľkou presnosťou.

### **2.2.1.2 Analýza fosforylácie bielkovín pomocou dvojrozmernej elektroforézy a imunoblotovania**

Dvojrozmerná (2D) elektroforéza je separačná technika pre rozdelenie bielkovín na základe dvoch rôznych fyzikálnych parametrov. Konvenčná 2D elektroforéza využíva v prvom rozmere separáciu bielkovín na základe ich izoelektrického bodu (pI) a následne na základe  $M_r$  v denaturujúcom polyakrylamidovom géli (O'Farrel, 1975). IEF využíva pohyb proteínov v prostredí premenlivého pH. Bielkoviny v zásaditom prostredí majú záporný náboj a putujú k anóde. V kyslom prostredí majú bielkoviny kladný náboj a putujú ku katóde. V mieste, kde sa pH zhoduje s pI bielkoviny, sa

molekula zastaví a stratí náboj. IEF v rámci 2D elektroforézy prebieha najčastejšie na polyakrylamidovom géli s pH gradientom imobilizovanom na plastovom prúžku. Amfolyty sú amfotérne molekuly, ktoré obsahujú zásadité a kyslé skupiny. Používajú sa ako nosiče gradientu pH pri IEF. Bielkoviny sa po IEF separujú v kolmom smere na základe ich Mr. 2D elektroforéza je veľmi citlivá metóda, ktorou dokážeme rozlíšiť bielkoviny v rozdieloch ich pI až o 0,01. Bielkoviny sú na 2D géli separované vo forme škvŕn (O'Farrel, 1975). Pre vizualizáciu konkrétnej bielkoviny (po separácii tzv. celkového bielkovinového extraktu) je nutné použiť imunoblotovanie so špecifickou protilátkou. Fosforylácia posúva pI bielkovín do kyslej oblasti, preto je fosforylovaná bielkovina po 2D elektroforéze viditeľná ako rad niekoľkých škvŕn s rovnakou molárnou hmotnosťou ale rôznym pI. Škvŕna s najzásaditejším pI predstavuje nefosforylovanú bielkovinu, pričom každá škvŕna v kyslej oblasti pI predstavuje rôznu úroveň fosforylácie (podľa počtu naviazaných fosfokupín; Obr. 3). Na dôkaz fosforylácie je ale nutné použiť potvrdzujúce experimenty. Jedným z takých môže byť defosforylačný dôkaz, keď sa extrakt vystaví pôsobeniu fosfatázy (Yamagata *et al.*, 2002; Obr.3, vpravo). Podobne je možné použiť inhibítora kinázy, ktorou je daný proteín fosforylovaný. Fosfoproteíny je možné aj špecificky farbiť použitím špecifických farbičiek ako napr. Pro-Q Diamond (Thermo-Fisher), čo je detailnejšie rozpracované v podkapitole 2.2.2. Senzitivita takého farbenia je spravidla nižšia ako senzitivita imunoblotovania.



(Obr.3): Detekcia fosforylovaných foriem proteínov (vľavo). Na dôkaz fosforylácie týchto proteínov boli proteínové extrakty ovplyvnené lambda fosfatázou (vpravo). Špecifické proteínové škvŕny, ktoré sa nachádzali v kyslej oblasti gélov vľavo sa po ovplyvnení lambda fosfatázou na géloch vpravo nevyskytujú (prevzaté z Durand *et al.*, 2015).

### 2.2.1.3 Analýza fosforylácie bielkovín pomocou Phostag technológie

Phostag je di-nukleárny kovový komplex, ktorý sa skladá z 1,3-bis(pyridín-2-ylmetylamino)propán-2-olátu a dvoch kovových katiónov ( $Mn^{2+}/Zn^{2+}$ ). Slúži ako afinitná molekula, ktorá sa špecificky viaže na fosfátový monoester vo vodnom prostredí pri neutrálnom pH (Kinoshita *et al.*, 2004). Najviac používaná technika je fosfátová afinitná SDS-PAGE, ktorá sa využíva pre zistenie mobility fosforylovaných foriem bielkovín. Princíp spočíva v tom, že Phostag ligand, imobilizovaný v polyakrylamidovom géli spomaľuje migráciu fosforylovaných proteínov v elektrickom poli počas elektroforézy. Dochádza preto k oddeleniu fosforylovanej formy bielkoviny od nefosforylovanej (Kinoshita *et al.*, 2009, Bekešová *et al.*, 2015). Po podrobení gélu imunoblotovaniu so špecifickou primárnou protilátkou je na membráne viditeľný signál prislúchajúci nefosforylovanej časti. Okrem nefosforylovanej formy bielkoviny je na membráne signál prislúchajúci aj fosforylovanej časti, ktorá sa nachádza vyššie (má nižšiu mobilitu). Touto technikou dokážeme taktiež od seba rozlíšiť viacnásobné fosforylácie. Ak má bielkovina viacnásobné fosforylačné miesta, rôzne fosforylované formy bielkovín nemajú rovnakú elektroforetickú mobilitu, a môžu byť detekované ako samostatné proteínové pásy. (Kinoshita *et al.*, 2015). Phostag technológia dokáže rozpoznávať aj netradičné fosforylácie aspartátu (Barbieri a Stock, 2008), histidínu (Ishii *et al.*, 2013) a thiofosforylácie (Kinoshita *et al.*, 2014). Detekcia fosforylovaných bielkovín pomocou Phostag technológie bola využitá aj pri skúmaní fosforylácie a aktivácie MAP65-1 (Beck *et al.*, 2010) v *A. thaliana*. Rovnako ako u predchádzajúcich techník, je vhodné fosforyláciu potvrdiť pomocou fosfatáz.

### 2.2.1.4 Analýza kinázovej aktivity *in vitro*

Analýza kinázovej aktivity *in vitro* (angl. *In vitro* kinase assay) je analytická metóda, ktorá sa používa pre analýzu kinázovej aktivity v prítomnosti substrátu (cieľového proteínu). Princípom je detekcia inkorporácie rádioaktívne značeného ATP do substrátu za prítomnosti purifikovanej rekombinantnej kinázy. Detekcia kinázovej aktivity prebieha kolorimetricky, rádiograficky alebo fluorescenčne na polyakrylamidových géloch (Johnson a Hunter, 2005). Intenzita pásu je priamo úmerná množstvu inkorporovaného ATP. Použitím *in vitro* kinázovej aktivity bola dokázaná priama fosforylácia na C-konci GSK3 $\beta$  kinázy p38 MAPK kinázou (Thornton *et al.*,

2008). Táto inaktivácia vedie k akumulácii  $\beta$ -katenínu, čo je podjednotka bielkovinového komplexu kadherínu a slúži ako prenášač signálu v cicavčích bunkách. MKK3 kináza bola potvrdená aj ako aktivátor MPK8 pomocou *in vitro* kinázovej aktivity. Okrem MKK3 kinázy ako aktivátor MPK8 slúžia aj CaMK kinázy v rastlinných bunkách *A. thaliana* (Takahashi *et al.*, 2011).

### **2.2.1.5 Analýza fosforylácie proteínov pomocou izoelektrickej fokusácie**

IEF je separačná technika, ktorá rozdeľuje bielkoviny na základe ich izoelektrického bodu (pI). Fosfátové skupiny spôsobujú posun pI bielkoviny na základe zvýšenia záporného náboja proteínu. Na základe toho je možné pomocou následného imunoblotovania špecifickou protilátkou identifikovať rôzne proteoformy bielkoviny. Po využití defosforylácie fosfatázami je možné vyvodit' záver, že pás ktorý zmizol po aplikácii fosfatáz prislúcha fosforylovanej časti bielkoviny (Anderson a Peck, 2006). IEF sa využíva hlavne pre analýzu posttranslačných modifikácií bielkovín (Gianazza, 1995) a pri analýze fosforylačných kaskád. Použitím komerčne dostupného fluorescenčného substrátu pre viaceré kinázy, je možné detekovať fosforylačné kaskády cez viacnásobné kinázové reakcie pomocou metódy mikrovapalinovej IEF (Choi *et al.*, 2015). Kapilárna IEF zdieľa podobný princíp ako gélová IEF s rozdielom, že prebieha v kapiláre miesto gélového prúžku. Kapilárna IEF je časovo menej náročná (15-20 minút) ako gélová IEF (4-6 hodín; Wehr *et al.*, 1996). Funkcia monofosforylovaných ERK1 a ERK2 kináz bola dokázaná použitím kapilárnej IEF v kombinácii s fosfošpecifickými protilátkami pERK1 a pERK2 (Kraus *et al.*, 2015). Použitím jednorozmernej IEF bola dokázaná interakcia medzi ERK s aktínom a CH doménou (Calponin homology) na bielkovinách, ktoré sa viažu na aktín (Leinweber *et al.*, 1999).

### **2.2.2 Proteomické metódy detekcie**

Proteomická analýza, ktorá umožňuje identifikáciu fosforylovaných proteínov vo vzorke je fosfoproteomika (Engholm-Keller a Larsen, 2013). Fosfoproteomické metódy sa delia na gélové a bezgélové. V oboch metódach je dôležitou zložkou obohatenie fosfoproteínov.

Detekcia fosforylovaných proteínov alebo peptidov je technicky náročná. Fosforylácia je tranzientná modifikácia, preto sa môže požadovaná bielkovina

nachádzať buď vo fosforylovanej alebo natívnej forme. Obohatením fosfoproteínov dochádza k eliminácii nefosforylovaných proteínov vo vzorke. Obohatenie musí byť rovnako efektívne pre všetky fosforylované peptidy a je dôležité na základe niekoľkých faktorov. Proteolýza bielkoviny vygeneruje mnoho peptidov, pričom iba niektoré z nich sú fosforylované. Fosfopeptidy môžu byť menej abundantné ako ich nefosforylované formy a majú nižší ionizačný potenciál ako ich nefosforylované formy. Počas ionizácie elektrospojom sú analyty s najväčším ionizačným potenciálom nabité preferenčne. To znamená, že fosfopeptidy môžu byť vystavené potlačeniu náboja, čím poskytujú slabšie signály ako ich nefosforylované formy peptidov v komplexných vzorkách (White a Wolf-Yadlin, 2016). Pre zvýšenie množstva identifikovaných fosfoproteínov/peptidov je dôležité oddeliť fosfoproteíny/peptidy od nefosforylovaných. K technikám zahustenia fosfoproteínov/peptidov patria imobilizovaná kovová afinitná chromatografia (Immobilized metal affinity chromatography; IMAC), afinitná chromatografia s použitím kovových oxidov (Metal oxide affinity chromatography; MOAC) a iónová kovová afinitná chromatografia založená na polyméroch (Polymer-based metal ion affinity chromatography, PolyMAC). Metóda IMAC využíva kovové kationy ako sú  $\text{Fe}^{3+}$  (Neville *et al.*, 1997) a  $\text{Ti}^{4+}$  (Zhou *et al.*, 2008). Metóda MOAC využíva kovové oxidy, medzi najviac používané patria oxid titaničitý ( $\text{TiO}_2$ ), oxid zirkoničitý ( $\text{ZrO}_2$ ) a hydroxid hlinitý ( $\text{Al(OH)}_3$ ). Princípom metód IMAC a MOAC je zachytenie záporne nabitých fosfoproteínov/peptidov na kladne nabité kovové kationy alebo kovové oxidy naviazané na pevných nosičoch v chromatografickej kolóne (Anderson a Porath, 1986). Princíp metódy PolyMAC spočíva v naviazaní fosfopeptidov na titánové atómy v bočných reťazcoch rozpustného dendriméru. Po naviazaní fosfopeptidu na dendrimér je tento komplex následne zachytávaný cez aldehydovú skupinu dendriméru na pevný nosič. Nefosforylované peptidy sa vymyjú a fosfopeptidy pomaly eluujú z chromatografickej kolóny. Výhodou PolyMAC metódy je vyššia efektivita a selektivita na rozdiel od IMAC a MOAC metód (Illuk *et al.*, 2010).

Gélové metódy detekcie zahŕňajú gélovú separáciu pomocou jednorozmernej IEF, SDS-PAGE alebo pomocou 2D elektroforézy. Fosfoproteíny sú po separácii následne farbené na géli špecifickými fluorescenčnými farbivami, ktoré sa môžu viazať na fosfoserín, fosfotreonín a fosfotyrozín (Stasyk *et al.*, 2005). Následne je možné bielkoviny vizualizovať pomocou Coomassie Brilliant Blue G-250. V prípade jednorozmerných separácií sú obvykle dráhy segmentované na niekoľko častí a tie sú

podrobené proteolytickému štiepeniu a následnej hmotnostnej spektrometrii (Schevchenko *et al.*, 2006). V prípade porovnávacej 2D elektroforézy je nutné denzitu škvŕn softvérovo kvantifikovať a rozdiely medzi vzorkami štatisticky vyhodnotiť. Škvŕny so štatisticky významným rozdielom medzi vzorkami sú z gélu vyrezané. Následne sa proteíny naštiepia a analyzujú pomocou hmotnostnej spektrometrie (St-Denis a Gingras, 2012).

Bezgélová fosfoproteomická analýza využíva separáciu peptidovej zmesi (pripravenej proteolytickým štiepením bielkovín v extrakte) pomocou kvapalinovej chromatografie. Patria sem metódy kvapalinovej chromatografie s hydrofilnou interakciou (Hydrophilic interaction liquid chromatography; HILIC), aniónovýmennej kvapalinovej chromatografie (Strong anionic exchange; SAX), kationovýmennej kvapalinovej chromatografie (Strong cationic exchange, SCX). Princíp metódy HILIC spočíva vo frakcionácii na základe hydrofilnity peptidov. Čím je peptid viac hydrofilný, tým dlhšie putuje kolónou. Fosforylované peptidy sú viac hydrofilné a eluujú z kolóny neskôr (Alpert, 1990). SCX využíva záporne nabitú chromatografickú maticu nazývanú anex. Princíp SCX je, že na anex sa viažu kladne nabité peptidy. Tým pádom majú negatívne nabité fosfopeptidy pri kyslom pH (2,7) tendenciu eluovať z chromatografickej kolóny skôr (Beausoleil *et al.*, 2004). SAX využíva kladne nabitú chromatografickú maticu nazývanú katex. Fosfopeptidy patria k najviac kyslým peptidom, pretože obsahujú záporne nabitú fosfátovú skupinu. Tým pádom sú fosfopeptidy zadržované v chromatografickej kolóne a eluujú neskôr ako nefosforylované peptidy (Nuhse *et al.*, 2004).

### 2.2.2.1 Hmotnostná spektrometria

V súčasných proteomických metódach sa využívajú hlavne ionizačné hmotnostné spektrometrické metódy ako sú MALDI-MS (Matrix assisted laser desorption ionization – mass spectrometry) alebo ESI-MS (Electrospray ionization-mass spectrometry). Technika MALDI-MS využíva vysušenie analytu na maticu a desorpciu laserom, pričom vzniká energia a peptidy sú ionizované (Karas a Hillenkamp, 1988). Technika ESI-MS využíva rozprašovanie analytu v nabitej striekačke. Aerosol je následne vysušovaný suchým dusíkom, pričom dochádza k zníženiu plochy, zvýšeniu náboja a následne je analyt detekovaný (Fenn *et al.*, 1989). V týchto proteomických aplikáciách sa zisťujú poznatky o štruktúre proteínov a peptidov, určení Mr a

identifikácií analyzovaných peptidov. Tieto techniky avšak majú nevýhodu pri peptidovej ionizácii. Ionizácia nemusí byť presná kvôli kontaminačným molekulám ako je napríklad vysušená matrica (Leitner *et al.*, 2011). Navyše, fosfopeptidy nemusia byť preferenčne nabité ako je popísané v podkapitole 2.2.2. V súčasných štúdiách fosforylácie proteínov a identifikácie fosfopeptidov sa využívajú molekulárna hmotnostná spektrometria (Roux a Tribault, 2013) a hlavne aplikácia ICP-MS (Inductively coupled plasma – mass spectrometry; Bettmer *et al.*, 2009). V ICP-MS je ionizačný zdroj plazma ionizovaného vzácneho plynu, najmä argónu, ktorá je generovaná v intenzívnom magnetickom poli, pričom dochádza k zvýšeniu teploty až na 8000 °C. Po aplikácii proteínových vzoriek sú proteíny vďaka vysokej teplote vysušené, disociované, excitované a následne ionizované všetky rovnako nezávisle na štruktúre pôvodnej substancie (Bettmer *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010). Výhodou tejto metódy je absolútna kvantifikácia proteínov, ktoré obsahujú biologicky dôležitý heteroatóm kovalentne naviazaný na proteíny, ktorý súvisí s post-translačnými modifikáciami ako sú napríklad fosforylácia, metylácia alebo glykozylácia (Mounicou *et al.*, 2010).

### 2.2.3 Mikroskopické metódy detekcie

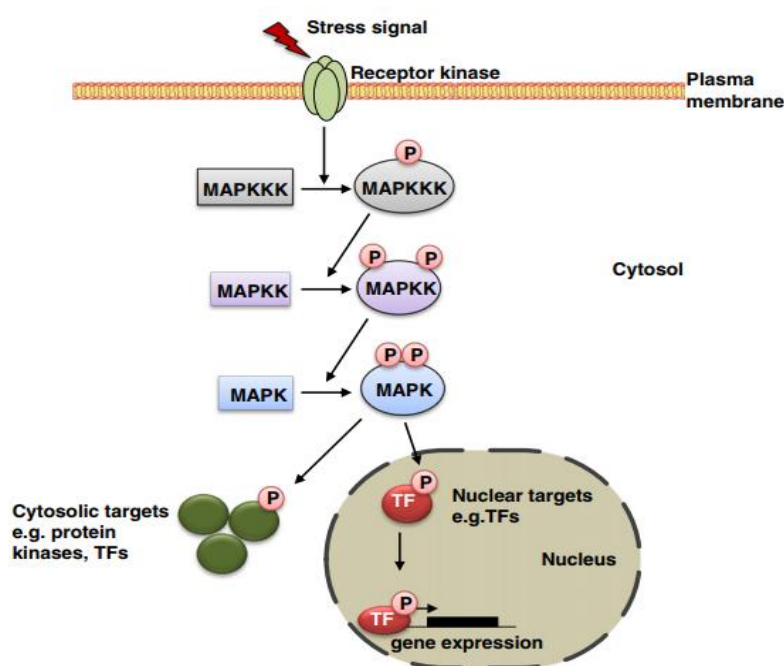
Súčasná metóda mikroskopickej detekcie fosforylácie bielkovín sú založené predovšetkým na fluorescenčnej mikroskopii. Výhodou mikroskopických metód je okrem získania poznatkov o samotnej fosforylácii, ich schopnosť podať informáciu o lokalizácii fosforylovaných bielkovín.

Priamou metódou detekcie je imunoznačenie biologického materiálu pomocou fosfospecifickej protilátky (Smékalová *et al.*, 2014, Takáč *et al.*, 2017). Táto metóda poskytuje nielen kvantitatívnu informáciu o intenzite fosforylácie, ale priamu lokalizáciu fosforylácie. Na rozdiel od iných metód je protilátka priamo viazaná na fosforylovanú aminokyselinu, preto detekcia primárnou protilátkou podáva priame informácie (Takáč *et al.*, 2017). Pre štúdium bielkovín v prenose signálu pomocou *in vivo* fluorescenčnej mikroskopie je nutné fosforylačné značenie bielkovín. V súčasnosti sa najčastejšie využíva expresia konštruktov obsahujúcich bielkovinu sfúzovanú s fluorescenčným proteínom (najčastejšie green fluorescent protein; GFP) pod natívnym promotorom (Takáč *et al.*, 2017). Samotná expresia konštruktu neprináša informáciu o fosforylácii. Je možné však takto sfúzované bielkoviny využiť na analýzu proteín-proteínových interakcií. FLIM (Fluorescence lifetime imaging microscopy) je typ

mikroskopie, ktorá zachytáva fluorescenčný signál patriaci excitovaným chromoforom rádo vo nanosekundách. Excitované chromofry sú charakterizované s fluorescenčnou životnosťou. Fluorescenčná životnosť je citlivá na reakcie v excitovanom stave, ako je napríklad fluorescenčný rezonančný prenos energie (Fluorescence resonance energy transfer; FRET), ktorý je zvyčajne využívaný na detekciu makromolekulárných interakcii v živých bunkách (Sekar a Periasamy, 2003). Detekcia fosforylácie bielkovín môže prebiehať aj použitím mikroskopie atomárných síl. Gong *et al* (2012), detekovali pomocou mikroskopie atomárných síl fosforyláciu komplexu VE (Vascular endothelial)-kadherín pri napadnutí patogénnou baktériou *R.rickettsii* v ľudských bunkách.

### 2.3 Mitogénom aktivované proteínkinázy

Mitogénom aktivované proteínkinázové (MAPK) kaskády tvoria signálne moduly v eukaryotických bunkách (Cargnello a Roux, 2011). MAPK kaskády sa skladajú z troch kinázových úrovní kde dochádza k fosforylácii MAPK kináz kináz (MAPKKK), MAPK kináz (MAPKK) a MAPK (Obr. 4).



(Obr. 4) Všeobecná schéma MAPK kaskády. Receptorová kináza po rozpoznaní extracelulárneho stresového signálu fosforyluje MAPKKK kinázu, ktorá následne fosforyluje kinázy nižšej úrovne. Cieľom MAPK sú proteínkinázy v cytozóle, ktoré sú post-translačne modifikované alebo



transkripčné faktory v jadre, ktoré regulujú expresiu génov pre adaptáciu organizmu na stresové podmienky (prevzaté z Danquah *et al.*, 2014)

MAPK sú serín/treonin-kinázy, ktoré sú schopné fosforylovať (aktivovať/inaktivovať) širokú škálu substrátov, medzi ktoré patria najmä transkripčné faktory, niektoré cytoskeletálne proteíny a cytozolické proteíny (Komis *et al.*, 2018). MAPK majú úlohu v rôznych oblastiach vývoja rastliny ako sú morfogénéza, embryogénéza, gametogénéza, vývoj a formácia semena (Xu a Zhang, 2015) a sú kľúčové v odpovedi rastlín na biotické a abiotické stresy (Sinha *et al.*, 2011). Kompletné osekvenovanie genómu *A. thaliana* identifikovalo 10 MAPK, 20 MAP2K a 80 MAP3K génov (Ichimura *et al.*, 2002).

### 2.3.1 Charakteristika MAPK

MAPK môžeme rozdeliť do 2 typov na základe ich fosforylačného motívu. Prvá sú MAPK s T-E-Y (Thr/Glu/Tyr) motívom a druhá sú MAPK s T-D-Y (Thr/Asp/Tyr) motívom. Aktivita MAPK je regulovaná dvojitou fosforyláciou na aktivačnej slučke na Thr-Xxx-Tyr. Xxx môže byť kyselina asparágová, kyselina glutámová, glycín alebo prolín (Widmann *et al.*, 1999; Morrison a Davis, 2003). MAPK sú regulované štyrmi regulačnými mechanizmami (A-D) na základe A.) substrátovej špecificity, B.) bunkovej kolokalizácie, C.) ulmenia aktivity fosfatázami alebo inhibítormi, D.) interakcií medzi jednotlivými MAPK kaskádami (Wang *et al.*, 2007).

MAPKKK (Mitogénom aktivované proteínové kinázy kinázy kinázy) sú heterogénne proteínové kinázy. Na základe sekvencie kinázovej katalytickej domény delíme MAPKKK v *A. thaliana* na dve podskupiny. V prvej podskupine sa nachádzajú MEKK kinázy (MAPK/ERK kináza kináza). Medzi MEKK patria YODA, ANP1, ANP2, ANP3, AtMEKK1, NPK1 a MAPKKK $\alpha$ . V druhej skupine sa nachádzajú Raf-like kinázy. K najviac preštudovaným Raf-like MAPKKK kinázam patria CTR1 (Constitutive triple response) a EDR1 (Enhanced disease resistance) kinázy (Ichimura *et al.*, 2002). Tieto kinázy sa zúčastňujú pri negatívnej regulácii etylénových signalizačných dráh (Lee *et al.*, 2014).

MAPKK (Mitogénom aktivované proteínové kinázy kinázy) sa delia do štyroch podskupín (A-D) na základe podobnosti ich sekvencie. V podskupine A sa nachádzajú MKK1 a MKK2 kinázy, ktoré sa zúčastňujú v odpovedi *A. thaliana* na soľný stres, stres

z chladu a sucha (Rizhsky *et al.*, 2004), a na interakciu s patogénmi (Meszaros *et al.*, 2006). V podskupine A sa taktiež nachádza MKK6 kináza, ktorá aktivuje MPK13 (Melikant *et al.*, 2004). MPK13 má úlohu vo vývine laterálnych koreňov v *A. thaliana* (Zeng *et al.*, 2011). Do podskupiny B patria MKK3 kinázy, ktoré zohrávajú úlohu v MAPK kaskádach špecifických pre napadnutie patogénmi a sú závislé na funkcii jazmonátovej signalizačnej dráhy (Wasternack a Hause, 2013). Tieto kinázy obsahujú tzv. jadrový prenosový faktor (Nuclear transfer factor; NTF) čo je špecifická signálna doména, pre transport bielkovín z a do jadra. Vďaka tejto doméne majú tieto kinázy úlohu v cytoplazmaticko-jadrovom prenose (Steggerda a Paschal, 2002). Do podskupiny C patria MKK4 a MKK5, ktoré sa zapájajú do obrany *A. thaliana* proti napadnutiu patogénmi. Do podskupiny D zahrňame MKK7 až MKK10. S výnimkou MKK10 majú všetky zvyšné MKK (1-9) súhlasné fosforylačné motívy S/TX<sub>5</sub>S/T. Všetky MKK (1-10) taktiež obsahujú konzervovaný kinázový interakčný motív (K/R<sub>2-3</sub>X<sub>1-5</sub>L/IXL/I) na N-terminálnom konci. Tento motív zohráva kľúčovú úlohu pri MAPK signalizácii u rastlín a živočíchov (Ichimura *et al.*, 2002; Jin *et al.*, 2003; Tanoue a Nishida, 2003).

MAPK kinázy sa delia fylogeneticky do štyroch podskupín (A-D). Podskupiny A, B, C MAPK kináz zdieľajú spoločný fosforylačný motív TEY. Podskupina D MAPK kináz je aktivovaná na TDY fosforylačnom motíve. V podskupine A sa nachádzajú MPK3 a MPK6, ktoré sú kľúčové v odpovedi *A. thaliana* na biotický a abiotický stres (Zhang a Klessig, 2001). V podskupine B sa nachádza MPK4 a MPK11, ktoré sú aktivované pri obrane proti patogénom a určitému typu abiotického stresu (Droillard *et al.*, 2004). MPK4 negatívne reguluje produkciu kyseliny salicylovej (SA) a reaktívnych foriem kyslíku (Reactive oxxygen species; ROS; Gao *et al.*, 2008). Informácie o podskupine C MAPK kináz sú limitované. V tejto podskupine sa nachádzajú MPK1, MPK2 a MPK14 (Ichimura *et al.*, 2002). V podskupine D sa nachádzajú MPK8, MPK9, MPK15 – 20. Cieľom MPK18 sú kortikálne mikrotubuly a je možné jeho zapojenie v signalizácii cytoskeletu (Walia *et al.*, 2009). MPK1 a MPK2 sú aktivované metyljazmonátom, naznačujúc ich úlohu v negatívnej regulácii jazmonátovej signálnej dráhy (Ortiz-Masia *et al.*, 2007).

### 2.3.2 Úloha MAPK v odpovedi na biotický stres

V *A. thaliana* sú tri MAPK, ktoré sú aktivované pri strese z napadnutia patogénmi a to sú MPK3, MPK4, MPK6. Pri napadnutí patogénom rastlina rozpoznáva molekulové domény asociované s patogénmi (Pathogen associated molecular patterns; PAMP) a spúšťa niekoľko úrovní obrany voči týmto patogénom. Flg22 je peptid odvodený od proteínu flagelínu, ktorý sa skladá z 22 aminokyselín. Flagelín je hlavný štruktúrny proteín, ktorý sa nachádza v bakteriálnom bičíku. Flg22 pôsobí ako PAMP pre rastlinné organizmy. Signalizácia prebieha na plazmatickej membráne cez komplex RLK. Tento komplex je zložený z bielkovín FLS2 (Flagellin sensing 2) a BAK1 (BRI1-associated kinase). Pri rozpoznaní bakteriálneho peptidu flg22 a jeho naviazaním na receptor FLS2 sa spúšťajú dve MAPK kaskády. Prvá kaskáda je zložená z MEKK1-MKK1/2-MPK4, kde MPK4 fosforyluje substráty MKS1 (MAP kinase substrate 1) a WRKY33 (Qiu *et al.*, 2008). Druhá kaskáda je zložená z MEKK1-MKK4/5-MPK3/6 kde MPK3 fosforyluje substrát VIP1 (Vire-2 interacting protein 1; Djamei *et al.*, 2007.), VQP (VQ-motif-containing proteins; Pecher *et al.*, 2014), SNC1 (Suppressor of *npr1-1*, CONSTITUTIVE 1; MPK6 fosforyluje substrát ACS6 (ACC synthase 6; Liu *et al.*, 2004) alebo NIA2 (Nitrate reductase 2; Hao *et al.*, 2010). MKS1, WRKY33 a VIP1 spúšťajú expresiu génov a ACS6 spúšťa produkciu etylénu (Colcombet a Hirt, 2008). SNC1 spôsobuje akumuláciu SA v rastlinnom organizme pri napadnutí patogénmi (Li *et al.*, 2007). NIA2 je izoforma NR (Nitrite reductase), ktorej úloha je produkcia oxidu dusného (NO) sprostredkovaná MPK6 pri napadnutí patogénmi (Hao *et al.*, 2010).

### 2.3.3 Sekundárni poslovia

Prenos signálu v rámci rastlinného organizmu je iniciovaný rozpoznaním extracelulárneho signálu vhodným receptorom. Toto rozpoznanie aktivuje produkciu sekundárnych signálov ktoré môžu iniciovať kaskády fosforylácie proteínov (Xiong *et al.*, 2002). Medzi sekundárnymi poslovi, ktorý interagujú s MAPK patria hlavne ROS, ale aj kyselina fosfatidová (Phosphatidic acid; PA) a oxid dusnatý (NO).

Produkcia ROS je v *A. thaliana* indukovaná pri oxidatívnom, soľnom či vodnom strese, strese pri extrémnych teplotách, strese zo sucha (Suzuki *et al.*, 2012) a pri interakciách s patogénmi (O'Brien *et al.*, 2012). Medzi ROS sa radia hlavne peroxid vodíku (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a superoxidové radikály (O<sup>2-</sup>). Tieto molekuly sú toxické pre bunku, pretože

dokázu poškodiť proteíny, DNA a lipidy. Okrem úlohy v signalizačných procesoch, sú ROS dôležité aj pri fyziologických procesoch v bunke (Apel a Hirt, 2004). Peroxid vodíku je produkovaný v ochranných bunkách rastlín pri interakciách s patogénnymi elicitormi (Lee *et al.*, 1999). ROS sa bežne vyskytujú v rastlinných bunkách, avšak vo veľmi nízkych koncentráciách, ktoré nie sú pre bunku nebezpečné. Hladinu ROS v bunkových štruktúrach regulujú antioxidantné enzýmy kataláza a superoxid dismutáza (SOD). ROS hrajú dôležitú úlohu pri MAPK signalizácií. Gén *OXI1* (Oxidative signal induce 1) kóduje serín/treonínkinázu OXI1. OXI1 je potrebná pre úplnú aktiváciu MPK3 a MPK6 pri ovplyvnení oxidatívnym stresom. Zvýšené hladiny ROS indukujú transkripciu OXI1 kinázy, ktorej funkcia je udržiavanie rastu koreňových vláskov pri stresových podmienkach a odolnosť voči *Peronospora parasitica* (Rentel *et al.*, 2004). Regulácia SOD na transkripčnej úrovni po ovplyvnení oxidatívnym stresom je sprostredkovaná MKK5. Táto kináza prenáša fosfosignály na MPK3 a MPK6. (Miles *et al.*, 2009). MPK3 a MPK6 sú pri aktivácii ROS premiestnené do jadra. V jadre sa taktiež nachádza MKP2 (MAPK phosphatase 2), ktorá je aktivovaná oxidatívnym stresom a defosforyluje MPK3 a MPK6 čím spôsobuje zvýšenú toleranciu voči oxidatívnemu stresu (Lee a Ellis, 2007).

NO je plynný sekundárny posol, ktorý sa akumuluje v rastline pri zvýšenej produkcii auxínu, ktorá je spôsobená zvýšením hladiny CO<sub>2</sub>. (Lombardo *et al.*, 2006). Zvýšenie hladiny CO<sub>2</sub> vedie k reorganizácii cytoskeletu v koreňových vláskoch. (Smékalová *et al.*, 2014). Ye *et al.* (2013) uvádzajú, že NO podporuje aktiváciu proteázy podobnej kaspáze 3 (caspase-3-like protease) cez sprostredkovateľa MPK6 v odpovedi *A. thaliana* na stres z ťažkých kovov, konkrétne kadmia.

### **2.3.4 Mitogénom aktivovaná proteínkináza 3 (MPK3)**

Expresia MPK3 je indukovaná pri ovplyvnení rastlinného organizmu biotickým a abiotickým stresom. Je dôležitou kinázou pri obrane organizmu a je súčasťou kaskády, ktorá sa spúšťa pri kontakte s bakteriálnym peptidom flg22 ako obrana proti biotickému stresu (Asai *et al.*, 2001). Aktivita MPK3 kinázy stúpa v organizme pri interakcii s hubami alebo hubovým elicitorom chitínom (Wang *et al.*, 2001). Pri zvýšenej hladine ROS, spôsobujúcich oxidatívny stres, vysoko stúpa aktivita MPK3 proteínu (Kovtun *et al.*, 2000). MPK3 je aktivovaná aj pri hyperosmotickom strese (Droillard *et al.*, 2000), strese z ovplyvnenia ozónom (Ahlfors *et al.*, 2004), strese z chladu a soľnom strese

(Mizoguchi *et al.*, 1996). Okrem abiotického a biotického stresu je MPK3 aktivovaná aj aktivitou ABA. Nadexpresia MPK3 vedie k zvýšeniu citlivosti ABA naznačujúc, že ABA signál je prenášaný cez MPK3 (Lu *et al.*, 2002). MPK3 je dôležitá kináza aj v etylénovej signalizačnej dráhe. Po ovplyvnení ACC, MKK9 sa premiestni do jadra a aktivuje MPK3 a MPK6. ACC aktivované MPK3 a MPK6 následne fosforylujú transkripčný faktor EIN3 (Ethylene-insensitive 3), ktorý spúšťa génovú expresiu (Yoo *et al.*, 2008). Ďalší dôkaz prepájajúci etylén a MPK3 sú *mkk9* mutanti *A. thaliana*, kde aktivácia MPK3 a MPK6 zlyháva. Títo mutanti vykazujú fenotypové znaky, ktoré súvisia s necitlivosťou na etylén ako napríklad nečinnosť ACC na predlžovanie hypokotyly (Chao *et al.*, 1997; Solano *et al.*, 1998). Okrem obrany rastlinného organizmu voči biotickému a abiotickému stresu je MPK3 dôležitá aj pri vývine rastliny. Pri strate aktivity MPK3 a MPK6 dochádza k narušeniu vývoja prieduchov, vedúc k zhlukovaniu prieduchov k sebe (Wang *et al.*, 2007). MPK3 a MPK6 taktiež regulujú vývoj vajíčka (Wang *et al.*, 2008). *A. thaliana* mutant *mpk3-1* vykazuje fenotyp ako divý typ *Columbia*. Má zhoršené uzatváranie prieduchov spôsobené indukciou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Gudesblat *et al.*, 2007). Dvojitý homozygotný mutant *mpk3mpk6* má trpasličí vzrast a typ prieduchov ako *yoda* mutant (Wang *et al.*, 2007).

## 2.4 Fosfolipáza Dα1

Štruktúrne fosfolipidy sú stavebné bloky bunkových membrán. Sú bohatým zdrojom molekúl, ktoré slúžia v bunke ako sprostredkovatelia signálu. Fosfolipázy katalyzujú hydrolýzu týchto štruktúrnych fosfolipidov. Hydrolýza fosfolipidov môže viesť k tvorbe kyseliny fosfatidovej, diacylglycerolu alebo voľných mastných kyselín a k tvorbe voľných molekúl ako sú cholín alebo etanolamín (Wang *et al.*, 2012). Rastlinné fosfolipázy sa delia na fosfolipázy typu D (PLD), C (PLC), A<sub>1</sub> (PLA<sub>1</sub>) a A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>; Wang *et al.*, 2005). PLDα je najviac prevládajúcou formou a je prítomná vo všetkých rastlinných tkanivách (Pappan *et al.*, 1997). V modelovej rastline *A. thaliana* sú PLD najviac preštudovanými enzýmami v odpovedi na environmentálny stres a jeho funkciu v organizme. Najvýraznejšiu expresiu má PLDα1 v rizoderme, rizodermálne bunky ukázali silnejšiu expresiu PLDα1 v trichoblastoch oproti atrichoblastom. Vo vzdušných orgánoch bola PLDα1 identifikovaná s vysokou expresiou v epidermálnych bunkách hypokotyly a v prieduchových ochranných bunkách v listoch, konkrétne v cytozole na bunkovom kortexe v blízkosti plazmatickej membrány (Novák *et al.*, 2018).

V *A. thaliana* sa nachádza 12 identifikovaných génov, ktoré kódujú rôzne typy PLD. Delia sa na PLD $\alpha$  (1-3), PLD $\beta$  (1,2), PLD $\gamma$  (1-3), PLD $\delta$ , PLD $\epsilon$  a PLD $\zeta$  (Wang *et al.*, 2006). Hlavným substrátom PLD $\alpha$ 1 je fosfatidylcholín, hydrolyzou ktorého sa tvorí signálna molekula kyselina fosfatidová (Phosphatidic acid; PA) a rozpustný cholín. Funkcia PLD $\alpha$ 1 v rastlinnom organizme je úzko regulovaná sekundárnym poslom Ca<sup>2+</sup> (Zheng *et al.*, 2000), pH (Pappan a Wang, 1999) a G proteínmi (Roy a Pandey, 2017). PLD $\alpha$ 1 interaguje s  $\alpha$ -podjednotkou G proteínu a sprostredkúva ABA-závislú signalizáciu v *A. thaliana* (Zhao *et al.*, 2013). Aktivita PLD $\alpha$ 1 rapídne stúpa pri odpovedi na rôzne typy environmentálneho stresu, hlavne na stres zo sucha, soľný stres, poranenie (Vu *et al.*, 2015) a stres voči patogénom. PA sa viaže na MPK6 a stimuluje kinázovú aktivitu po ovplyvnení soľným stresom. Mutantné rastliny s neexprimujúcou PLD $\alpha$ 1 obsahujú menšiu hladinu PA a aktivita MPK6 je výrazne menšia. Toto zoslabenie vedie ku akumulácii Na<sup>+</sup> v listoch a zvyšuje citlivosť *A. thaliana* na soľný stres (Yu *et al.*, 2010). Rastliny *A. thaliana*, deficientné v expresii PLD $\alpha$ 1, majú zvýšenú odolnosť voči stresu zo sucha (Sang *et al.*, 2001). Rastliny deficientné v strese zo sucha alebo ABA produkovanou PA, strácajú viac vody a vykazujú nižšiu toleranciu na sucho (Hong *et al.*, 2008; Sang *et al.*, 2001). Tieto poznatky môžu naznačovať, že zvyšujúca sa produkcia PA v rastlinách hrá úlohu pri znížení obsahu stratenej vody a pri znížení tolerancie na stres zo sucha. PLD $\alpha$ 1 je dôležitá v mnohých fyziologických procesoch v bunke ako je napríklad vezikulárny transport alebo reorganizácia cytoskeletu (Bargmann *et al.*, 2009). PLD je negatívny regulátor biosyntézy prolínu v *A. thaliana*. (Thiery *et al.*, 2004). Stresové signály spôsobujú iniciáciu prestavby plazmatickej membrány pričom PLD $\alpha$ 1 môže byť fyzicky zapojená v týchto procesoch prestavby (Gigon *et al.*, 2004). Pri ovplyvnení soľným stresom, PLD $\alpha$ 1 reguluje odpoveď rastliny cez modifikácie mikrotubulov. Podobné regulačné interakcie medzi mikrotubulmi a PLD $\alpha$ 1 majú funkčné dôsledky pri odpovedi na soľný a hyperosmotický stres (Zhang *et al.*, 2012), uzatváraní prieduchov indukované ABA (Jiang *et al.*, 2014) a vývinových procesov spojených s reorganizáciou mikrotubulov spôsobených cytoskeletálnymi inhibítormi (Zhang *et al.*, 2017). PLD $\alpha$ 1 stimuluje produkciu superoxidu, ktorá je závislá na PA a spôsobuje bunkovú smrť (Sang *et al.*, 2001). PLD $\alpha$ 1 interaguje s AP-2 komplexom a klatrínom v *A. thaliana*, naznačujúc, že PLD $\alpha$ 1 spolupracuje na endocytóze sprostredkovanej klatrínom (Yamaoka *et al.*, 2013). PLD $\alpha$ 1 má taktiež ochrannú funkciu v zakrivených oblastiach protoplastov, ktoré sú oddelené od bunkovej

steny v priebehu plazmolýzy v odpovedi na soľný stres (Novák *et al.*, 2018). PLD $\alpha$ 1 môže byť fosforylovaná MAPK pri abiotickom strese (Takáč *et al.*, 2016).

### 3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

#### 3.1 Materiál a metódy

##### 3.1.1 Biologický materiál

Rastliny *Arabidopsis thaliana* ekotyp Columbia (Col-0) a mutantné *mpk3-1* (T-DNA inzerčný mutant z kolekcie SALK (SALK\_151594; Carey *et al.*, 2008), *plda1-1* (T-DNA inzerčný mutant z kolekcie SALK (SALK\_067533; Bargmann *et al.*, 2009; Novák *et al.*, 2018) a *plda1-2* rastliny (T-DNA inzerčný mutant z kolekcie SALK (SALK\_053785; Zhang *et al.*, 2004; Novák *et al.*, 2018).

##### 3.1.2 Chemikálie

Tab.1 Zoznam použitých chemikálií

Názov chemikálie	Dodávateľ
2-merkaptoetanol	Sigma-Aldrich
40 % Akrylamid 37, 5:1	Biorad
4x Laemmli pufo	Biorad
Acetón	Sigma-Aldrich
Agaróza	Sigma-Aldrich
Akrylamid	Sigma-Aldrich
IPG Buffer pH 3-10 (amfolyty)	GE Healthcare
Amid kyseliny jódooctovej (IAA)	Sigma-Aldrich
Bis-akrylamid	Sigma-Aldrich
5x Bradford protein reagent	Biorad
Brómfenolová modrá	Sigma-Aldrich
Dimethyl (3-(propyl)azaniumylpropán)-1-sulfonát (CHAPS)	Sigma-Aldrich
Chlorid draselný	Sigma-Aldrich
Chlorid horečnatý	Sigma-Aldrich
Chlorid sodný	Sigma-Aldrich



Clarity ECL Western Blotting substrate	Biorad
Complete (Protease Inhibitor Cocktail Tablets)	Roche
Dithiotreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
Dodecylsulfát sodný (SDS)	Sigma-Aldrich
Dusičnan zinočnatý	Sigma-Aldrich
Etanol	PENTA
Fenol pufrovaný Trisom pH 8,8	Sigma-Aldrich
Gellan gum	Alfa-Aesar
Glycerol	Sigma-Aldrich
Glycín	Sigma-Aldrich
Hydrogénsiričitan sodný	Sigma-Aldrich
Hydroxid draselný	Sigma-Aldrich
HEPES	Duchefa
MOPS	Sigma-Aldrich
Kyselina chlór vodíková	Sigma-Aldrich
Kyselina etyléndiamíntetraoctová (EDTA)	Sigma-Aldrich
Kyselina etylénglykoltetraoctová (EGTA)	Sigma-Aldrich
Lambda fosfatáza	
Metanol	Sigma-Aldrich
Močovina	Sigma-Aldrich
Murashige a Skoog médium	Duchefa
Octan amónny	Sigma-Aldrich
Peroxodisíran amónny (APS)	Biorad
Phostag ligand	WAKO Laboratory Chemicals

Phostop (Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets)	Roche
2-propanol	PENTA
Roche blocking solution	Roche
Sacharóza	Sigma-Aldrich
TGX Stain free FastCast Acrylamide Kit 7,5 %	Biorad
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Tetrametyletyléndiamín (TEMED)	Sigma-Aldrich
Tiomočovina	Sigma-Aldrich
Tris	Sigma-Aldrich
Tween-20	Sigma-Aldrich

Tab. 2 Zoznam použitých protilátok

Názov protilátky	Dodávateľ
Goat anti-rabbit IgG konjugovaná s HRP	Sigma-Aldrich
Rabbit anti-MPK3	Sigma-Aldrich
Rabbit anti-PLD $\alpha$ 1	Sigma-Aldrich

### 3.1.3 Prístroje

Tab. 3 Zoznam použitých prístrojov

Názov prístroja	Dodávateľ
Analytické váhy (XA 110/2X)	RADWAG
Aparatúra pre SDS-PAGE	Biorad
Centrifúga (Allegra 64R)	Beckmann Coulter
ChemiDoc <sup>TM</sup> MP Imaging System	Biorad

Digestor	Merci
Ettan IPG Phor 3	GE Healthcare
Flowbox	Merci
Infinite M Nano	TECAN
pH meter (PC 2700)	Eutech – Instruments
Rocker-Shaker MR-12	Biorad
Simplicity UV Water Purification Systems	Merck Millipore
Thermoshaker TS-100	BioSan
Trans Blot Turbo Transfer System	Biorad
Vortex-2-Genie	Scientific Industries

## 3.2 Metódy

### 3.2.1 Príprava rastlinného materiálu

Semená *A. thaliana* boli vysterilizované v troch krokoch. Všetky kroky prebehli v sterilných podmienkach v sterilnom boxe. V prvom kroku boli semená inkubované v 70 % etanole po dobu 5 minút. V druhom kroku prebehla inkubácia v 96 % etanole po dobu 1 minúty. Následne boli semená premyté 3x sterilnou destilovanou vodou. Po premytí sa semená naniesli na sterilný filtračný papier a nechali uschnúť. Následne sa semená naniesli na ½ MS médium (10 g/l sacharóza, 2,15 g/l MS basal salt mixture, 1 g/l MES, 6 g/l Gellan gum, pH (5,8)) a uložili do chladničky na 1 deň pre stratifikáciu semien pri 4 °C. Následne sa semená vystavili do fytotronu na 14 dní pri dennom režime 16/8 a pri teplote 21 °C.

### 3.2.2 Ovplynenie rastlín stresom zo sucha

Stres zo sucha sa indukoval u rastlín podľa Umezawa *et al.*, 2013. Štrnásť dňové rastliny *A. thaliana* ekotyp Col-0 a mutantov *mpk3-1* boli inkubované 24 hodín v destilovanej vode (v Petriho miskách) pri stálom pomalom kývaní. Následne sa časť rastlín preniesla na suchý filtračný papier, kde sa nechali 1,5 hodiny v laboratórnych podmienkach. Druhá časť rastlín slúžila ako tzv. suché a mokré kontroly. Ako suché kontroly slúžili rastliny, ktoré neboli vystavené inkubácii v destilovanej vode ani suchu.

Ako mokré kontroly boli použité rastliny, ktoré boli inkubované 24 hodín v destilovanej vode a neboli vystavené suchu. Tieto rastliny boli podrobené biochemickej analýze. Pre pozorovanie fyziologického stavu rastlín v odpovedi na stres zo sucha boli 14 dňové rastliny *A. thaliana* prenesené *ex vitro* do kvetináčov a kultivovali sa 3 týždne vo fytotrone. Po uplynutí 3 týždňov sa časť rastlín podrobila stresu zo sucha po dobu 10 dní. Stres zo sucha sa indukoval u rastlín ich nezalieváním. Kultivácia rastlín prebehla vo fytotrone pri dennom režime 16/8 a pri 21 °C.

### 3.2.3 Extrakcia a precipitácia proteínov pre 2D elektroforézu

Na detekciu PLD $\alpha$ 1 a MPK3 pomocou 2D elektroforézy boli použité 14 dňové rastliny *Arabidopsis thaliana* ekotyp Col-0 a mutanti *mpk3-1* a *pld1-1*. Bielkoviny boli extrahované fenolovou extrakciou s následnou precipitáciou metanolom (Hurkman a Tanaka, 1986; Takáč *et al*, 2011). Rastliny boli odobraté z ½ MS média a homogenizované na jemný prášok v trecej miske s použitím tekutého dusíka. Homogenát bol prenesený do plastovej skúmavky kde k nemu bolo pridaných 0,5 ml extrakčného pufru (0,9 mol/l sacharóza, 0,1 mol/l Tris-HCl (pH 8,8), 10 mmol/l EDTA, 0,1 mol/l KCl) a následovala inkubácia na ľade 15 minút a 0,5 ml Trisom pufovaného fenolu (pH 8,8). Následne bola zmes vortexovaná a inkubovaná 30 minút pri 4 °C. Po inkubácii boli vzorky centrifugované 5 minút, pri 6000 g a 4 °C. Vďaka centrifugácii došlo k oddeleniu fenolovej fázy (obsahujúcej bielkoviny) od tzv. vodnej fázy s nebielkovinovými zložkami. Vrchná fenolová fáza bola odobraná do novej skúmavky. K vodnej fáze bolo následne pridaných ďalších 0,5 ml Trisom pufovaného fenolu (pH 8,8). Zmes bola vortexovaná a centrifugovaná 5 minút, pri 6000 g a 4 °C. Následne sa znova odobrala vrchná fenolová časť. Obe fenolové fázy boli zmiešané a bielkoviny boli precipitované cez noc pri -20 °C pridaním 5 násobného objemu 0,1 mol/l acetátu amónneho v 100 % metanole. Na druhý deň bola suspenzia centrifugovaná 20 minút, pri 13000 g a 4 °C. Supernatant bol odstránený a k precipitátu (pelet) bol pridaný 1 ml studeného 0,1 mol/l acetátu amónneho v 100 % metanole. Po vortexovaní (kvôli rozrušeniu peletu) sme suspenziu inkubovali 15 min pri -20 °C. Po následnej centrifugácii (10 min, 13000 g, 4 °C) sa podobným spôsobom pelet premyl dvakrát 2x 80 % acetónom, 1x 70 % etanolom a 1x 80 % acetónom (roztoky boli predchladené pri -20 °C). Po poslednom premývaní sa proteínové pelety nechali vysušiť v digestore 10 minút pri izbovej teplote. Bielkoviny boli po vysušení rozpustené v 125  $\mu$ l rehydratačného pufru (Tab 4.) jednu hodinu pri izbovej teplote. Pre detekciu PLD $\alpha$ 1 sme použili

optimalizovaný rehydratačný pufor (Tab 5.). Separácia proteínov prebehla pomocou SDS-PAGE, kedy sme určité vzorky rozpustili v rehydratačnom pufri s 2 % CHAPS a 2 % Triton X-100 a zvyšné vzorky rozpustili v 4 % Triton X-100.

Tab.4 Zloženie rehydratačného pufra pre rozpustenie bielkovín

Zloženie	Objem (20 ml)
8 M močovina	9,609 g
2 M thiomočovina	3,044 g
2 % CHAPS	0,4 g
2 % Triton X-100	0,4 ml
50 mmol/l DTT	0,0077 g/ml
Destilovaná voda	Doplnená do 20 ml

Tab 5. Zloženie optimalizovaného rehydratačného pufra

Zloženie	Objem (20 ml)
8 M močovina	9,609 g
2 M thiomočovina	3,044 g
4 % Triton X-100	0,8 ml
50 mmol/l DTT	0,0077 g /ml
Destilovaná voda	Doplnená do 20 ml

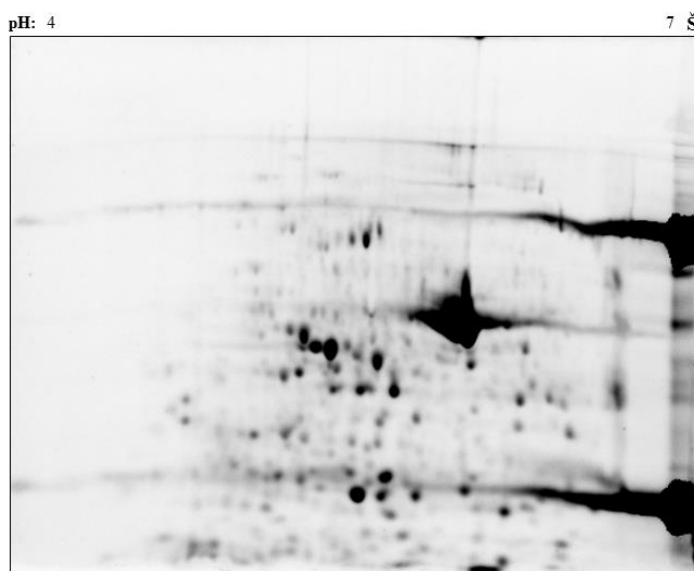
### 3.2.4 Meranie koncentrácie bielkovín

Koncentrácie proteínov boli stanovené pomocou metódy podľa Bradforda (Bradford, 1976) v mikrotitračných 96 jamkových doštičkách. Bola pripravená zmes 239  $\mu$ l destilovanej vody, 60  $\mu$ l 5x Bradford protein reagent a 1  $\mu$ l bielkovinového

extraktu. Meranie koncentrácie prebiehalo na prístroji Infinite M Nano (TECAN) pri 595 nm.

### 3.2.5 Separácia proteínov pomocou dvojrozmernej elektroforézy

Rehydratácia IPG prúžkov prebiehala pasívne na plastovom stojane s dráhami v tzv. IPG boxe (GE Healthcare) cez noc (16 hod). Proteínové extrakty (s obsahom proteínov 50  $\mu\text{g}$ ) obohatené o 5 % (v/v) amfolyty (pH 3-10) a 0,002 % (w/v) BFB boli nanosené do dráhy IPG boxu v množstve 125  $\mu\text{l}$  v dĺžke 7 cm. Do týchto extraktov sa vložili gélové prúžky (7 cm, pH 4-7; Biorad) gélovou stranou dole tak, aby bol gél v celej svojej dĺžke v kontakte s extraktom. Na druhý deň sa rehydratované gélové prúžky vložili na keramickú platňu v prístroji Ettan IPG Phor 3. Gélové prúžky boli zaliate komerčným syntetickým olejom na zabránenie odparovania a na ich konce boli pridané vlhké filtračné papiere tak, aby čiastočne pokrývali gél. Na tieto konce sa následne pripojili elektródy. Po napojení elektród sa spustil prvý rozmer (IEF) dvojrozmernej elektroforézy, ktorý trval približne 5 hodín od 150 V (do dosiahnutia 150 VH), 500 V (do dosiahnutia 500 VH) a 4000 V (do dosiahnutia 15000 VH) pri izbovej teplote. Gél po dvojrozmernej elektroforéze sa nachádza na obrázku 5.



(Obr.5): Reprezentatívny obrázok dvojrozmerného gélu z bielkovinových extraktov z celých rastlín *A. thaliana* ekotyp Col-0.

Po IEF sa gélové prúžky opláchli v SDS elektródovom pufri a inkubovali sa v ekvilibračnom pufri (6 mol/l močovina, 50 mmol/l Tris-HCl (pH 8,8), 2 % (w/v) SDS, 30 % (v/v) glycerol, 0,002 % (w/v) BFB) po dobu 15 minút s 1 % DTT (redukcia) a po dobu 15 minút s 2,5 % IAA (alkylácia). Po inkubácii sa gélové prúžky vložili medzi sklá elektroforetickej aparatúry MiniProtean Tetra Cell priamo na 10 % separačný polyakrylamidový gél (Tab. 6) tak, aby sa zabránilo vzniku vzduchových bublín medzi prúžkom a gélom. Prúžky sa stabilizovali na SDS-PAGE géli pomocou navrstvenia 0,5 % agarózou. Aplikácia bielkovinového štandardu prebiehala nanosením štandardu na filtračný papier v tvare štvorca s rozmermi 0,5 x 0,2 cm, ktorý sa vložil vedľa proteínového prúžku na gél. Po stuhnutí agarózy bola spustená SDS-PAGE v prostredí SDS elektródového pufri pri 60, 120, 180 V, 1,5 hodiny pri izbovej teplote.

Tab. 6 Zloženie 10 % rozdeľovacieho polyakrylamidového gélu.

Zloženie 10 % gélu	Objem (10 ml)
40 % Akrylamid 37,5:1	2,5 ml
Destilovaná voda	4,85 ml
1,5 mol/l Tris-HCl pH 8,8	2,5 ml
10 % SDS	0,1 ml
10 % APS	0,05 ml
TEMED	0,005 ml

### 3.2.6 Imunoblotovanie

Transfer bielkovín z gélu na PVDF membránu bol uskutočnený polosuchou metódou pomocou prístroja TransBlot Turbo Transfer System (Biorad; Kurien *et al.*, 2015).

PVDF membrána (9 x 7 cm) bola rehydratovaná 30 sekúnd v 100 % metanole a následne inkubovaná 5 minút v tzv. transferovom pufri (20 % (v/v) 5x Transfer buffer (Biorad), 20 % (v/v) 96 % etanol, 60 % (v/v) destilovaná voda). Podobne boli inkubované

aj filtračné papiere. Po 5 minútach bol na dno transferovej kazety položený filtračný papier, na ktorý sa navrstvila PVDF membrána. Vzduch medzi filtračným papierom a membránou sa eliminoval tlakom pomocou plastového valčeka. Na membránu sa položil gél a následne filtračný papier. Vzduchové bubliny sa opäť vytlačili pomocou valčeka. Kazeta sa uzatvorila a prenos prebiehal pri 10 mA po dobu 10 minút. Po skončení prenosu boli membrány inkubované v Ponceau S pre vizualizáciu nanosenia proteínov. Membrány boli po inkubácii v Ponceau S vymyté destilovanou vodou a inkubované v blokovacom roztoku (15 % (v/v) Roche blocking solution v TBS-T) cez noc pri 4 °C. Na druhý deň boli inkubované 5 hodín pri laboratórnych podmienkach v roztoku s primárnou protilátkou pri miernom kývaní (anti-MPK3, králičia monoklonálna protilátka (Sigma-Aldrich); riedená 1:2000 (v/v) v 2,5 % Roche blocking solution; anti-PLD $\alpha$ 1, králičia polyklonálna protilátka (Sigma-Aldrich); riedená 1:3000 (v/v) v Roche blocking solution). Protilátka anti-PLD $\alpha$ 1 rozoznáva PLD $\alpha$ 1 a PLD $\alpha$ 2. PLD $\alpha$ 2 je však peľovo špecifická izoforma, vo vegetatívnych orgánoch preto rozoznáva PLD $\alpha$ 1. Po inkubovaní v primárnej protilátke sa membrány premývali 5 x 10 minút v TBS-T pri intenzívnom kývaní. Membrány boli následne inkubované 1,5 hodiny v laboratórnych podmienkach v roztoku so sekundárnou protilátkou pri miernom kývaní (anti-rabbit IgG, konjugovaná s chrenovou peroxidázou; riedená 1:5000 (v/v) v 2,5 % Roche blocking solution). Po inkubovaní v roztoku so sekundárnou protilátkou boli membrány znova premývané 5 x 10 minút v TBS-T pri intenzívnom kývaní. Na detekciu chemiluminescentného signálu sme použili „Enhanced chemiluminescence“ (ECL, Biorad) substrát a signál sme následne detekovali na dokumentačnom prístroji Chemidoc<sup>TM</sup> (Biorad). Kvantifikácia intenzity škvŕn bola vyhodnotená v programe ImageLab a ImageJ.

### 3.2.7 Detekcia fosforylácie pomocou Phostag technológie

14 dňové rastliny *A. thaliana* boli homogenizované v tekutom dusíku a extrahované v tzv. E-extrakčnom pufrom (50 mmol/l HEPES, 75 mmol/l NaCl, 1 mmol/l EGTA, 1 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 1 mmol/l NaF, 10 % (v/v) glycerol, obohatený o inhibítory proteáz (Complete; Roche) a fosfatáz (Phostop; Roche) a 1 mmol/l DTT). Bielkovinový extrakt bol niekoľkokrát premiešaný vortexovaním a inkubovaný 15 minút na ľade. Následne bol extrakt centrifugovaný 15 minút, pri 13000 g a 4 °C. Supernatanty boli dvakrát prečistené pomocou odsolovacích ultrafiltrov (kolóniek) Amicon (Millipore), ktoré zadržávajú zložky väčšie ako 10 kDa. Extrakty sa aplikovali do kolóniek a boli podrobené centrifugácii 10 minút, pri 14000 g a 4 °C. Retentát bol



prenesený do novej skúmavky a bol k nemu pridaný 4x Laemmli pufoer a 5 % (v/v) 2-merkaptoetanol. Vzorky sa nechali povariť 5 minút pri 95 °C. Takto denaturované proteínové extrakty boli potom centrifugované 10 minút, pri 13000 g a 20 °C a znova prenesené do novej skúmavky. Vzorky (15 µg bielkovín) boli následne pipetované do dráh 7 % polyakrylamidového gélu s prídavkom Phostag ligandu (zloženie v tabuľkách 7 a 8). Po napipetovaní sa elektroforetická aparátúra s géloom zaliala 500 ml Phostag elektródového pufru (20 x 50 mmol/l MOPS + 50 mmol/l TRIS + 0,1 % (w/v) SDS, 5 mmol/l hydrogénsiričitan sodný, destilovaná voda) a spustila sa elektroforéza 1 hodinu, 180 V pri izbovej teplote. Po skončení SDS-PAGE boli gély inkubované 2 x 15 minút v 0,01 mol/l EDTA v prenosovom pufri (bez prídavku metanolu) s obsahom hydrogénsiričitanu sodného. Následne 10 minút v 0,001 mol/l EDTA v prenosovom pufri s hydrogénsiričitanom sodným. PVDF membrána bola rehydratovaná 30 sekúnd v 100 % metanole a následne 10 minút v 0,001 mol/l EDTA v prenosovom pufri. V rovankom roztoku boli inkubované aj gély a filtračné papiere. Po inkubácií prebehol prenos pri 24 V cez noc. Po prenose boli membrány podrobené imunoblotovaniu so špecifickými protilátkami podobne ako v kapitole 3.4.6. Zároveň s elektroforézou v géloch s Phostag ligandom sme bielkovinové extrakty s obsahom bielkovín 15 µg elektroforeticky rozdelili na 10 % SDS-PAGE géloch. Elektroforéza prebiehala rovnako ako v prípade druhého rozmeru 2D gélov s tým, že bolo aplikované konštantné napätie 180 V, 1 hodinu pri izbovej teplote. Imunoblotovanie prebehlo obdobným spôsobom ako v kapitole 3.4.6.

Tab. 7 Zloženie 7 % rozdeľovacieho Phostag gélu

Zloženie 7 % gélu	Objem (5 ml)
1,25 mol/l bis-Tris-HCl, pH 6,8	1,430 ml
40 % Akrylamid	0,875 ml
Destilovaná voda	2,580 ml
10 mmol/l dusičnan zinočnatý	0,05 ml
5 mmol/l Phostag ligand	0,05 ml
10 % APS	0,0125 ml

TEMED	0,0025 ml
-------	-----------

Tab. 8 Zloženie 7 % zaostrovacieho Phostag gélu

Zloženie 7 % gélu	Objem (2 ml)
1,25 mol/l bis-Tris-HCl, pH 6,78	0,715 ml
40 % Akrylamid	0,250 ml
Destilovaná voda	1,520 ml
10 % APS	0,0125 ml
TEMED	0,0025 ml

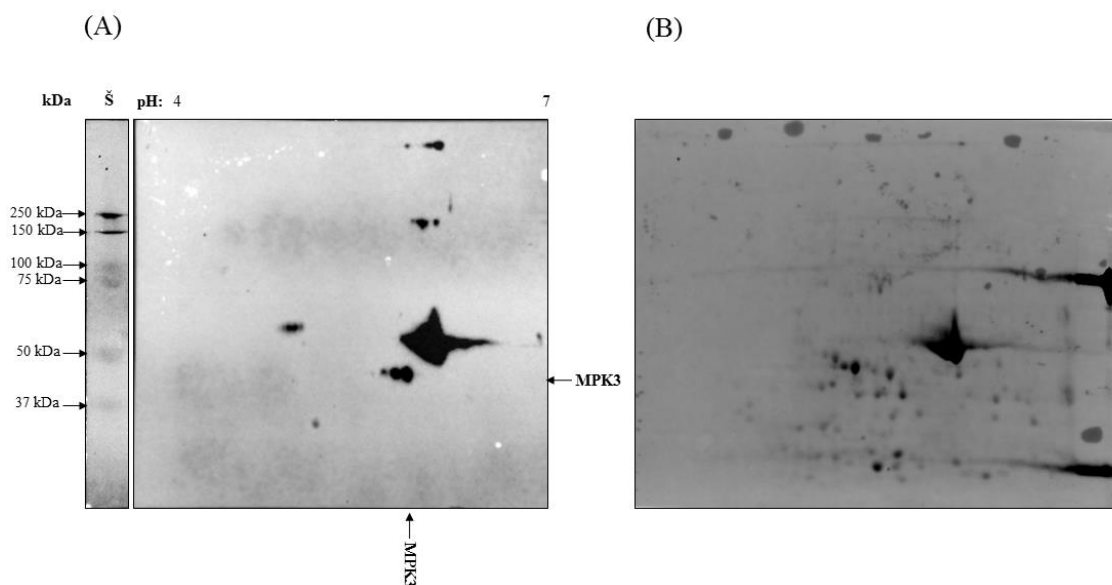
### 3.2.8 Defosforylácia bielkovín pomocou lamba fosfatázy

Časť extraktu pripraveného E-extrakčným pufrom bez prídavku fosfatázových inhibítorov bola inkubovaná s lambda fosfatázou podľa nasledovného postupu. Pripravili sme 240  $\mu$ l reakčnej zmesi zloženej z 118  $\mu$ l destilovanej vody, 60  $\mu$ l extraktu (120  $\mu$ g bielkovín), 24  $\mu$ l lambda fosfatázového pufru (500 mmol/l Tris-HCl, (pH 7,5), 1 mmol/l Na<sub>2</sub> EDTA, 50 mmol/l DTT, 0,1 % (v/v) Brij 35), 24  $\mu$ l 20 mmol/l MnCl<sub>2</sub> a 4  $\mu$ l  $\lambda$ -fosfatázy (800U). Reakčnú zmes sme inkubovali 60 minút pri 30 °C. Po inkubácii sme k reakčnej zmesi pridali 80  $\mu$ l 4 násobne koncentrovaného Laemmli pufru a po premiešaní sme ju povarili 5 minút pri 95 °C.

## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Detekcia MPK3 pomocou dvojrozmernej elektroforézy a imunoblotovania

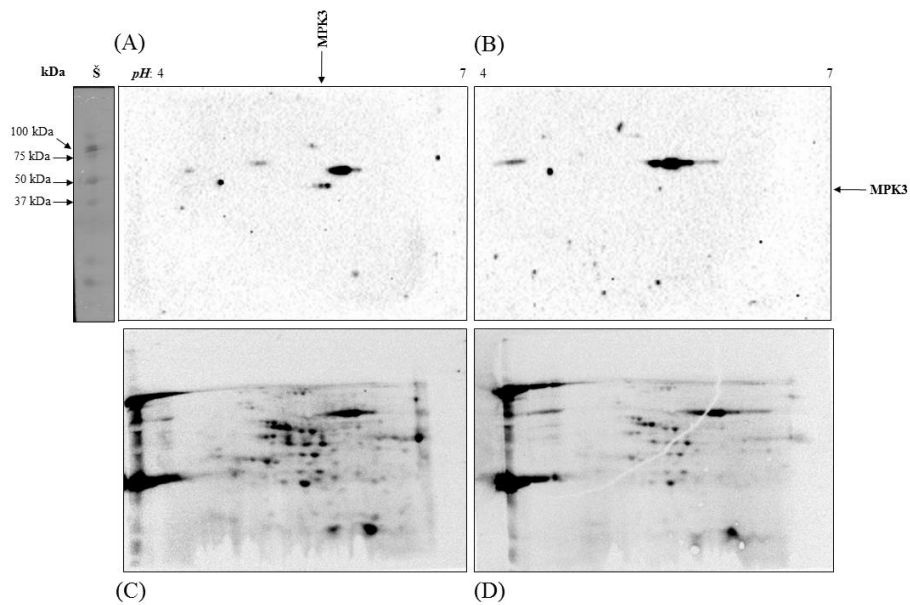
Pomocou špecifickej primárnej protilátky antiMPK3 sme na imunoblote pripraveného z 2D gélu detekovali 3 škvrny s Mr 42 kDa, čo predstavuje hodnotu veľmi blízku databázovej hodnote Mr MPK3 ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org), At3g45640; 42,7). Detekované škvrny mali rozdielny pI, a to 5,88, 5,82 a 5,77 (Obr. 6A). Dané škvrny mali rôznu intenzitu (Obr. 7B). Najvyššiu intenzitu mala škvrna na zásaditej strane imunoblotu a v smere do kyslej oblasti sa ich intenzita znižovala. Najintenzívnejšia škvrna mala pI zhodné s databázovou hodnotou MPK3 (pI 5,85), čo naznačuje, že táto škvrna s najväčšou pravdepodobnosťou predstavuje MPK3. Okrem týchto škvrn sú na imunoblote viditeľné ďalšie škvrny, ktoré sú nešpecifické. Jedna z nich (Mr 50 kDa, pI 5,97) zodpovedá veľkej podjednotke RUBISCA (Ribulóza-1,5-bisfosfátkarboxyláza). Prítomnosť škvrn s Mr rovnakou ako MPK3 ale s kyslejším pI naznačuje, že ide o dvojitú fosforyláciu tohoto proteínu.



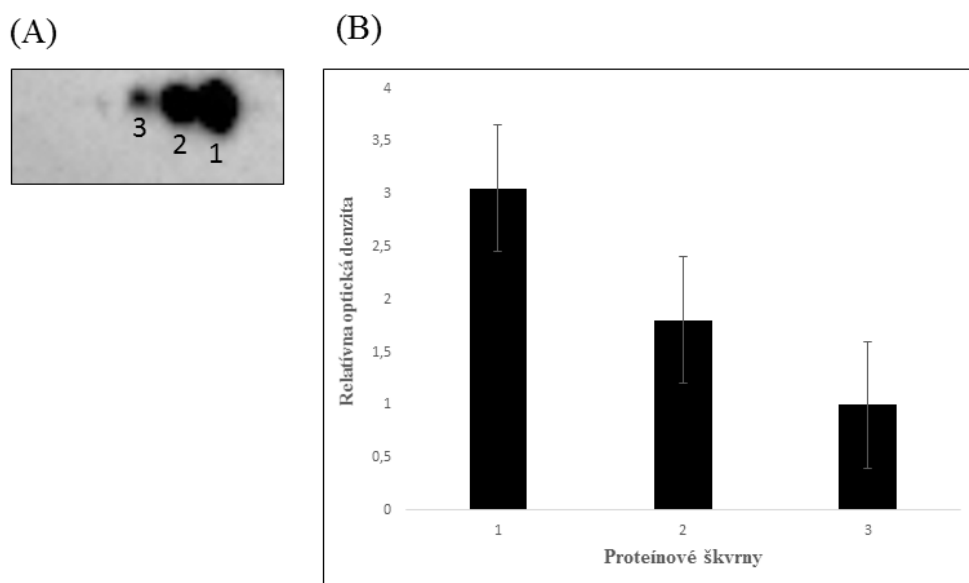
Obr.6: (A) Imunoblot z 2D gélu pripravený z proteínového extraktu divého typu rastliny *A.thaliana* ekotyp Col-0 pomocou anti-MPK3 protilátky; (B) vizualizácia bielkovín na PVDF membráne po prenose. Šípka vpravo a dole ukazuje na pozíciu Mr zodpovedajúcu databázovým hodnotám Mr MPK3 proteínu. Š – proteínový štandard, kDa – molárna hmotnosť.

Pre potvrdenie, či sa jedná o špecifický signál ktorý zodpovedá MPK3 sme porovnali 2D gél z divého typu Col-0 s 2D gélom z *mpk3-1* mutantých rastlín. Imunoblotová analýza z

rastlín *A. thaliana* ekotyp Col-0 ukázala signál (Obr. 5A) zhodný s predchádzajúcim experimentom (Obr. 5), čo potvrdilo reprodukovateľnosť metódy. Na rozdiel od divého typu (Obr. 6A) na imunoblote pripravenom z *mpk3-1* mutanta v tejto oblasti nebol detekovaný žiadny signál (Obr. 6B) Z toho vyplýva, že všetky tri škvrny sú špecifické pre MPK3. Okrem špecifického signálu boli detekované škvrny (napríklad veľká podjednotka RUBISCO), ktoré sa nachádzali ako v divom type, tak aj v mutante. Tieto škvrny sú preto nešpecifické a nemôžu sa priradiť k MPK3.



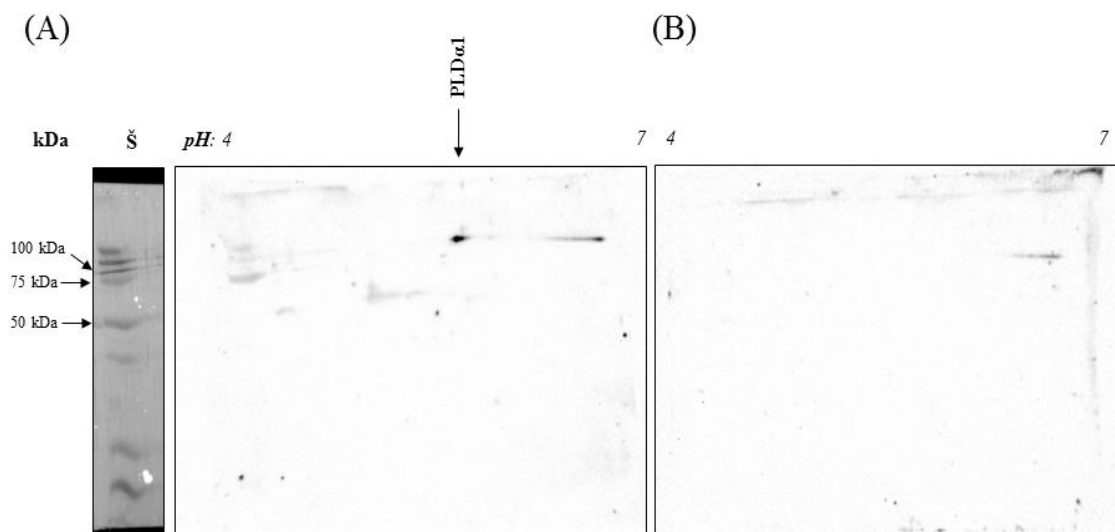
Obr.6: (A) Imunoblot z 2D gélu pripravený z proteínového extraktu divého typu rastlín *A. thaliana* ekotyp Col-0, (B) imunoblot z 2D gélu pripravený z proteínového extraktu *mpk3-1* mutantných rastlín *A. thaliana* pomocou anti-MPK3 protilátky (C) vizualizácia bielkovín z rastlín *A. thaliana* ekotyp Col-0 na PVDF membráne po prenose (D) vizualizácia bielkovín z *mpk3-1* mutantných rastlín *A. thaliana* na PVDF membráne po prenose. Šípka znázorňuje MPK3 proteín a jeho fosforylácie v divom type Col-0 pričom špecifický signál zodpovedajúci týmto hodnotám sa v *mpk3-1* mutante nenachádza. Š – proteínový štandard, kDa – molárna hmotnosť.



Obr.7: (A) detail bielkovinových škvŕn z MPK3 imunoblotu z obrázku 6A, (B) relatívna optická denzita bielkovinových škvŕn z obrázku A.

## 4.2 Detekcia PLD $\alpha$ 1 pomocou dvojrozmernej elektroforézy

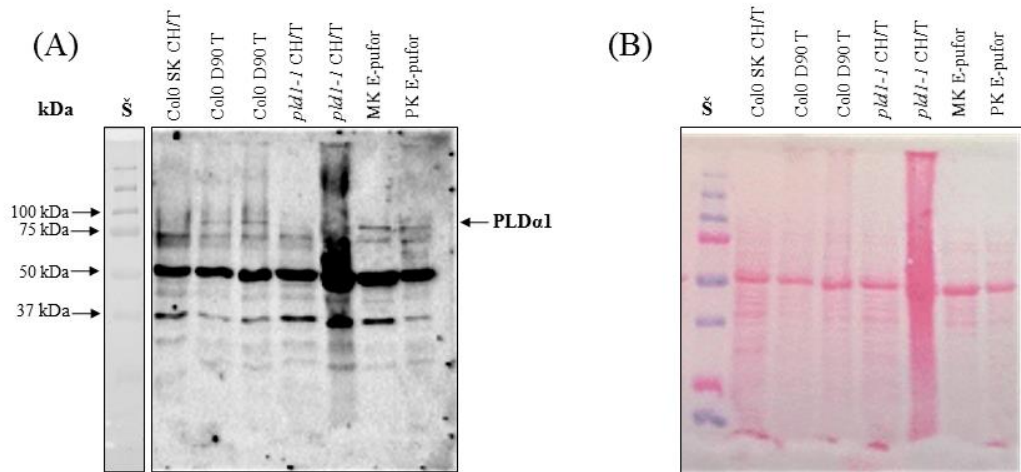
Imunoblotová analýza z rastlín *A. thaliana* ekotyp Col-0 a mutantých rastlín *plda1-2* vykázali proteínovú škvrnu v oblasti približne 91 kDa a pI 5,75. V imunoblote z mutantnej rastliny *plda1-2* avšak nie je vidieť špecifickú proteínovú škvrnu v rovnakej oblasti (Obr. 8B) Tento výsledok môže naznačovať, že táto škvrna zodpovedá PLD $\alpha$ 1 (Obr. 8A). Na oboch imunoblotoch sa taktiež nachádza nešpecifická škvrna s pI 7 a s rovnakou pI ako má PLD $\alpha$ 1. Výsledok s výraznou škvŕnou s Mr a pI podobným databázovým hodnotám PLD $\alpha$ 1 sa nám nepodarilo potvrdiť. Z tohoto dôvodu sme sa rozhodli optimalizovať zloženie rehydratačného pufu.



Obr.8: (A) Imunoblot z 2D gélu pripravený z proteínového extraktu rastlín *Arabidopsis thaliana* ekotyp Col-0, (B) imunoblot z 2D gélu pripravený z proteínového extraktu *plda1-2* mutantných rastlín *A. thaliana* použitím anti- PLD $\alpha$ 1 protilátky. Šípka hore naznačuje možný PLD $\alpha$ 1 proteín. Š – proteínový štandard, kDa – molekulová hmotnosť.

### 4.3 Optimalizácia zloženia rehydratačného pufru pre detekciu PLD $\alpha$ 1

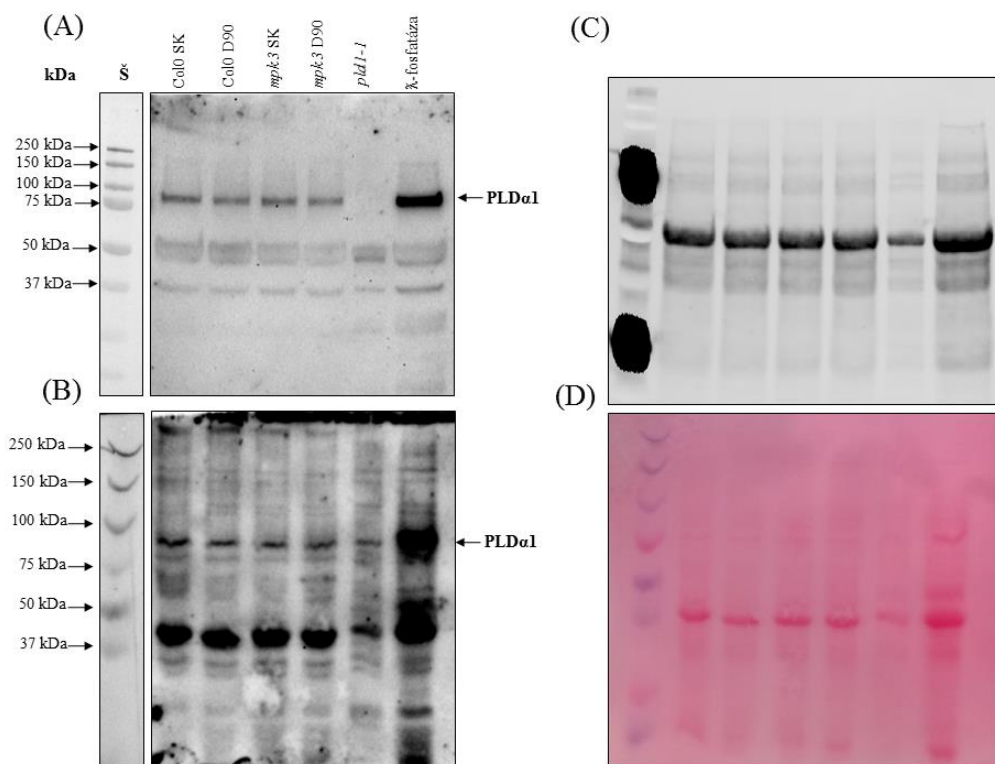
Cieľom tejto časti bolo testovať vplyv rôzneho zloženia rehydratačného pufru na senzitivitu imunologickej detekcie PLD $\alpha$ 1 pomocou imunoblotovania na jednorozmerných géloch. Imunoblotovaním boli analyzované denaturované (pomocou SDS; Obr. 7A) bielkovinové extrakty. Výsledky okrem nešpecifických pásov aj PLD $\alpha$ 1 špecifický proteínový pás (Mr 91 kDa). Jeho špecificita je potvrdená tým, že nie je prítomný v dráhe, kde boli nanesené vzorky z *plda1-1* mutantných rastlín. Tento pás bol detekovaný len vo vzorkách rozpustených v rehydratačnom pufri s Tritonom X-100 konkrétne vo vzorkách Col-0 ovplyvnených stresom zo sucha 90 minút a vo vzorkách extrahovaných E-extrakčným pufram konkrétne v mokrej kontrole a pozitívnej kontrole. Z výsledkov tejto optimalizácie vyplýva, že PLD $\alpha$ 1 je detekovateľná len v prípade použitia Tritonu X-100 a prídavok CHAPS má negatívny vplyv na jeho detekovateľnosť. Preto sme pokračovali s detekciou PLD $\alpha$ 1 pomocou dvojrozmernej elektroforézy. Avšak aj po pozmenení rehydratačného pufru sme nedetkovali špecifický PLD $\alpha$ 1 signál.



Obr.9: (A) Imunoblot z SDS denaturovaných vzoriek pripravené z rastlín *A. thaliana* ekotyp Col-0 a *plda1-1*, (B) vizualizácia bielkovín na PVDF membráne po prenose pomocou Ponceau S. Šípka ukazuje na špecifický proteínový pás znázorňujúci PLD $\alpha$ 1 signál vo vzorkách rozpustených v rehydratačnom pufrí s 4 % Triton X-100 (Col D90, mokrá a pozitívna kontrola). Š – proteínový štandard, kDa – molekulová hmotnosť.

#### 4.4 Detekcia fosforylácie PLD $\alpha$ 1 pomocou Phostag technológie

Keďže detekcia PLD $\alpha$ 1 nebola pomocou dvojrozmernej elektroforézy a imunoblotovania úspešná, rozhodli sme sa analyzovať fosforyláciu PLD $\alpha$ 1 v rastlinách divého typu Col-0 a *mpk3-1* mutantoch v odpovedi na stres zo sucha pomocou Phostag technológie. Zistili sme, že imunoblotovanie vzoriek separovaných pomocou SDS PAGE ukázalo výrazný pás prislúchajúci PLD $\alpha$ 1 (Obr. 10A). Rozdiel v profile pásov medzi



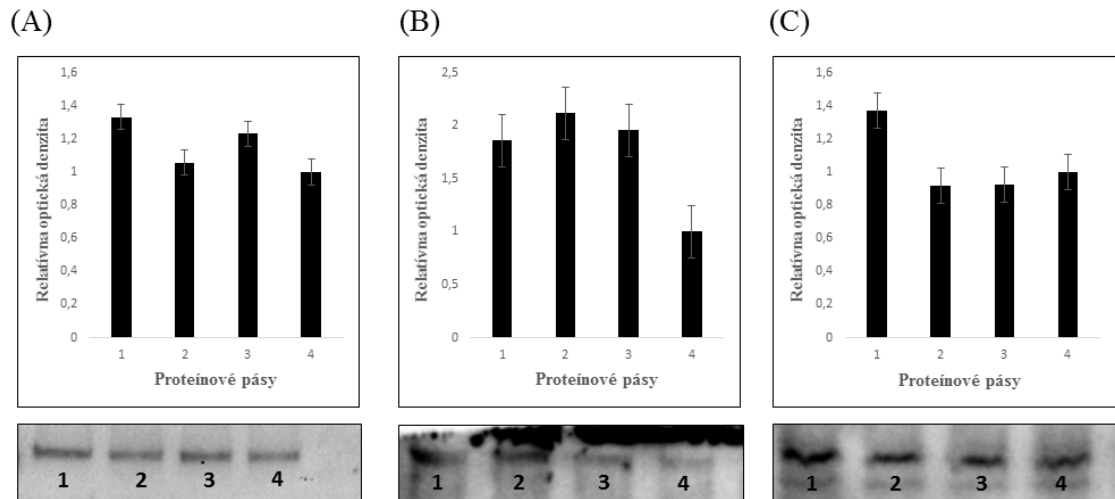
Obr. 10: Imunoblot z proteínových vzoriek rastlín *A. thaliana* ekotyp Col-0 a mutantných rastlín *plda1-1*, *mpk3-1* z SDS-PAGE gélu (A), imunoblot z bielkovinových vzoriek rastlín *A. thaliana* ekotyp Col-0 a mutantných rastlín *plda1-1*, *mpk3-1* z Phostag gélu (B), vizualizácia bielkovín na Stain free géloch po elektroforéze (C), vizualizácia bielkovín na PVDF membráne po prenose pomocou Ponceau S (D). Šípka ukazuje na špecifický proteínový pás zodpovedajúci Mr PLD $\alpha$ 1. Š – proteínový štandard, kDa – molárna hmotnosť.

Obr. 9 a 10 je spôsobený rozdielnou metódou extrakcie. Z kvantifikácie intenzity pásov vyplýva, že abundancia PLD $\alpha$ 1 sa po 90 minútach stresu zo sucha mierne znížila v obidvoch líniiach, pričom sme zistili mierne nižšiu abundanciu PLD $\alpha$ 1 u *mpk3-1* mutanta v porovnaní s Col-0.

Ako negatívna kontrola poslúžili proteínové vzorky z mutantných *plda1-1* rastlín *A. thaliana* (Obr. 10A). Ako negatívna kontrola pre túto analýzu boli opäť použité mutantné rastliny *plda1-1*, a tiež vzorky ovplyvnené lambda fosfatázou, ktorá spôsobuje defosforyláciu. Na imunoblotoch pripravených z gélov s Phostag ligandom vidieť okrem nešpecifických pásov aj dva výraznejšie pásy. Prvý, s Mr. približne 91 kDa prislúcha PLD $\alpha$ 1. Druhý pás, s Mr. približne okolo 300 kDa je s najväčšou pravdepodobnosťou fosforylovaná forma PLD $\alpha$ 1, pretože sa nenachádza v mutante *plda1-1* a ani vo vzorkách ovplyvnených  $\lambda$ -fosfatázou (Obr. 10B). Intenzita pásu prislúchajúceho fosforylovanej forme PLD $\alpha$ 1 je mierne vyššia po strese zo sucha u Col-0 rastlín, pričom výrazne klesla



u *mpk3-1* mutantných rastlín (Obr. 11B). Prídavok Phostag ligandu do elektroforetického gélu spôsobí oddelenie fosforylovanej formy bielkoviny od nefosforylovanej, čo znamená, že súhrnná intenzita pásov sa môže zhodovať s intenzitou získanou pomocou imunoblotovania gélov pripravených SDS PAGE. Tieto poznatky naznačujú, že PLD $\alpha$ 1 je v rastlinách Col-0 silnejšie fosforylovaná v podmienkach stresu zo sucha než

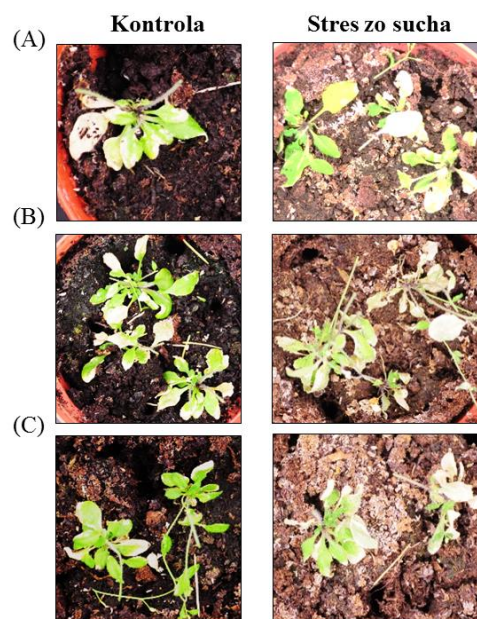


Obr.11: (A) Graf relatívnej optickej denzity proteínových pásov PLD $\alpha$ 1 po separácii SDS-PAGE s použitím PLD $\alpha$ 1 protilátky, (B) graf intenzity proteínových pásov fosforylovaných foriem PLD $\alpha$ 1 pomocou Phostag technológie použitím anti-PLD $\alpha$ 1 protilátky, (C) graf intenzity nefosforylovaných proteínových pásov anti-PLD $\alpha$ 1 pomocou Phostag technológie použitím anti-PLD $\alpha$ 1 protilátky. Intenzita PLD $\alpha$ 1 po ovplyvnení stresu zo sucha je silnejšia ako pri detekcii SDS-PAGE. Dráha 1 zodpovedá Col-0 suchej kontrole, dráha 2 zodpovedá Col-0 ovplyvnenej stresom zo sucha 90 minút, dráha 3 zodpovedá *mpk3-1* mutantným rastlinám suchej kontrole, dráha 4 zodpovedá *mpk3-1* mutantným rastlinám ovplyvneným stresom zo sucha 90 minút.

v kontrole. Zistené poznatky môžu potvrdzovať úlohu fosforylácie PLD $\alpha$ 1 pri obrane rastliny na stres zo sucha. Analýza intenzity proteínových pásov bola prevedená v programe ImageLab.

#### 4.5 Fyziologický stav rastlín v *ex vitro* podmienkach ovplyvnené suchom

21 dňové rastliny *A. thaliana* boli podrobené stresu zo sucha 10 dní v *ex vitro* podmienkach. Bolo pozorované ovplyvnenie stresu zo sucha v ekotype Col-0 (Obr. 12A), *plda1-1* (Obr. 12B) a *plda1-2* (Obr. 12C). Mutantné rastliny *plda1-1* a *plda1-2* boli citlivejšie na stres zo sucha než kontrolné rastliny ekotyp Col-0 čo sa prejavilo,



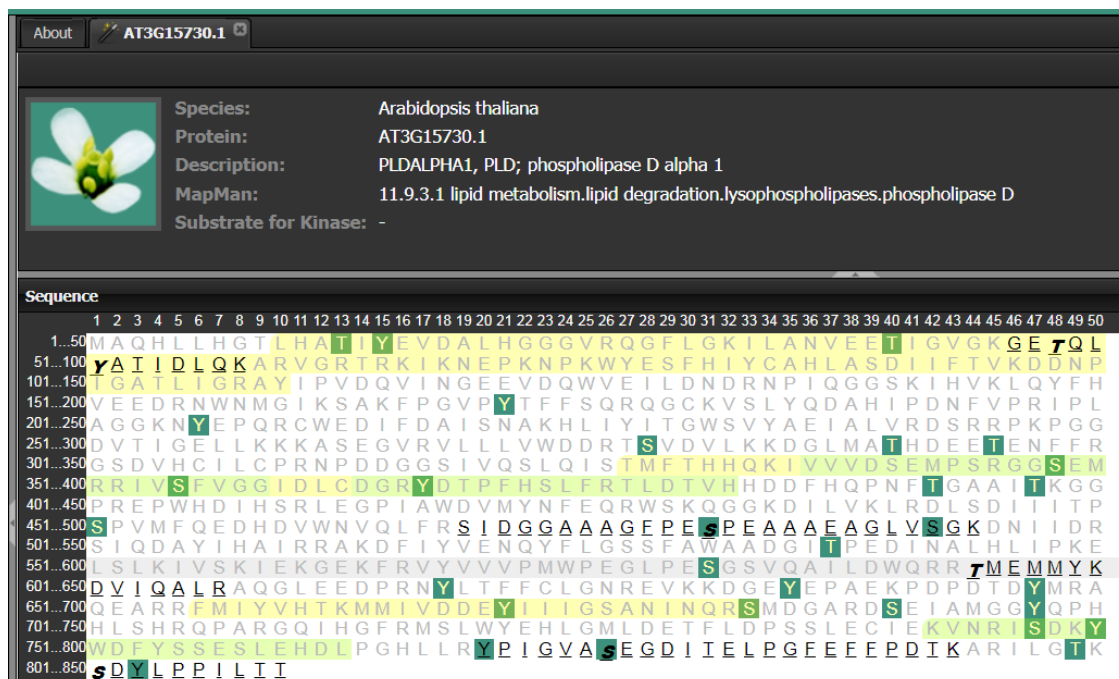
Obr.12: (A) Rastliny *A. thaliana* ekotyp Col-0 v kontrolných a stresových podmienkach, (B) mutantné rastliny *A. thaliana plda1-1* v kontrolných a stresových podmienkach, (C) mutantné rastliny *A. thaliana plda1-2* v kontrolných a stresových podmienkach.

odumretím vegetatívnych tkanív skôr ako v kontrole. Sfarbenie spôsobené stresom zo sucha je taktiež intenzívnejšie v mutantoch *plda1-1* a *plda1-2* (Obr. 12).

#### 4.6 Predikcia fosforylačných miest v aminokyselinovej sekvencii PLD $\alpha$ 1

Podľa databázy PhosPhat boli predikované pravdepodobné fosforylačné miesta v aminokyselinovej sekvencii PLD $\alpha$ 1 (Obr. 13). Fosforylované aminokyseliny v PLD $\alpha$ 1 sú serín, treonín a tyrozín. Fosforylácia niektorých peptidov bola aj experimentálne dokázaná proteomickými metódami. Detailné informácie o podmienkach fosforylácie sú uvedené v Tabuľke 8. Je zaujímavé, že fosfopeptid SIDGGAAAGFPE(pS)PEAAAEAGLVSGK bol identifikovaný v *A. thaliana* počas stresu zo sucha (Umezawa *et al.*, 2013). Tiež sme chceli zistiť, ktoré sú najpravdepodobnejšie kinázy pre fosforyláciu PLD $\alpha$ 1. Na túto predikciu sme využili program GPS 3.0 (Xue *et al.*, 2005). Výsledky naznačujú, že na základe hodnoty skóre sú najpravdepodobnejšími kinázami pre fosforyláciu PLD $\alpha$ 1 MAPK (Tab. 9). Konkrétne bol pre túto fosforyláciu predikovaný peptid AAAGFPESPEAAAEA, ktorý je zhodný s tým, ktorý bol experimentálne identifikovaný v podmienkach stresu zo sucha (Tab. 8).

Tieto výsledky potvrdzujú naše zistenia o fosforylácii PLD $\alpha$ 1 v podmienkach stresu zo sucha.



(Obr.13): Predikcia fosforylovaných miest v aminokyselinovej sekvencii PLD $\alpha$ 1

Tab.8 Identifikované fosforylované peptidy v aminokyselinovej sekvencii PLD $\alpha$ 1

Fosfopeptid PLD $\alpha$ 1	Rastlinný materiál	Typ vzorky	Podmienky	Referencia
GE(t)QL(y)ATIDLQK	<i>Oryza sativa</i>	Celkový proteóm	Kontrolné	Nakagami <i>et al.</i> , 2010
GE(t)QL(y)ATIDLQK	<i>A. thaliana</i> Col-0	Celkový proteóm	Kontrolné	Sugiyama <i>et al.</i> , 2008
(pS)DYLPPIIT	<i>A. thaliana</i> mutant <i>sirkl</i> , Col-0	Celkový proteóm	Rast bez sacharózy	Wu <i>et al.</i> , 2013
SIDGGAAAGFPE(pS)PEAAAEAGLVSGK	<i>A. thaliana</i> Col-0	Koreň	Ovplyvnenie 10 $\mu$ M NAA	Zhang <i>et al.</i> , 2013
SIDGGAAAGFPE(pS)PEAAAEAGLVSGK	<i>A. thaliana</i> Col-0	Koreň	Kontrolné	Zhang <i>et al.</i> , 2013

SIDGGAAAGFPE(pS) PEAAAEAGLVSGK	<i>A. thaliana</i> mutant <i>srk2dei</i> , Col-0	Celkový proteóm	Ovplyvnenie ABA a stresom zo sucha	Umezawa <i>et al.</i> , 2013
(pT)MEMMYKDVIQ ALR	Nešp. bunková kultúra	Cytozol	Rast bez dusíku	Phosphat databáza
YPIGVA(pS)EGDITE LPGFEFFPDTK	<i>A. thaliana</i> Col-0	Celkový proteón	Stres z chlada	Wang <i>et al.</i> , 2013

Tab.9 Predikcia najpravdepodobnejších kináz pre fosforyláciu PLD $\alpha$ 1

Pozícia	Kód	Kináza	Peptid	Skóre
481	S	CMGC/MAPK	AAAGFPE <b>S</b> PEAAAEA	49.609
340	S	Iné/PEK	QKIVVV <b>D</b> SEMPSRGG	15.909
810	T	Iné /PEK	YLPPIL <b>T</b> *****	14.455
809	T	Iné /PEK	DYLPPI <b>L</b> T*****	14.045
48	T	Iné /PEK	IGVGK <b>G</b> ETQLYATID	13.773
776	S	CMGC/CK2	RYPIGVA <b>S</b> EGDITEL	12.807
747	S	TK	IEKVNRI <b>S</b> DKYWDFY	12
64	T	Iné /Haspin	QKARVGR <b>T</b> RKIKNEP	12
756	S	TK	KYWDFY <b>S</b> ESLEHDL	11.833
647	Y	STE/STE7	KPDPD <b>T</b> YMRQEAR	11.25
518	Y	CMGC/DYRK	RRAKDFI <b>Y</b> VENQYFL	10.9
758	S	Iné /NEK	WDFYS <b>S</b> ESLEHDLPG	10.821
647	Y	STE	KPDPD <b>T</b> YMRQEAR	10.75
277	T	Iné /Haspin	LLVWDD <b>R</b> TSVDVLKK	10
662	T	Iné /Haspin	RFMIYV <b>H</b> TKMMIVDD	10
594	T	TKL	ILDWQRR <b>T</b> MEMMYKD	9.451
278	S	Iné /Aur	LVWDD <b>R</b> TSVDVLKKD	9.197
594	T	Iné /Haspin	ILDWQRR <b>T</b> MEMMYKD	9
703	S	Iné /WEE	GYQPH <b>L</b> SHRQPARG	9
594	T	Iné /Aur	ILDWQRR <b>T</b> MEMMYKD	8.915

## 5 DISKUSIA

Cieľom tejto práce bolo využiť kombináciu dvojrozmernej elektroforézy a imunoblotovania pre detekciu fosforylácie MPK3 a PLD $\alpha$ 1. Naše výsledky ukázali, že detekcia fosforylácie proteínu MPK3 bola úspešná pomocou dvojrozmernej elektroforézy a imunoblotovania. MPK3 je MAPK kináza, ktorá sa podieľa v odpovedi rastliny na biotický a abiotický stres (Jalmi a Sinha, 2015). Detekciou MPK3 pomocou dvojrozmernej elektroforézy sme identifikovali tri špecifické proteínové škvrny v kontrolných podmienkach, ktoré sa nachádzajú v kyslej oblasti gélu. Prítomnosť bielkoviny na 2D géli v podobe viacerých škvŕn rovnakej molekulovej hmotnosti s rôznym pI môže mať viacero príčin. Môže ísť o rôzne izoformy jednej bielkoviny rôznym pI, alebo alternatívny zostrih RNA kódujúcej daný proteín (Maugeri *et al.*, 2016). Posun v pI môže nastať takisto v dôsledku tzv. processingu, čiže proteolytického odštiepenia signálneho peptidu (Zhu *et al.*, 2005). Posun v pI súvisí aj s rôznymi post-translačnými modifikáciami. Napríklad glykozylácia spôsobuje zníženie alebo zvýšenie pI v závislosti od toho, či ide o kyslú alebo zásaditú glykozyláciu (Wyss *et al.*, 1999). Avšak glykozylácia a ani izoformy, či alternatívny zostrih pre MPK3 nie sú známe. Na základe tohto poznatku môžeme predpokladať, že nájdené proteínové škvrny sú dôkazom fosforylácie. V rámci MAPK fosforylačných kaskád je MPK3 duálne fosforylovaná (na tyrozíne a treoníne) pomocou MAPKK. Bolo publikované, že plná aktivácia MPK3 v odpovedi na tvorbu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> je podmienená tiež duálnou fosforyláciou pomocou OXI1 a NDPK2. Je známe, že MAPK majú určitú bazálnu hladinu fosforylácie aj v podmienkach nespôsobujúcich stres (Takáč *et al.*, 2016). Vychádzajúc z poznatku, že každá väzba fosfátovej skupiny na proteín posúva jeho pI do kyslej oblasti môžeme predpokladať, že prvá škvrna s menším pI (ako škvrna s najvyššou optickou denzitou) zodpovedá jednoduchej fosforylácií MPK3, pričom škvrna s najmenším pI zodpovedá dvojitej fosforylácií.

V prípade PLD $\alpha$ 1 sa ukázala kombinácia 2D elektroforézy a imunoblotovania ako málo efektívna pre jej detekciu a tiež pre analýzu jej fosforylácie. V rámci optimalizácie extrakcie proteínov sme sa rozhodli vybrať čo najlepšie zloženie detergentov pre rozpustenie bielkovinového peletu. Zistili sme, že použitie samotného neiónového detergentu Triton X-100 má pozitívny vplyv na detekovateľnosť PLD $\alpha$ 1 na jednorozmernom SDS PAGE géli, pričom prídavok zwiteriónového detergentu CHAPS jeho detekciu znemožňoval. Efektivita rozpustenia bielkovín závisí aj na použitých chaotropných činidlách. Bolo zistené, že CHAPS je lepší detergent pre membránové

proteíny ako Triton X-100, ak je použité ako chaotropné činidlo močovina. Tento poznatok neplatí, ak je použitá chaotropická zmes močovina s tiomočovinou. V tomto prípade sa lepším detergentom pre rozpustenie bielkovín stáva Triton X-100 (Luche *et al.*, 2003). Kanoh *et al.* (1991) uvádzajú, že aktivita PLD v mozgu potkana bola výrazne vyššia pri použití detergentu Triton X-100 v porovnaní s iónogennými detergentami (deoxycholát sodný, cholát sodný) a zwiteriónovými detergentami (CHAPS, Lubrol-PX). V súlade so spomínanými publikáciami, naše výsledky ukazujú, že Triton X-100 má pozitívny vplyv na rozpustnosť PLD $\alpha$ 1 v bielkovinovom extrakte. Napriek optimalizáciám sa PLD $\alpha$ 1 nepodarilo detekovať na 2D géloch. Dvojrozmerná elektroforéza má mnoho obmedzení pri detekcii proteínov od reprodukovateľnosti (Lilley *et al.*, 2002) slabej citlivosti pre málo abundantné proteíny (Gygi *et al.*, 2000) až po problémy pri separácii vysoko kyslých/zásaditých proteínov (Ong a Pandey, 2001). Detekcia proteínov pomocou 2D nebude úspešná pokiaľ je ich koncentrácia v rastlinnom tkanive veľmi malá a ich fyzikálno-chemické vlastnosti nie sú vhodné pre separáciu pomocou 2D (pI mimo rozsah gélového prúžku, molárna hmotnosť pod 10 kDa, hydrofóbnosť proteínu (Baggerman *et al.*, 2005). Detekcia PLD $\alpha$ 1 môže byť preto ovplyvnená kombináciou týchto faktorov, vrátane spomínaných obmedzení dvojrozmernej elektroforézy, účinnosť detergentov alebo zvláštnych vlastností PLD $\alpha$ 1, ktoré získala posttranslačnými modifikáciami. Ukázalo sa, že Phostag technológia je vhodná pre detekciu fosforylácie PLD $\alpha$ 1. Abundancia fosforylovanej formy PLD $\alpha$ 1 je výraznejšia vo vzorkách ovplyvnených stresom zo sucha než v kontrolných vzorkách. Je známe, PLD $\alpha$ 1 a PA zprostredkujú ABA-závislú reguláciu otvárania a zatvárania prieduchov (Sang *et al.*, 2001; Mishra *et al.*, 2006). Naše výsledky naznačujú že PLD $\alpha$ 1 môže byť v podmienkach sucha regulovaná aj fosforyláciou. To by znamenalo, že fosforylácia PLD $\alpha$ 1 pozitívne pôsobí na pohyby prieduchov pri strese zo sucha. Podobné poznatky boli zistené pomocou fosfoproteomickej analýzy rastlín *A. thaliana* vystavených suchu (Umezawa *et al.*, 2007). Zistili sme tiež, že vo fosforylácii PLD $\alpha$ 1 hrá významnú pozitívnu funkciu MPK3. Z našich výsledkov nie je možné vyvodit' záver, že MPK3 priamo fosforyluje PLD $\alpha$ 1, pretože fosforylácia substrátu si vyžaduje ich interakciu (Pitzschke *et al.*, 2015). Interakciu MPK3 s PLD $\alpha$ 1 je preto nutné ďalej analyzovať.

Fyziologický stav rastlín kultivovaných *ex vitro* naznačuje, že mutanty *plda1-1* a *plda1-2* sú citlivejšie na stres zo sucha ako rastliny divého typu. Stres zo sucha spôsobuje zvýšenie hladiny ABA v bunkách, ktorá podporuje uzatváranie prieduchov pre

zabránenie úniku vody z buniek. Mutanti *plda1* vykazujú vyššiu stratu vody ako divé typy (Sang *et al.*, 2001). Naše výsledky potvrdzujú zvýšenú citlivosť mutantných rastlín *plda1-1* a *plda1-2* na sucho, čo sa prejavuje skorším vysychaním mutantných rastlín ako divé typy a skorším odumieraním listového tkaniva.

## 6 ZÁVER

V predloženej bakalárskej práci sme sa zaoberali problematikou detekcie fosforylácie MPK3 a PLD $\alpha$ 1 pomocou dvojrozsmernej polyakrylamidovej elektroforézy a imunoblotovania. Ďalej sme sa zaoberali, aká bude fosforylácia PLD $\alpha$ 1 v *mpk3-1* mutante, akú majú odolnosť na stres zo sucha rastliny *A. thaliana* ekotyp Col-0 a mutantné rastliny *A. thaliana plda1-1* a *plda1-2*, pozorovaním fyziologického stavu týchto rastlín.

Zistili sme, že kombinácia dvojrozsmernej polyakrylamidovej elektroforézy a imunoblotovania je vhodná metóda na detekciu fosforylácie MPK3. Detekcia PLD $\alpha$ 1 pomocou tejto metódy nebola v našom prípade efektívna. Pre detekciu fosforylácie PLD $\alpha$ 1 je viac vhodná Phostag technológia. PLD $\alpha$ 1 je fosforylovaná v *A. thaliana* v podmienkach sucha a táto fosforylácia je závislá na expresii MPK3. Pozorovanie fyziologického stavu rastlín kultivovaných *ex vitro* po ovplyvnení stresu zo sucha ukázalo, že mutantné rastliny *A. thaliana plda1-1* a *plda1-2* sú citlivejšie na stres zo sucha ako divé typy, čo sa prejavilo intenzívnejším odumieraním listov.

Je možné záverom konštatovať, že k detekcii fosforylácie treba pristupovať ku každej bielkovine individuálne. Tiež sme dokázali zapojenie MAPK signalizácie v regulácii fosforylácie PLD $\alpha$ 1, čo rozširuje biotechnologické možnosti využitia PLD $\alpha$ 1 pre zlepšovanie odolnosti rastlín voči suchu.



## 7 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- Ahlfors R., Macioszek V., Rudd J., Brosche M., Schlichting R., Scheel D., Kangasjarvi J. (2004): Stress hormone-independent activation and nuclear translocation of mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis thaliana* during ozone exposure. *Plant Journal* **40**, 512–522.
- Alpert A.J. (1990): Hydrophilic interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other compounds. *Journal of Chromatography* **19**, 177-196.
- Andersson L., Porath J. (1986): Isolation of phosphoproteins by immobilized metal ( $\text{Fe}^{3+}$ ) affinity chromatography. *Analytical Biochemistry* **154**, 250–254.
- Apel K., Hirt H. (2004): Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* **55**, 373–399.
- Ardito F., Giuliani M., Perrone D., Troiano G., Muzio L.L. (2017): The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy. *International Journal of Molecular Medicine* **40**, 271-280.
- Asai T., Tena G., Plotnikova J., Willmann MR., Chiu WL., Gomez-Gomez L., Boller T., Ausubel F.M., Sheen J. (2002): MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* **415**, 977–983.
- Baggerman G., Vierstraete E., De Loof A., Schoofs L. (2005): Gel-based versus gel-free proteomics: a review. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* **8**, 669-677.
- Barbieri C.M., Stock A.M. (2008): Universally applicable methods for monitoring response regulator aspartate phosphorylation both in vitro and in vivo using Phos-tag-based reagents. *Annals of Biochemistry* **376**, 73–82.
- Bargmann B.O., Laxalt A.M., ter Riet B., van Schooten B., Merquiol E., Testerink C., Haring M.A., Bartels D., Munnik T. (2009): Multiple PLDs required for high salinity and water deficit tolerance in plants. *Plant Cell Physiology* **50**, 78-89
- Beausoleil S.A., Jedrychowski M., Schwartz D., Elias J.E., Villén J., Li J., Cohn M.A., Cantley L.C., Gygi S.P. (2004): Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* **17**, 12130-12135.
- Becker S., Groner B., Müller C.W. (1998): Three-dimensional structure of the STAT3 $\beta$  homodimer bound to DNA. *Nature* **394**, 145–151.
- Bekešová S., Komis G., Křenek P., Vyplelová P., Ovečka M., Luptovčíak I., Illés P., Kuchařová A., Šamaj J. (2015): Monitoring protein phosphorylation by acrylamide pendant Phos-Tag<sup>TM</sup> in various plants. *Frontiers in Plant Science* **6**, 336
- Bettmer J., Montes B.M., Encinar J.R., Fernandez Sanchez M.L., Fernandez de la Campa Mdel R., Sanz Medel A. (2009): The emerging role of ICP-MS in proteomic analysis. *Journal of Proteomics* **72**, 989-1005.

- Bianchi M.W., Guivarc'h D., Thomas M., Woodgett J.R., Kreis M. (1994): *Arabidopsis* homologs of the shaggy and GSK-3 protein kinases: molecular cloning and functional expression in *Escherichia coli*. *Molecular Genetics and Genomics* **242**, 337-345.
- Braun A.P., Schulman H. (1995): The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function. *Annual Review of Physiology* **57**, 417-445.
- Canagarajah B.J., Khokhlatchev A., Cobb M.H., Goldsmith, E.J. (1997): Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell* **90**, 859–869.
- Cargnello M., Roux P.P. (2011): Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **75**, 50-83.
- Cole P.A., Shen K., Qiao Y., Wang D. (2003): Protein tyrosine kinases Src and Csk: a tail's tale". *Current Opinion in Chemical Biology* **7**, 580-585.
- Czernik A.J., Girault J.A., Nairn A.C., Chen J., Snyder G., Kebedian J., Greengard P. (1991): Production of phosphorylation state-specific antibodies. *Methods in Enzymology* **201**, 264-283.
- Danquah A., de Zelicourt A., Colcombet J., Hirt H. (2014): The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses. *Biotechnological Advances* **32**, 40-52.
- Djamei A., Pitzschke A., Nakagami H., Rajh I., Hirt, H. (2007): Trojan horse strategy in *Agrobacterium* transformation: abusing MAPK defense signaling. *Science* **318**, 453–456.
- Droillard M.J., Boudsocq M., Barbier-Brygoo H., Lauriere C. (2004): Involvement of MPK4 in osmotic stress response pathways in cell suspensions and plantlets of *A. thaliana thaliana*: activation by hypoosmolarity and negative role in hyperosmolarity tolerance. *FEBS Letters* **574**, 42–48.
- Droillard M.J., Thibivilliers S., Cazale A.C., Barbier-Brygoo H., Lauriere C. (2000): Protein kinases induced by osmotic stresses and elicitor molecules in tobacco cell suspensions: two crossroad MAP kinases and one osmoregulation-specific protein kinase. *FEBS Letters* **474**, 217–222.
- Engholm-Keller K., Larsen M.R. (2013): Technologies and challenges in large-scale phosphoproteomics. *Proteomics* **13**, 910-931.
- Fenn J.B., Mann M., Meng C.K., Wong S.F., Whitehouse C.M. (1989): Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **246**, 64-71.
- Gao M., Liu J., Bi D., Zhang Z., Cheng F., Chen S., Zhang Y. (2008): MEKK1, MKK1/MKK2 and MPK4 function together in a mitogen-activated protein kinase cascade to regulate innate immunity in plants. *Cell Research* **18**, 1190-1198.
- Gianazza E. (1995): Isoelectric focusing as a tool for the investigation of post-translational processing and chemical modifications of proteins. *Journal of Chromatography A* **23**, 67-87.
- Gigon A., Matos A.R., Laffray D., Zuily-Fodil Y., Pham-Ti A.T. (2004): Effect of drought stress on lipid metabolism in the leaves of *Arabidopsis thaliana* (ecotype Columbia). *Annals of Botany* **94**, 345–351.

- Gong B., Ma L., Liu Y., Gong Q., Shelite T., Bouyer D., Boor P.J., Lee Y.S., Oberhauser A. (2012): *Rickettsiae* induce microvascular hyperpermeability via phosphorylation of VE-cadherins: evidence from atomic force microscopy and biochemical studies. *PLoS neglected tropical diseases* **6**, 1699.
- Gudesblat G.E., Iusem N.D., Morris P.C. (2007): Guard cell-specific inhibition of *Arabidopsis* MPK3 expression causes abnormal stomatal responses to abscisic acid and hydrogen peroxide. *New Phytology* **173**, 713–721.
- Gupta R., Luan, S. (2003): Redox control of protein tyrosine phosphatases and mitogen-activated protein kinases in plants. *Plant Physiology* **132**, 1149-1152.
- Gygi S.P., Corthals G.L., Zhang Y., Rochon Y., Aebersold R. (2000): Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis based proteome analysis technology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 9390-9395.
- Hong Y., Pan X., Welti R., Wang X. (2008): Phospholipase D $\alpha$ 3 is involved in the hyperosmotic response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **3**, 803-816.
- Huang S.Q., Chen J.X., Li P.J., Hao Y.X., Chen G., Zumuremu, Shao L. (2014): The phosphorylation of an actin depolymerizing factor by a calcium-dependent protein kinase regulates cotton fiber elongation. *Acta Physiologiae Plantarum* **36**, 2627-2636.
- Huang Y., Li H., Hutchison C.E., Laskey J., Kieber J.J. (2003): Biochemical and functional analysis of CTR1, a protein kinase that negatively regulates ethylene signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **33**, 221–233.
- Hubbard R.S., Till H.J. (2000): Protein tyrosine kinase structure and function. *Annual Review of Biochemistry* **69**, 373-398.
- Hunter T. (1995): Protein kinases and phosphatases: The Yin and Yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* **80**, 225-236.
- Hurkman W.J., Tanaka C.K. (1986): Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiology* **81**, 802-806.
- Hurley J.H., Dean A.M., Thorsness P.E., Koshland Jr. D.E., Stroud, R.M. (1990): Regulation of isocitrate dehydrogenase by phosphorylation involves no long-range conformational change in the free enzyme. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 3599–3602.
- Huse M., Kuriyan, J. (2002): The conformational plasticity of protein kinases. *Cell* **109**, 275–282.
- Changeux J.P. (2012): Allostery and the Monod-Wyman-Changeux model after 50 years. *Annual Review of Biophysics* **41**, 103-133.
- Chao Q., Rothenberg M., Solano R., Roman G., Terzaghi W., Ecker, J. R. (1997): Activation of the ethylene gas response pathway in *Arabidopsis* by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins. *Cell* **89**, 1133–1144.
- Chen X., Vinkemeier U., Zhao Y., Jeruzalmi D., Darnell Jr. J.E., Kuriyan, J. (1998): Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA. *Cell* **93**, 827–839.

- Choi H., Choi N., Lim B., Kim T.W., Song S., Kim Y.P. (2015): Sequential phosphorylation analysis using dye-tethered peptides and microfluidic isoelectric focusing electrophoresis. *Biosensors and Bioelectronics* **73**, 93-99.
- Ichimura K., Shinozaki K., Tena G., Sheen J., Henry Y., Champion A., Kreis M., Zhang S., Hirt H., Wilson C., Heberle-Bors E., Ellis E.B., Morris C.P., Innes W.R., Ecker R.J., Scheel D., Klessig F.D., Machida Y., Mundy J., Ohashi Y., Walker C.J (2002): Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends in Plant Science* **7**, 301-308.
- Illiuk A.B., Martin V.A., Alicie B.M., Geahlen R.L., Tao W.A. (2010): In-depth analyses of kinase-dependent tyrosine phosphoproteomes based on metal ion-functionalized soluble nanopolymers. *Molecular and Cellular Proteomics* **9**, 2162-2172.
- Ishii E., Eguchi Y., Utsumi R. (2013): Mechanism of activation of PhoQ/PhoP two-component signal transduction by SafA, an auxiliary protein of PhoQ histidine kinase in *Escherichia coli*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **77**, 814-819.
- Jiang Y., Wu K., Lin F., Qu Y., Liu X., Zhang Q. (2014): Phosphatidic acid integrates calcium signaling and microtubule dynamics into regulating ABA-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. *Planta* **239**, 565–575.
- Jin H., Liu Y., Yang K.Y., Kim C.Y., Baker B., Zhang S. (2003): Function of a mitogen-activated protein kinase pathway in N gene-mediated resistance in tobacco. *The Plant Journal* **33**, 719-731.
- Johnson L.N (2009): The regulation of protein phosphorylation. *Biochemical Society Transactions* **37**, 627-641.
- Johnson L.N., Bradford D. (1993): The Effects of Phosphorylation on the Structure and Function of Proteins. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **22**, 199-232.
- Johnson S.A., Hunter T. (2005): Kinomics: methods for deciphering the kinome. *Nature Methods* **1**, 17-25.
- Kang Y.J., Kang L.M., Zhong Z.S. (2010): Hydrogen-Bonding Interactions Induced by Phosphorylation Influence the Local Conformation of Phosphopeptides. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* **16**, 87-93.
- Kanoh H., Kanaho Y., Nozawa Y. (2001): Activation and solubilization by Triton X-100 of membrane bound phospholipase D of rat brain. *Lipids* **26**, 426-430.
- Karas M., Hillenkamp F. (1988): Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical Chemistry* **60**, 2299-2301.
- Kerk D., Bulgrien J., Smith D.W., Barsam B., Veretnik S., Gribskov M. (2002): The complement of protein phosphatase catalytic subunits encoded in the genome of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **129**, 908-925.

- Kinoshita E., Kinoshita-Kikuta E., Koike T. (2009): Separation and detection of large phosphoproteins using Phos-tag SDS-PAGE. *Nature Protocols* **4**, 1513-1521.
- Kinoshita E., Kinoshita-Kikuta E., Koike T. (2015): Advances in Phos-tag-based methodologies for separation and detection of the phosphoproteome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **1854**, 601-608.
- Kinoshita E., Kinoshita-Kikuta E., Shiba A., Edahiro K., Inoue Y., Yamamoto K., Yoshida M., Koike T. (2014): Profiling of protein thiophosphorylation by Phos-tag affinity electrophoresis: evaluation of adenosine 5'-O-(3-thiotriphosphate) as a phosphoryl donor in protein kinase reactions. *Proteomics* **14**, 668-679.
- Kinoshita E., Takahashi M., Takeda H., Shiro M., Koike T. (2004): Recognition of phosphate monoester dianion by an alkoxide-bridged dinuclear zinc(II) complex. *Dalton Transactions* **21**, 1189-1193.
- Klimczak L.J., Collinge M.A., Farini D., Guiliano G., Walker J.C., Cashmore A.R. (1995): Reconstitution of *Arabidopsis* casein kinase II from recombinant subunits and phosphorylation of transcription factor GBF1. *Plant Cell* **7**, 105-115.
- Komis G., Šamajová O., Ovečka M., Šamaj J. (2018): Cell and Developmental Biology of Plant Mitogen-Activated Protein Kinases. *Annual Review of Plant Biology* **69**, 237-265.
- Kovtun Y., Chiu W.L., Tena G., Sheen J. (2000): Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **97**, 2940–2945.
- Kraus I., Agbo B.D., Otto M., Wiltfang J., Klafki H. (2015): Detection and Differentiation of Threonine- and Tyrosine-Monophosphorylated Forms of ERK1/2 by Capillary Isoelectric Focusing-Immunoassay. *Scientific Reports* **5**, 12767.
- Kurien B.T., Danda D., Bachmann M.P., Scofield R.H. (2015): SDS-PAGE to Immunoblot in One Hour. *Methods in Molecular Biology* **1312**, 449-454.
- Lee J.S., Ellis B.E. (2007): *Arabidopsis* MAPK phosphatase 2 (MKP2) positively regulates oxidative stress tolerance and inactivates the MPK3 and MPK6 MAPKs. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 25020–25029.
- Lee J.S., Lee M.H., Kim J.I., Kim S.Y. (2014): *Arabidopsis* Putative MAP Kinase Kinase Kinases Raf10 and Raf11 are Positive Regulators of Seed Dormancy and ABA Response. *Plant and Cell Physiology* **56**, 84-97.
- Lee S., Choi H., Suh S., Doo I.S., Oh K.Y., Choi E.J., Taylor A.T.S., Low P.S., Lee Y. (1999): Oligogalacturonic acid and chitosan reduce stomatal aperture by inducing the evolution of reactive oxygen species from guard cells of tomato and *Commelina communis*. *Plant Physiology* **121**, 147–152.
- Lehti-Shiu M.D., Shiu S-H. (2012): Diversity, classification and function of the plant protein kinase superfamily. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **367**, 2619-2639.

- Lehti-Shiu M.D., Zou C., Hanada K., Shiu S.H. (2009): Evolutionary history and stress regulation of plant receptor-like kinase/pelle genes. *Plant Physiology* **150**, 12-26.
- Leinweber B.D., Leavis P.C., Grabarek Z., Wang C.L., Morgan K.G. (1999): Extracellular regulated kinase (ERK) interaction with actin and the calponin homology (CH) domain of actin-binding proteins. *Biochemical Journal* **344**, 117-123.
- Leitner A., Sturm M., Lindner W. (2011): Tools for analyzing the phosphoproteome and other phosphorylated biomolecules. *Analytica Chimica Acta* **703**, 19-30.
- Li Y., Yang S., Yang H., Hua J. (2007): The TIR-NB-LRR gene SNC1 is regulated at the transcript level by multiple factors. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal - APS Journals* **20**, 1449-1456.
- Lilley K.S., Razzaq A., Dupree P. (2002): Two-dimensional gel electrophoresis: recent advances in sample preparation, detection and quantitation. *Current Opinions in Chemical Biology* **6**, 46-50.
- Liu Y., Zhang S. (2004): Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**, 3386–3399.
- Lombardo M.C., Graziano M., Polacco J.C., Lamattina L. (2006): Nitric oxide functions as a positive regulator of root hair development. *Plant Signalling and Behavior* **1**, 28–33.
- Lu C., Han M.H, Guevara-Garcia A., Fedoroff N.V. (2002): Mitogen-activated protein kinase signaling in postgermination arrest of development by abscisic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **99**, 15812–15817.
- Lu X.S., Hrabak M.E. (2013): The myristoylated amino-terminus of an *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase mediates plasma membrane localization. *Plant Molecular Biology* **82**, 267-278.
- Luan S. (2003): Protein phosphatases in plants. *Annual Review of Plant Biology* **54**, 63-92.
- Malumbres M. (2014): Cyclin-dependent kinases. *Genome Biology* **15**, 122.
- Mandell D.J., Chorny I., Groban E.S., Wong S.E., Levine E., Rapp C.S., Jacobson, M.P. (2007): Strengths of hydrogen bonds involving phosphorylated amino acid side chains. *Journal of American Chemical Society* **129**, 820–827.
- Maugeri G., D’Amico A.G., Rasà D.M., Reitano R., Saccone S., Federico C., Parenti R., Magro G., D’Agata V. (2016): Expression profile of Wilms Tumor 1 (WT1) isoforms in undifferentiated and all-trans retinoic acid differentiated neuroblastoma cells. *Genes & Cancer* **7**, 47-58.
- McCartney R.R., Garnar-Wortzel L., Chandrashekarappa D.G., Schmidt M.C. (2016): Activation and inhibition of Snf1 kinase activity by phosphorylation within the activation loop. *Biochimica et Biophysica Acta* **11**, 1518-1528.

- McQueen P., Ghaffar S., Guo Y., Rubin M.E., Zi X., Hoang H.B. (2011): The Wnt signaling pathway: implications for therapy in osteosarcoma. *Expert Review of Anticancer Therapy* **11**, 1223-1232.
- Melikant B., Giuliani C., Halbmayr-Watzina S., Limmongkon A., Heberle-Bors E., Wilson C. (2004): The *Arabidopsis thaliana* MEK AtMKK6 activates the MAP kinase AtMPK13. *FEBS Letters* **576**, 5–8.
- Meng X., Zhang S. (2013): MAPK cascades in plant disease resistance signaling. *Annual Review of Phytopathology* **51**, 245-266.
- Meszáros T., Helfer A., Hatzimasoura E., Magyar Z., Serazetdinova L., Rios G., Bardóczy V., Teige M., Koncz C., Peck S., Bögre L. (2006): The *Arabidopsis* MAP kinase kinase MKK1 participates in defense responses to the bacterial elicitor flagellin. *The Plant Journal* **48**, 485–498.
- Miles G.P., Samuel M.A., Ellis B.E. (2009): Suppression of MKK5 reduces ozone-induced signal transmission to both MPK3 and MPK6 and confers increased ozone sensitivity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signalling and Behavior* **4**, 687–692.
- Mizoguchi T., Irie K., Hirayama T., Hayashida N., Yamaguchi-Shinozaki K., Matsumoto K., Shinozaki K. (1996): A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold, and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **93**, 765–769.
- Monod J., Wyman J., Changeux J.P. (1965): On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *Journal of Molecular Biology* **12**, 88-118.
- Monroe-Augustus M., Zolman B.K., Bartel B. (2003): IBR5, a dual-specificity phosphatase-like protein modulating auxin and abscisic acid responsiveness in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **15**, 2979-2991.
- Morrison D.K., Davis R.J. (2003): Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **19**, 91-118.
- Mounicou S., Szpunar J., Lobinski R. (2010): Inductively-coupled plasma mass spectrometry in proteomics, metabolomics and metallomics studies. *European Journal of Mass Spectrometry: SAGE Journals* **16**, 243-253.
- Mulekar J.J., Huq E. (2014): Expanding roles of protein kinase CK2 in regulating plant growth and development. *Journal of Experimental Botany* **65**, 2883-2893.
- Neville D.C., Rozanas C.R., Price E.M., Gruis D.B., Verkman A.S., Townsend R.R. (1997): Evidence for phosphorylation of serine 753 in CFTR using a novel metal-ion affinity resin and matrix-assisted laser desorption mass spectrometry. *Protein Science* **6**, 2436-2445.
- Newton A.C. (2009): Lipid activation of protein kinases. *Journal of Lipid Research* **50**, 266-271.
- Nongpiur R., Soni P., Karan R., Singla-Pareek L.S., Pareek A. (2012): Histidine kinases in plants.

- Cross talk between hormone and stress responses. *Plant Signalling and Behaviour* **7**, 1230-1237.
- Novák D., Vadovič P., Ovečka M., Šamajová O., Komis G., Colcombet J., Šamaj J. (2018): Gene Expression Pattern and Protein Localization of *Arabidopsis* Phospholipase D Alpha 1 Revealed by Advanced Light-Sheet and Super-Resolution Microscopy. *Frontiers in Plant Science* **9**, 371- 392.
- Nühse T.C., Stensballe A., Jensen O.N., Peck S.C. (2004): Phosphoproteomics of the *Arabidopsis* plasma membrane and a new phosphorylation site database. *Plant Cell* **16**, 2394-2405.
- O'Farrel P.H. (1975): High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry* **25**, 4007-4021.
- O'Brien J.A., Daudi A., Butt V.S., Bolwell G.P. (2012): Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. *Planta* **236** 765–779.
- Oliveira A.P., Sauer U. (2012): The importance of post-translational modifications in regulating *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *FEMS Yeast Research* **12**, 114-117.
- Ong S.E., Pandey A. (2001): An evaluation of the use of twodimensional gel electrophoresis in proteomics. *Biomolecular Engineering* **18**, 195–205.
- Ortiz-Masia D., Perez-Amador M.A., Carbonell J., Marcote M. J. (2007): Diverse stress signals activate the C1 subgroup MAP kinases of *Arabidopsis*. *FEBS Letters* **581**, 1834–1840.
- Oruganty K., Kannan N. (2012): Design principles underpinning the regulatory diversity of protein kinases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **367**, 2529-2539.
- Ovečka M., Takáč T., Komis G., Vadovič P., Bekešová S., Doskočilová A., Smékalová V., Luptovčíak I., Šamajová O., Schweighofer A., Meskiene I., Jonak C., Křenek P., Lichtscheidl I., Škultéty L., Hirt H., Šamaj J. (2014): Salt-induced subcellular kinase relocation and seedling susceptibility caused by overexpression of *Medicago* SIMKK in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **65**, 2335-2350.
- Pappan K., Qin W., Dyer J.H., Zheng L., Wang X. (1997): Molecular cloning and functional analysis of polyphosphoinositide-dependent phospholipase D, PLD $\beta$ , from *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 7055–7062.
- Pappan K., Wang X. (1999): Plant phospholipase D is an acidic phospholipase active at near-physiological Ca<sup>2+</sup> concentrations. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **368**, 347–353.
- Pappan K., Zheng S., Wang X. (1997): Identification and characterization of a novel plant phospholipase D that requires polyphosphoinositides and submicromolar calcium for activity in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 7048–7054.
- Partridge S.M. (1949): Separation of bases and amino acids by displacement chromatography on ion exchange columns. *Discussions of the Faraday Society* **7**, 296–305.



- Pecher P., Eschen-Lippold L., Herklotz S., Kuhle K., Naumann K., Bethke G., Uhrig J., Weyhe M., Scheel D., Lee J. (2014): The *Arabidopsis thaliana* mitogen-activated protein kinases MPK3 and MPK6 target a subclass of 'VQ-motif'-containing proteins to regulate immune responses. *New Phytologist* **203**, 592-606.
- Qiu J.L., Fiil B.K, Petersen K., Nielsen H.B., Botanga C.J., Thorgrimsen S., Palma K., Suarez-Rodriguez M.C., Sandbech-Clausen S., Lichota J., Brodersen P., Grasser K.D., Mattsson O., Glazebrook J., Mundy J., Petersen M. (2008): *Arabidopsis* MAP kinase 4 regulates gene expression through transcription factor release in the nucleus. *The EMBO Journal* **27**, 2214-2221.
- Rentel M.C., Lecourieux D., Ouaked F., Usher S.L., Petersen L., Okamoto H., Knight H., Peck S.C., Grierson C.S., Hirt H., Knight M.R. (2004): OXI1 kinase is necessary for oxidative burst-mediated signalling in *Arabidopsis*. *Nature* **427**, 858–861.
- Rickettsiae induce microvascular hyperpermeability via phosphorylation of VE-cadherins: evidence from atomic force microscopy and biochemical studies.
- Riera M., Veléz-Bermudéz C.I., Legnaioli T., Pagès M. (2013): Specific Features of Plant CK2. In: *Protein Kinase CK 2* (Pinna A.L.), Wiley-Blackwell, New Jersey, USA, 267-289.
- Rizhsky L., Liang H., Shuman J., Shulaev V., Davletova S., Mittler R. (2004): When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiology* **134**, 1683–1696.
- Roberts D.M., Harmon A.C. (1992): Calcium-modulated proteins: targets of intracellular calcium signals in higher plants. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* **43**, 375-414.
- Ross A.H., Baltimore D., Eisen H.N. (1981): Phosphotyrosine-containing proteins isolated by affinity chromatography with antibodies to a synthetic hapten. *Nature* **294**, 654-656.
- Roux P.P., Thibault P. (2013): The coming of age of phosphoproteomics; from large data sets to inference of protein functions. *Molecular and Cellular Proteomics* **12**, 3453-3464.
- Roy C.S., Pandey S. (2017): Phosphatidic acid binding inhibits RGS1 activity to affect specific signaling pathways in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **90**, 466-477.
- Rubin S.M., Gall A.L., Zheng N., Pavletich N.P. (2005): Structure of the Rb C-terminal domain bound to E2F1-DP1: a mechanism for phosphorylation-induced E2F release. *Cell* **123**, 1093–1106.
- Rushton P.J., Somssich I.E., Ringler P., ShencQ.J. (2010): WRKY transcription factors. *Trends in Plant Science* **15**, 247-258.
- Russo A.A., Jeffrey P.D., Pavletich N.P. (1996): Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation. *Nature Structural and Molecular Biology* **3**, 696-700.
- Sang Y., Cui D., Wang X. (2001b): Phospholipase D and phosphatidic acid mediated generation of superoxide in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **126**, 1449-1458.

- Sang Y., Zheng S., Li W., Huang B., Wang X. (2001a): Regulation of plant water loss by manipulating the expression of phospholipase D $\alpha$ . *The Plant Journal* **28**, 135–144.
- Sarid-Krebs L., Panigrahi K.C., Fornara F., Takahashi Y., Hayama R., Jang S., Tilmes V., Valverde F., Coupland G. (2015): Phosphorylation of CONSTANS and its COP1-dependent degradation during photoperiodic flowering of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **84**, 451–463.
- Shiu S.H., Bleecker, A.B. (2001): Receptor-like kinases from *Arabidopsis* form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 10763–10768.
- Schevchenko A., Tomas H., Havli J., Olsen V.J., Mann M. (2006): In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols* **1**, 2856–2860.
- Schmidt M.C., McCartney R.R. (2000):  $\beta$ -subunits of Snf1 kinase are required for kinase function and substrate definition. *The EMBO Journal* **19**, 4936–4943.
- Schweighofer A., Hirt H., Meskiene I. (2004): Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling. *Trends in Plant Science* **9**, 236–243.
- Smékalová V., Doskočilová A., Komis G., Šamaj J. (2014): Crosstalk between secondary messengers, hormones and MAPK modules during abiotic stress signalling in plants. *Biotechnological Advances* **32**, 2–11.
- Smékalová V., Luptovciak I., Komis G., Šamajová O., Ovečka M., Doskočilová A., Takáč T., Vadovič P., Novák O., Pechan T., Ziemann A., Košútová P., Šamaj J. (2014): Involvement of YODA and mitogen activated protein kinase 6 in *Arabidopsis* post-embryonic root development through auxin up-regulation and cell division plane orientation. *New Phytologist* **203**, 1175–1193.
- Smith R.D., and Walker C.J. (1996): Plant Protein Phosphatases. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**, 101–125.
- Solano R., Stepanova A., Chao Q., Ecker J. R. (1998): Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. *Genes and Development* **12**, 3703–3714.
- Stasyk T., Morandell S., Bakry R., Feuerstein I., Huck C.W., Stecher G., Bonn G.K., Huber L.A. (2005): Quantitative detection of phosphoproteins by combination of two-dimensional difference gelelectrophoresis and phosphospecific fluorescent staining. *Electrophoresis* **26**, 2850–2854.
- St-Denis N., Gingras A.C. (2012): Mass spectrometric tools for systematic analysis of protein phosphorylation. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* **106**, 3–32.
- Steggerda S.M., Paschal B.M. (2002): Regulation of nuclear import and export by the GTPase Ran. *International Review of Cytology* **217**, 41–91.
- Stone M.J., Walker C.J (1995): Plant protein kinase families and signal transduction. *Plant Physiology* **108**, 451–457.

- Sugiyama N., Nakagami H., Mochida K., Daudi A., Tomita M., Shirasu K., Ishihama Y. (2008): Large-scale phosphorylation mapping reveals the extent of tyrosine phosphorylation in *Arabidopsis*. *Molecular Systems Biology* **4**, 193.
- Suzuki N., Koussevitzky S., Mittler R., Miller G. (2012): ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant, Cell & Environment* **35**, 259–270.
- Swulius M.T., Waxham M.N. (2008): Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent Protein Kinases. *Cellular and Molecular Life Sciences* **65**, 2637-2657.
- Takáč T., Pechan T., Richter H., Müller J., Eck C., Böhm N., Obert B., Ren H., Niehaus K., Šamaj J. (2011): Proteomics on brefeldin A-treated *Arabidopsis* roots reveals profilin 2 as a new protein involved in the cross-talk between vesicular trafficking and the actin cytoskeleton. *Journal of Proteome Research* **2**, 488-501.
- Takáč T., Šamajová O., Šamaj J. (2017): Integrating cell biology and proteomic approaches in plants. *Journal of Proteomics* **169**, 165-175.
- Takáč T., Vadovič P., Pechan T., Luptovčiak I., Šamajová O., Šamaj J. (2016): Comparative proteomic study of *Arabidopsis* mutants *mpk4* and *mpk6*. *Scientific Reports* **6**, 28306.
- Takahashi F., Mizoguchi T., Yoshida R., Ichimura K., Shinozaki K. (2011): Calmodulin-Dependent Activation of MAP Kinase for ROS Homeostasis in *Arabidopsis*. *Molecular Cell* **41**, 649-660.
- Tanoue T., Nishida E. (2003): Molecular recognitions in the MAP kinase cascades. *Cell Signal* **15**, 455-462.
- Thiery L., Leprince A.S., Lefebvre D., Ghars M.A., Debarbieux E., Savouré A. (2004): Phospholipase D is a negative regulator of proline biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 14812–14818.
- Thornton T.M., Pedraza-Alva G., Deng B., Wood C.D., Aronshtam A., Clements J.L., Sabio G., Davis R.J., Matthews D.E., Doble B., Rincon M. (2008): Phosphorylation by p38 MAPK as an alternative pathway for GSK3beta inactivation. *Science* **320**, 667-670.
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceeding of the National Academy of Sciences, USA* **76**, 4350-4354.
- Umezawa T., Sugiyama N., Takahashi F., Anderson J.C., Ishihama Y., Peck S.C., Shinozaki K. (2013): Genetics and phosphoproteomics reveal a protein phosphorylation network in the abscisic acid signaling pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Science Signalling* **270**, 1-13.
- Varjosalo M., Keskitalo S., Van Drogen A., Nurkkala H., Vichalkovski A., Aebbersold R., Gstaiger M. (2013): The protein interaction landscape of the human CMGC kinase group. *Cell Reports* **25**, 1306-1320.

- Vu H.S., Roston R., Shiva S., Hur M., Wurtele E.S., Wang X., Shah J., Welti R. (2015): Modifications of membrane lipids in response to wounding of *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant Signalling and Behaviour* **10**, e1056422.
- Walia A., Lee J.S., Wasteneys G., Ellis B. (2009): *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase MPK18 mediates cortical microtubule functions in plant cells. *The Plant Journal* **59**, 565–575.
- Wang G., Ryu S., Wang X. (2012): Plant phospholipases: an overview. *Methods in Molecular Biology* **861**, 123–137.
- Wang H., Chevalier D., Larue C., Cho K.S., Walker C.J. (2007a): The Protein Phosphatases and Protein Kinases of *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologist* **5**, e0106.
- Wang H., Liu Y., Bruffett K., Lee J., Hause G., Walker J.C. (2008): Haplo-insufficiency of MPK3 in MPK6 mutant background uncovers a novel function of these two MAPKs in *Arabidopsis* ovule development. *Plant Cell Online* **20**, 602-613.
- Wang H., Ngwenyama N., Liu Y., Walker J.C., Zhang S. (2007b): Stomatal development and patterning are regulated by environmentally responsive mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **19**, 63-73.
- Wang M., Feng W.Y., Zhao Y.L., Chai Z.F. (2010): ICP-MS-based strategies for protein quantification. *Mass Spectrometry Review* **29**, 326-348.
- Wang P., Du Y., Li Y., Ren D., Song C.P. (2010): Hydrogen peroxide-mediated activation of MAP kinase 6 modulates nitric oxide biosynthesis and signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **22**, 2981-2998.
- Wang X. (2001): Plant phospholipases. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**, 211–231.
- Wang X., Bian Y., Cheng K., Gu L.F., Ye M., Zou H., Sun S.S., He J.X. (2013): A large-scale protein phosphorylation analysis reveals novel phosphorylation motifs and phosphoregulatory networks in *Arabidopsis*. *Journal of Proteomics* **78**, 486-498.
- Wang X., Devaiah S.P., Zhang W., Welti R. (2006): Signaling functions of phosphatidic acid. *Progress in Lipid Research* **45**, 250–278
- Wang X.Q., Ullah H., Jones A.M., Assmann S.M. (2001): G protein regulation of ion channels and abscisic acid signaling in *Arabidopsis* guard cells. *Science* **292**, 2070–2072.
- Wasternack C., Hause B. (2013): Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of Botany* **111**, 1021-1058.
- Wehr T., Zhu M., Rodriguez-Diaz R. (1996): Capillary Isoelectric Focusing. *Methods in Ezymology* **270**, 358-374.
- Welburn J.P., Tucker J.A., Johnson T., Lindert L., Morgan M., Willis A., Noble M.E., Endicott J.A. (2007): How tyrosine 15 phosphorylation inhibits the activity of cyclin-dependent kinase 2-cyclin A. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 3173–3181.

- White M.F., Wolf-Yadlin A. (2016): Methods for the Analysis of Protein Phosphorylation–Mediated Cellular Signaling Networks. *Annual Review of Analytical Chemistry* **9**, 295-315.
- Widmann C., Gibson S., Jarpe M.B., Johnson G.L. (1999): Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiological Reviews* **79**, 143-180.
- Willmann R., Haischer D.J., Gust A.A. (2014): Analysis of MAPK Activities Using MAPK-Specific Antibodies. *Methods in Molecular Biology* **1171**, 27-37.
- Wu X.N., Sanchez Rodriguez C., Pertl-Obermeyer H., Obermeyer G., Schulze W.X. (2013): Sucrose-induced receptor kinase SIRK1 regulates a plasma membrane aquaporin in *Arabidopsis*. *Molecular and Cellular Proteomics* **10**, 2856-2873.
- Wyss M., Pasamontes L., Friedlein A., Rémy R., Tessier M., Kronenberger A., Middendorf A., Lehmann M., Schnoebelen L., Röthlisberger U., Kuszniir E., Wahl G., Müller F., Lahm H.W., Vogel K., van Loon A.P.G.M. (1999): Biophysical Characterization of Fungal Phytases (myo-Inositol Hexakisphosphate Phosphohydrolases): Molecular Size, Glycosylation Pattern, and Engineering of Proteolytic Resistance. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 359-366.
- Xiong L., Schumaker K.S., Zhu J.K. (2002): Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell* **14**, 165–183.
- Xue Y., Zhou F., Zhu M., Ahmed K., Chen G., Yao X. (2005): GPS: a comprehensive www server for phosphorylation sites prediction. *Nucleic Acids Research* **33**, 184-187.
- Yamada Y., Sato F. (2016): Tyrosine phosphorylation and protein degradation control the transcriptional activity of WRKY involved in benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis. *Scientific Reports* **6**, 31998.
- Yamagata A., Kristensen B.D., Takeda Y., Yuka Miyamoto., Okada K., Inamatsu M., Yoshizato K. (2002): Mapping of phosphorylated proteins on two-dimensional polyacrylamide gels using protein phosphatase. *Proteomics* **2**, 1267-1276.
- Yamaoka S., Shimono Y., Shirakawa M., Fukao Y., Kawase T., Hatsugai N., Tamura K., Shimada T., Hara-Nishimura I. (2013): Identification and dynamics of *Arabidopsis* adaptor protein-2 complex and its involvement in floral organ development. *Plant Cell* **25**, 2958–2969.
- Ye Y., Li Z., Xing D. (2013): Nitric oxide promotes MPK6-mediated caspase-3-like activation in cadmium-induced *Arabidopsis thaliana* programmed cell death. *Plant, Cell & Environment* **36**, 1–15.
- Yoo S.D., Cho Y.H., Tena G., Xiong Y., Sheen, J. (2008): Dual control of nuclear EIN3 by bifurcate MAPK cascades in C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> signalling. *Nature* **451**, 789–795.
- Yu L., Nie J., Cao C., Jin Y., Yan M., Wang F., Liu J., Xiao Y., Liang Y., Zhang W. (2010): Phosphatidic acid mediates salt stress response by regulation of MPK6 in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **3**, 762-773.

- Zeng Q., Sritubtim S., Ellis B.E. (2011): AtMKK6 and AtMPK13 are required for lateral root formation in *Arabidopsis*. *Plant Signalling and Behaviour* **6**, 1436-1439.
- Zhang H., Zhou H., Berke L., Heck A.J., Mohammed S., Scheres B., Menke F.L. (2013): Quantitative phosphoproteomics after auxin-stimulated lateral root induction identifies an SNX1 protein phosphorylation site required for growth. *Molecular and Cellular Proteomics* **5**, 1158-1169.
- Zhang Q., Lin F., Mao T., Nie J., Yan M., Yuan M., Zhang W. (2012): Phosphatidic acid regulates microtubule organization by interacting with MAP65-1 in response to salt stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **24**, 4555–4576.
- Zhang Q., Qu Y., Wang Q., Song P., Wang P., Jia Q., Jinhe G. (2017): *Arabidopsis* phospholipase D $\alpha$  1-derived phosphatidic acid regulates microtubule organization and cell development under microtubule-interacting drugs treatment. *Journal of Plant Research* **130**, 193–202.
- Zhang S., Klessig D.F. (2001): MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends in Plant Science* **6**, 520–527.
- Zhang S.H., Lawton M.A., Hunter T., Lamb C.J. (1994): AtPK1, a novel ribosomal protein kinase gene from *Arabidopsis*. I. Isolation, characterization, and expression. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 17586-17592.
- Zhang W., Qin C., Zhao J., Wang X. (2004): Phospholipase D  $\alpha$ 1-derived phosphatidic acid interacts with ABI1 phosphatase 2C and regulates abscisic acid signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* **101**, 9508–9513.
- Zhao J., Devaiah S.P., Wang C., Li M., Welti R., Wang X. (2013): *Arabidopsis* phospholipase D $\beta$ 1 modulates defense responses to bacterial and fungal pathogens. *New Phytologist* **199**, 228–240.
- Zheng L., Krishnamoorthi R., Zolkiewski M., Wang X. (2000): Distinct Ca<sup>2+</sup> binding properties of the novel C2 domains of plant phospholipase D $\alpha$  and  $\beta$ . *Journal of Biological Chemistry* **275**, 19700–19706.
- Zhou H., Ye M., Dong J., Han G., Jiang X., Wu R., Zou H. (2008): Specific phosphopeptide enrichment with immobilized titanium ion affinity chromatography adsorbent for phosphoproteome analysis. *Journal of Proteome Research* **7**, 3957-3967.
- Zhu K., Zhao J., Lubman D.M., Miller F.R., Barder T.J. (2005): Protein pI shifts due to posttranslational modifications in the separation and characterization of proteins. *Analytical Chemistry* **77**, 2745-2755.
- Zwick E., Bange J., Ullrich A. (2001): Receptor tyrosine kinase signalling as a target for cancer intervention strategies. *Endocrine-Related Cancer* **3**, 161-173.

## 8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

CaMK	
CDPK	Proteínkináz závislé na vápenatých iónoch
CDK	Proteínkinázy závislé na cyklíne
GSK	
CK	Kazeínové kinázy
MAPKKK	Mitogénom aktivované proteínkinázy kinázy kinázy
MAPKK	Mitogénom aktivované proteínkinázy kinázy
MAPK	Mitogénom aktivované proteínkinázy
MPK3	Mitogénom aktivovaná proteínkináza 3
ASK	Arabidopsis SKP-1 homologue
GBF1	G-box binding factor 1
PTK	Proteín tyrozínkinázy
RTK	Receptorové tyrozínkinázy
RLK	Receptorové kinázy podobné receptorom
PPP	Fosfoproteínové fosfatázy
PPM	Proteínové fosfatázy závislé na mangáne/horčíku
MKP1	MAP kinase phosphatase 1
MKP2	MAP kinase phosphatase 2
ABA	kyselina abscisová
Csk	C-terminálna Src kináza
Src	Sarkóm
ERK	Extracelullar-signal-regulated kinase
STAT	Signal transducer and activator of transcription
ROS	Reaktívne formy kyslíka
SA	Kyselina salicylová
PAMP	Molekulové domény asociované s patogénmi
OXI1	Oxidative signal – inducible 1
PLD $\alpha$ 1	Fosfolipáza D alfa 1
TEMED	Tetrametyléndiamín
IAA	Amid kyseliny jódooctovej
DTT	Dithiotreitol
FLIM	Fluorescence lifetime imaging microscopy
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
KLH	Keyhole limpet hemocyanin
pRb	Retinoblastoma protein
EZF1	Endothelial zinc finger protein
DP1	Dimerization partner 1
CO	CONSTANS
COP1	Constitutive photomorphogenic 1
PVDF	Polyvinilidín difluorid
APS	Peroxodisíran amónny
CH	Calponin homology
IMAC	Imobilised metal afinity chromatography
MOAC	Metal oxide afinity chromatography
PolyMAC	Polymer-based metal ion afinity chromatography

HILIC	Hydrophilic interaction liquid chromatography
SAX	Strong anionic exchange
SCX	Strong cationic exchange
MALDI-MS	Matrix assisted laser desorption ionisation-mass spectrometry
ESI-MS	Electrospray ionization-mass spectrometry
ICP-MS	Inductively coupled plasma-mass spectrometry
NTF	Nuclear transfer factor
FLS2	Flagellin sensing 2
BAK1	BRI1-associated kinase
MKS1	MAP kinase substrate 1
VIP1	Vire-2 interacting protein 1
VQP	VQ-motif containing proteins
SNC1	Suppressor of <i>npr1-1</i> , CONSTITUTIVE 1
ACS6	ACC synthase 6
NIA2	Nitrate reductase 2
NR	Nitrate reductase
PA	kyselina fosfatidová
SOD	superoxid dismutáza
HEPES	2-[4-(2-hydroxyetyl)piperazín-1-yl]etánsulfónová kyselina
MOPS	3-(N-morfolino)-propán sulfonová kyselina
BFB	Brómfenolová modrá