

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Charakterizace mutanta mitogen-aktivované proteinkinasy 3 z *Arabidopsis thaliana*

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: **Aneta Bajerová**
Studijní program: B1406 Biochemie
Studijní obor: Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: **Mgr. Veronika Zapletalová, Ph.D.**
Rok: 2017

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala především své vedoucí Mgr. Veronice Zapletalové, Ph.D., za odborné vedení, za cenné rady a především ochotu, vstřícnost a trpělivost během zpracování experimentální části a sepisování této práce. Dále děkuji celému kolektivu z oddělení buněčné biologie, za možnost vypracování experimentální části a za jejich přátelské chování.

Chtěla bych také velmi poděkovat mé rodině a přátelům, především tedy mým rodičům a příteli, kteří mi poskytovali po celou dobu studia velkou psychickou podporu.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Aneta Bajerová
Název práce	Charakterizace mutanta mitogen-aktivované proteinkinasy 3 z <i>Arabidopsis thaliana</i>
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Oddělení buněčné biologie, Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, PŘF UP
Vedoucí práce	Mgr. Veronika Zapletalová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2017

Abstrakt

Tato bakalářská práce je zaměřena na studium funkce mitogen-aktivované proteinkinasy 3 (MPK3) při vývoji *Arabidopsis thaliana* pomocí mutanta prezentovaného jako T-DNA inzerční mutant s nefunkčním genem *MPK3*. MPK3 patří k nejlépe charakterizovaným mitogen-aktivovaným proteinkinásám (MAPK), jež hrají významnou úlohu při buněčné signalizaci a podílejí se na rostlinné odpovědi vůči nejrůznějším typům abiotického a biotického stresu. Konkrétně MPK3 jsou součástí signálních drah vznikajících při působení těžkých kovů, v přítomnosti reaktivních kyslíkových radikálů, při osmotickém stresu nebo stresu vyvolaném různými patogeny. Hlavními cíli této práce byla genotypizace mutantních rostlin *Arabidopsis thaliana mpk3-4/2*, dále fenotypová analýza kořene a nadzemní části mutanta *mpk3-4/2*, která byla zaměřena na velikost semen, vzdálenost od kořenové špičky po první kořenový vlásek, délka hlavního kořene, velikost průduchů a rozdíly ve větvení trichomů a nakonec ověření absence proteinu MPK3 v homozygotních rostlinách mutanta *mpk3-4/2*. Při genotypizaci metodou PCR byly identifikovány homozygotní rostliny *mpk3-4/2* pomocí speciálně navržených primerů. Další generace těchto rostlin byla podrobena fenotypové analýze, při které však mutantní rostliny vykazovaly velmi podobný fenotyp jako kontrolní rostliny Col-0. Nebyly pozorovány žádné výrazné rozdíly. Nakonec byla ověřována absence proteinu MPK3 v homozygotních rostlinách *mpk3-4/2* pomocí metody Western blot a bylo zjištěno, že ve všech liniích T-DNA inzerčního mutanta *mpk3-4/2* je však protein MPK3 přítomen. Patrně proto nebyly pozorovány žádné rozdíly mezi fenotypem mutanta *mpk3-4/2* a kontrolními rostlinami.

Klíčová slova	Mitogen aktivované proteinkinasy (MAPK), <i>Arabidopsis thaliana</i> , MPK3, abiotický a biotický stres		
Počet stran	56	Počet příloh	0
Jazyk	Český		

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Aneta Bajerová
Title	Characterization of mitogen-activated protein kinase 3 mutant from <i>Arabidopsis thaliana</i>
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Cell Biology, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Faculty of science, UP
Supervisor	Mgr. Veronika Zapletalová, Ph.D.
The year of presentation	2017

Abstract

This bachelor thesis is focused on study of mitogen-activated protein kinase 3 (MPK3) function during a development of *Arabidopsis thaliana* using mutant presented as T-DNA insertion mutant with nonfunctional *MPK3* gene. MPK3 belongs to the best characterized mitogen-activated protein kinases (MAPKs) which play an important role during cell signaling and they are involved in the plant response to diverse types of abiotic and biotic stresses. Specifically, MPK3 participates in the signal pathways emerging during heavy metal stress, in presence of reactive oxygen species, during osmotic stress or stress caused by various pathogens. Genotyping of *Arabidopsis thaliana mpk3-4/2* mutant plants, then phenotypic analysis of root and aboveground part of *mpk3-4/2* mutant focused on seed size, distance from root tip to first visible root hair, main root length, stomata size and differences in trichome branching and finally verification of MPK3 protein absence in homozygous plants of *mpk3-4/2* were the main goals of this thesis. Homozygous plants of *mpk3-4/2* were identified by PCR using specially designed primers. Next generation of these plants were subjected to phenotypic analysis, but mutant plants have showed very similar phenotype as wild type plants. No significant differences were observed. Finally, absence of MPK3 protein was verified by Western blot in homozygous plants of *mpk3-4/2* and the results proved the presence of MPK3 in all T-DNA insertion mutant lines. Probably this is the reason why no differences between phenotype of *mpk3-4/2* mutant plants and the wild type plants were observed.

Keywords	Mitogen-activated protein kinase, <i>Arabidopsis thaliana</i> , MPK3, abiotic and biotic stress		
Number of pages	56	Number of appendices	0
Language	Czech		

Obsah

1	ÚVOD.....	1
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY.....	2
2.1	Signální kaskáda mitogen-aktivovaných proteinkinasy u rostlin.....	2
2.1.1	Adaptace rostlinných organismů.....	2
2.1.2	Mitogen-aktivované proteinkinasy.....	2
2.1.2.1	Mitogen-aktivované proteinkinasy kinasy kinasy.....	4
2.1.2.2	Mitogen-aktivované proteinkinasy kinasy.....	5
2.1.2.3	Mitogen-aktivované proteinkinasy.....	6
2.1.3	Aktivace a inaktivace MAPK signální kaskády.....	8
2.1.4	Mitogen-aktivované proteinkinasy a jejich substráty.....	9
2.1.5	Scaffold proteiny.....	9
2.1.6	Mitogen-aktivovaná proteinkinasa 3.....	10
2.1.6.1	Role MPK3 při oxidativním stresu.....	11
2.1.6.2	Role MPK3 při osmotickém stresu.....	12
2.1.6.3	Role MPK3 při stresu těžkými kovy - kadmíem.....	15
2.1.6.4	Role MPK3 při biotickém stresu.....	15
2.2	Modelový organismus <i>Arabidopsis thaliana</i>	17
2.3	Transformace rostlin <i>Arabidopsis thaliana</i> pomocí <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	18
2.4	T-DNA inzerční mutant <i>Arabidopsis mpk3-4/2</i>	21
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	22
3.1	Materiál.....	22
3.1.1	Použité přístroje.....	22
3.1.2	Software pro zpracování výsledků.....	22
3.1.3	Enzymy a chemikálie.....	23
3.1.4	Složení médií a roztoků.....	24
3.1.4.1	Roztoky a media pro Western blot.....	24
3.1.5	Rostlinný materiál.....	25
3.2	Metody.....	26
3.2.1	Povrchová sterilizace semen <i>Arabidopsis thaliana</i>	26
3.2.2	Výsev semen <i>Arabidopsis thaliana</i>	26
3.2.3	Selekce T-DNA inzerčních mutantů <i>mpk3-4/2</i>	26
3.2.4	Pozorování semen <i>Arabidopsis thaliana</i>	27

3.2.5	Pozorování semenáčků <i>Arabidopsis thaliana</i>	27
3.2.6	Pozorování průduchů na kotyledonech <i>Arabidopsis thaliana</i> a měření jejich velikosti.....	27
3.2.7	Měření délky hlavního kořene semenáčků <i>Arabidopsis thaliana</i>	27
3.2.8	Genotypová analýza <i>mpk3-4/2</i> mutantů metodou PCR	28
3.2.9	Elektroforéza v agarosovém gelu.....	29
3.2.10	Izolace proteinů	29
3.2.11	Denaturující polyakrylamidová elektroforéza (SDS-PAGE).....	29
3.2.11.1	Western blot.....	30
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	32
4.1	Genotypizace mutantních rostlin <i>mpk3-4/2</i> generace T1	32
4.2	Ověření přítomnosti selekčního markeru	35
4.3	Genotypizace mutantních rostlin <i>mpk3-4/2</i> generace T2	37
4.4	Studium fenotypu mutantu <i>mpk3-4/2</i>	38
4.5	Ověření přítomnosti proteinu MPK3 v mutantních rostlinách <i>mpk3-4/2</i> pomocí metody Western blot	45
5	ZÁVĚR	47
6	LITERATURA	48
7	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	55

CÍLE:

TEORETICKÁ ČÁST

Zpracování literární rešerše na téma mitogen-aktivované proteinkinasy (MAPK), zaměřené především na mitogen-aktivovanou proteinkinasu 3 (MPK3) z *Arabidopsis thaliana*

PRAKTICKÁ ČÁST

Kultivace rostlin *Arabidopsis thaliana* Col-0 a *mpk3-4/2* v *in vivo* a *in vitro* podmínkách

Mikroskopické pozorování fenotypu kořene a nadzemní části mutantu *mpk3-4/2*

Vyhodnocení výsledků pomocí ImageJ software

Genotypizace mutantu *mpk3-4/2* metodou PCR

Extrakce proteinů z kontrolních a mutantních semenáčků *Arabidopsis thaliana*

Ověření absence proteinu MPK3 v mutantovi *mpk3-4/2* metodou western blot

1 ÚVOD

Rostliny jsou na rozdíl od živočichů sesilní organismy, a proto jsou často vystavovány nepříznivým podmínkám životního prostředí (abiotické a biotické stresy), ze kterého nemohou uniknout (Zhu, 2002). Pro adaptaci rostlin na nepříznivé podmínky existuje mnoho buněčných signálních komponent, které vyvolávají specifické odpovědi na stresové podmínky. Díky tomu je rostlina schopná se adaptovat a v nepříznivých podmínkách přežít (Ulm *et al.*, 2002). Mezi tyto signální komponenty patří také mitogen-aktivované proteinkinasy (MAPK), enzymy patřící do skupiny serin/threonin proteinkinasy, které fungují ve formě kaskád. MAPK kaskády jsou schopny reverzibilně fosforylovat proteinové substráty, a tím přenášet a zesílit signál vyvolaný různými vnějšími stimuly až do buněčného jádra. K přenosu signálu tedy dochází fosforylací jednotlivých komponent signální dráhy až na konečný substrát. Deaktivace probíhá defosforylací pomocí MAP kinasových fosfatů. Mitogen-aktivované proteinkinasy jsou zapojeny do klíčových buněčných procesů jakými jsou například buněčné dělení, genová exprese, buněčná diferenciace a proliferace (Morris 2001; Romeis 2001; Tena *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001). Mitogen-aktivovaná proteinkinasa 3 z *Arabidopsis thaliana* (MPK3) o velikosti 42 kDa patří mezi nejlépe prostudované MAP kinasy *Arabidopsis thaliana* a je známo, že se účastní mnoha buněčných odpovědí v reakci rostliny na osmotický stres, oxidativní stres, na stres způsobený těžkými kovy nebo také při napadení rostliny patogenem (Ichimura *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2016). MPK3 však také hraje důležitou roli při vývoji rostliny, konkrétně například při embryogenezi nebo při vývoji průduchů (Bergmann *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2017).

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Signální kaskáda mitogen-aktivovaných proteinkinasy u rostlin

2.1.1 Adaptace rostlinných organismů

Jelikož rostliny žijí na rozdíl od živočichů přisedavým způsobem života, je pro jejich přežití nutné, aby se v případě nepříznivého životního prostředí na nové podmínky adaptovaly (Zhu, 2002). Rostliny pak mohou být vůči novým podmínkám rezistentní, tolerantní nebo citlivé. Pokud jsou rezistentní, vytvoří si nové vlastnosti, které zabrání stresovým faktorům působit na rostlinu a ta díky tomu přežije. Mezi znak rezistence patří například zesílení buněčné stěny. V případě tolerance stresové faktory na rostlinu působí, ale neovlivní ji natolik, aby musela měnit svůj metabolismus, a rostlina tedy přežije. Pokud je rostlina citlivá k novým podmínkám, není schopna se adaptovat a nepřežije (Potikha *et al.*, 1999).

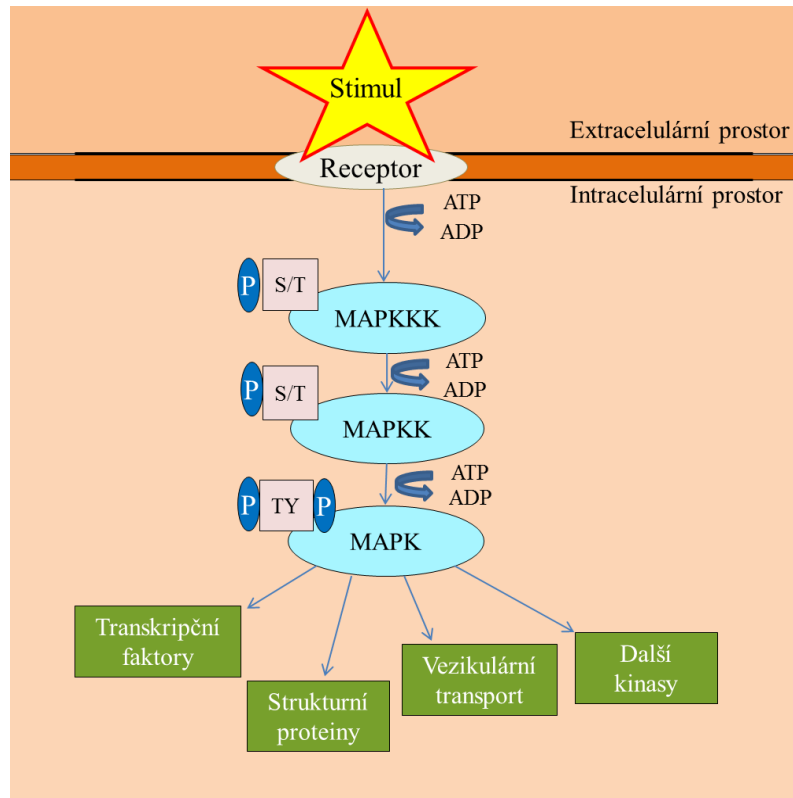
Adaptace na environmentální změny je umožněna díky aktivaci signálních komplexů charakteristických pro určité organismy. Mechanismus signálních kaskád reguluje buněčnou odpověď vyvolanou vnějšími změnami (Ulm *et al.*, 2002). Rozpoznávání extracelulárních stimulů je zajišťováno membránovými receptory jako například RLK (receptor-like kinase) a RLP (receptor-like proteins), které aktivují komplex vyvolávající efektivní intracelulární odpověď (Osakabe *et al.*, 2013). Během tohoto signálního procesu hrají důležitou roli mitogen-aktivované proteinkinasy (MAPK), které přenáší a zesilují specifický signál zachycený receptory. MAP kinasy tímto způsobem modifikují množství specifických cílových substrátů (Rodriguez *et al.*, 2010).

2.1.2 Mitogen-aktivované proteinkinasy

Mitogen-aktivované proteinkinasy (MAP kinasy, MAPK) hrají velmi důležitou roli v eukaryotických buňkách při procesech adaptace organismu na nepříznivé podmínky (Ichimura *et al.*, 2002; Colcombet a Hirt, 2008; Rodriguez *et al.*, 2010). Tyto fosforylační kaskády zprostředkovávají přenos a amplifikaci extracelulárního signálu do

buňky, kde vyvolají odpověď na stresové stimuly (Lewis *et al.*, 1998; Madhani a Fink, 1998; Schaeffer a Weber, 1999; Widmann *et al.*, 1999). Jedná se o signální enzymy patřící do skupiny serin/threonin proteinkinás, které jsou schopné reverzibilně fosforylovat a tím aktivovat cílovou molekulu na buněčné úrovni. Tímto je zajištěna intracelulární signální transdukce v organismu (Smékalová *et al.*, 2014b). Z celkového počtu proteinkinás obsažených v *Arabidopsis thaliana* (přibližně 1000), více než 100 genů kóduje komponenty MAPK signální dráhy (Teige *et al.*, 2004). V rostlinách jsou MAPK kaskády spojeny s různými fyziologickými, vývojovými, biochemickými a hormonálními odezvami. S použitím specifických protilátek proti jednotlivým MAPK bylo zjištěno, že aktivace MAP kinás koreluje s odezvou rostliny na různé abiotické a biotické stresy stejně jako řídí proces buněčné diferenciace, vývoj, růst a metabolismus (Morris 2001; Romies 2001; Tena *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001).

MAPK fungují ve formě kaskád, které obsahují tři základní komponenty (Obr. 1). První komponentou této signální dráhy je mitogen-aktivovaná proteinkinasa kinasa kinasa (MAP3K, MAPKKK nebo MEKK), která reverzibilně fosforyluje druhou komponentu signální dráhy – mitogen-aktivovanou proteinkinasu kinasu (MAP2K, MAPKK nebo MKK). Třetí komponentou je mitogen-aktivovaná proteinkinasa (MAPK nebo MPK), která je aktivována fosforylací pomocí MAP2K (Keshet a Seger, 2010). Ta pak může přenášet signál na různé substráty, kterými jsou především transkripční faktory (Ishihama a Yoshioka, 2012), cytoskeletální proteiny (Šamajová *et al.*, 2013) a další proteinkinasy (Popescu *et al.*, 2009). MAP2K má dvojitou specifitu, jelikož může být fosforylována na serinovém nebo threoninovém reziduu konzervovaného motivu S/T-X3-5-S/T, nalezeného v aktivační smyčce tohoto enzymu (Tanoue a Nishida, 2003). Aktivovaná MAP2K poté fosforyluje threoninové a tyrosinové residuum konzervovaného motivu T-X-Y v aktivační smyčce příslušné MPK (Keshet a Seger, 2010) (Obr. 1).



Obr. 1 Přenos signálu prostřednictvím kaskády mitogen-aktivovaných proteinkinasy. Signál z extracelulárního prostoru je zachycen receptorem na plazmatické membráně a následně přenesen na MAPKKK, která poté aktivuje MAPKK fosforylací serinového nebo threoninového rezidua. Poslední komponentou této kaskády je MAPK, která je aktivovaná dvojitou fosforylací Thr a Tyr. Signál je poté přenesen na konečné substráty, jako jsou transkripční faktory, cytoskeletální proteiny zajišťující vezikulární transport a změny ve formaci cytoskeletu a další kinasy. Fosforylace jednotlivých komponent je zajištěna hydrolýzou ATP.

2.1.2.1 Mitogen-aktivované proteinkinasy kinasy kinasy

Mitogen-aktivované proteinkinasy kinasy (MAP3K, MAPKKK nebo MEKK) patří mezi nejvíce zastoupené serin/threonin kinasy v genomu *A. thaliana*. Tyto proteinkinasy bývají aktivovány vnějším stimulem, jehož signál je zachycen membránovým receptorem. V některých případech, kdy je MAPK kaskáda tvořena více než třemi komponenty může být MEKK aktivována i nadřazenou MAP4K, která je součástí kaskády (Jonak *et al.*, 2002).

MAP3K se dělí do tří hlavních skupin: MEKK-like, Raf-like a ZIK-like, z nichž funkce prvních dvou skupin byla potvrzena u rostlin (Colcombet a Hirt, 2008). Tato skupina je reprezentována 20 členy rozdělenými do 6 podskupin A1-A6 podle podobnosti sekvence a strukturních motivů. Do skupiny A1 patří např. MEKK1-

MEKK4 (Ichimura *et al.*, 2002). Studia mutantů s geny *MEKK* vyřazenými z činnosti (tzv. knock-out mutanti) prokazují, že tyto kinasy hrají významnou roli při růstu a vývoji, stejně jako v reakcích na abiotické a biotické stresy (Virk *et al.*, 2015). Konkrétně MEKK1 se účastní obrany rostliny proti suchu, osmotickému stresu a doteku (Mizoguchi *et al.*, 1996). Je součástí kaskády MEKK1-MKK1/MKK2-MPK4, která reguluje buněčnou odpověď po napadení nekrotrofními patogeny. Tímto způsobem je MEKK1 zapojena v signální kaskádě reagující na biotický stres (Teige *et al.*, 2004; Ichimura *et al.*, 2006; Suarez-Rodriguez *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2008; Kong *et al.*, 2012). Do podskupiny A2 se řadí MAP3K označovaná jako YODA, která se zúčastňuje regulace buněčného dělení, růstu a vývoje. Dalšími zástupci MAP3K u *Arabidopsis* jsou ANP1, ANP2 a ANP3 (Arabidopsis NPK1 homolog) řadí se do podskupiny A3, které mají podobnou funkci jako YODA (Ichimura *et al.*, 2002; Krysan *et al.*, 2002; Bergmann *et al.*, 2004; Lukowitz *et al.*, 2004).

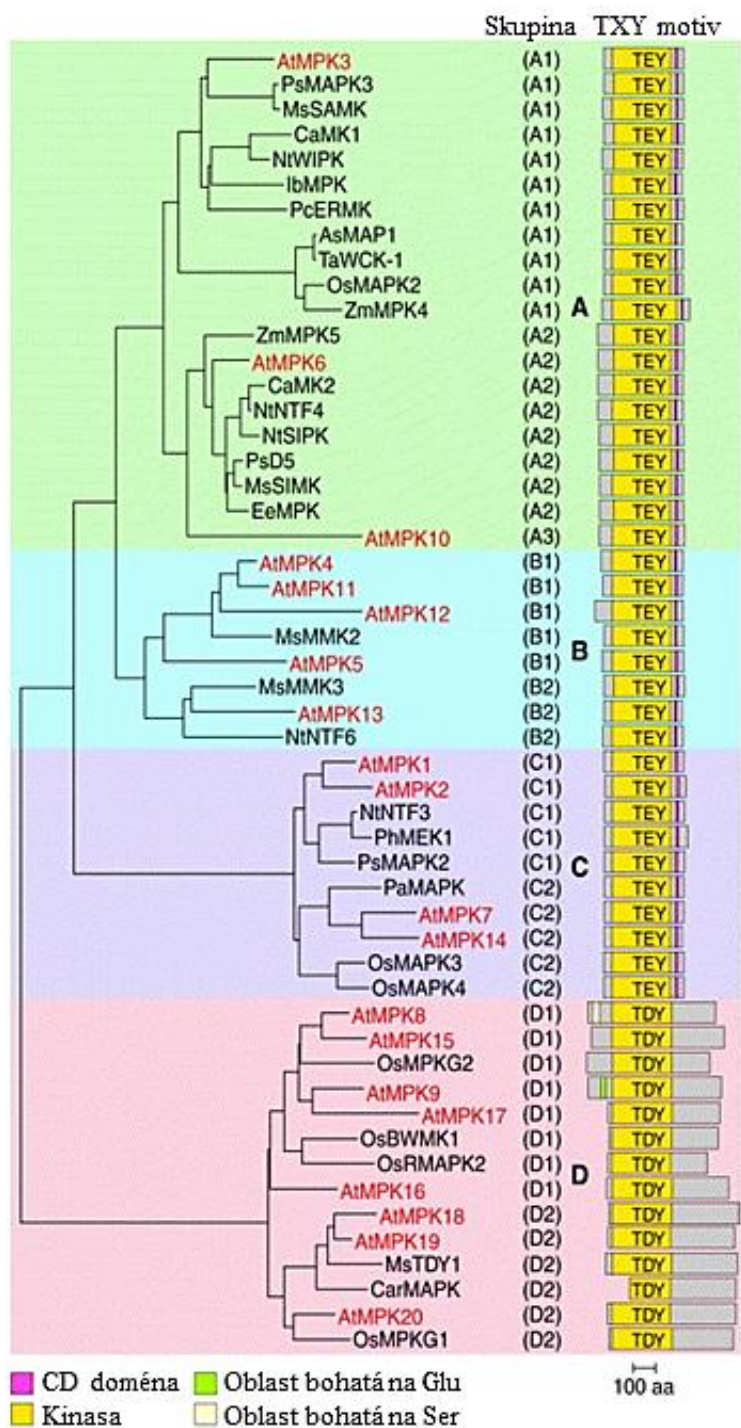
Různými abiotickými a biotickými stresy je také aktivovaná MAP3K zvaná Raf43 patřící do skupiny Raf-like. Zvýšená exprese genu *Raf43* byla zaznamenána po působení chladu, sucha, oxidativního a osmotického stresu, stejně jako v přítomnosti různých kmenů patogenů (Virk *et al.*, 2015). Funkce ZIK-like MAP3K v rostlinách nebyla dosud potvrzena (Colcomber a Hirt, 2008).

2.1.2.2 Mitogen-aktivované proteinkinasy kinasy

Jak již bylo zmíněno, mitogen-aktivované proteinkinasy kinasy (MAP2K, MAPKK nebo MKK) mají dvojitou specifitu, jelikož mohou být fosforylovány na serinovém nebo threoninovém reziduu konzervovaného motivu S/T-X3-5-S/T, který je součástí aktivační smyčky (Tanoue a Nishida, 2003). U *Arabidopsis thaliana* byly identifikovány dvě MA2PK, a to MKK1 a MKK2, které jsou spojené s biotickým i abiotickým stresem. Například exprese genu *MKK1* je vyvolána poraněním (Morris *et al.*, 1997), patogenními elicitory jako je flagellin a laminarin a peroxidem vodíku (Teige *et al.*, 2004). MKK1 a MKK2 nejčastěji asociují s jadernou MPK4, která společně se substrátovým proteinem MKS1 (MAP kinase substrate 1) vyvolává odpověď na biotický stres (Qui *et al.*, 2008).

2.1.2.3 Mitogen-aktivované proteinkinasy

Třetí komponentou MAPK signální kaskády jsou mitogen-aktivované proteinkinasy (MAPK nebo MPK), které jsou aktivovány fosforylací threoninového a tyrosinového residua konzervovaného motivu T-X-Y v aktivační smyčce (Keshet a Seger, 2010). Pro aktivaci MPK je tedy nutná dvojitá fosforylace. V genomu *Arabidopsis* bylo identifikováno 20 genů kódujících MPK. Tyto MPK lze rozdělit do čtyř skupin A-D, z nichž skupiny A-C obsahují motiv T-E-Y (TEY podskupina) a skupina D obsahuje motiv T-D-Y (TDY podskupina) (Menges *et al.*, 2008) (Obr. 2). Do podjednotky A patří MPK3 a MPK6, které jsou zapojeny do hormonálních a environmentálních stresových odpovědí. Do podjednotky B patří MPK4, která se účastní odpovědi na environmentální stres a regulaci buněčného dělení. Podjednotka C není dosud zcela prozkoumána, avšak její funkce se pojí s expresí genu *MPK7*. Druhá skupina obsahující motiv TDY se liší především tím, že na C-terminálním konci postrádá CD doménu, která funguje jako dokovací místo pro MAP kinasy, fosfatasy a proteinové substráty. Do této skupiny patří např. MPK8, MPK9 a MPK15 (Ichimura *et al.*, 2002) (Obr. 2).



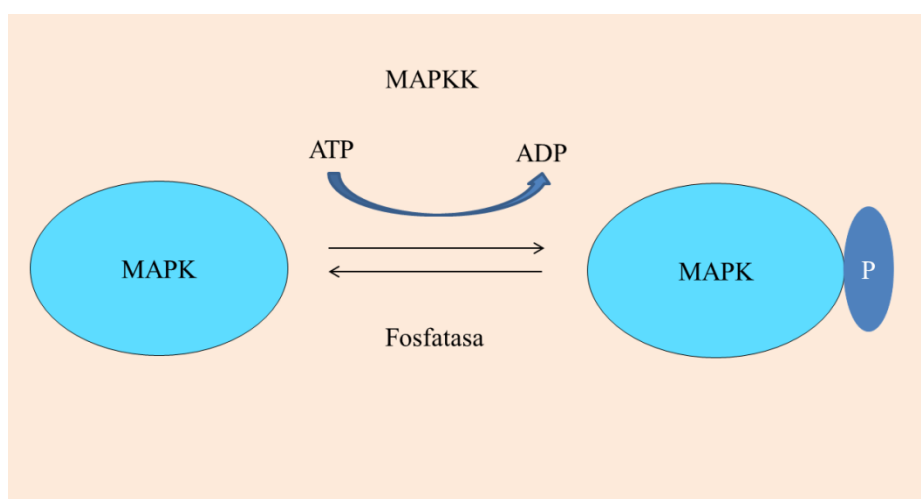
Obr. 2 Schéma znázorňující dělení mitogen-aktivovaných proteinkinas u rostlin. Červeně jsou zvýrazněny MAP kinasy vyskytující se u *Arabidopsis thaliana* (AtMPK). Jednotlivé MAP kinasy jsou rozděleny dle funkčních domén důležitých pro signální transdukcii a fosforylačního motivu T-X-Y (převzato z Ichimura *et al.*, 2002).

2.1.3 Aktivace a inaktivace MAPK signální kaskády

Každá MAP kinasa se za normálních podmínek v eukaryotické buňce vyskytuje v inaktivní defosforylované formě. Podnětem pro aktivaci MAP kinas jsou vnější stresové stimuly. Tyto stimuly aktivují membránové receptory nebo GTPázy které přenáší signál do intracelulárního prostoru (Chen a Thorner, 2007).

V buňce je signál zachycen proteinovým přenašečem nebo přímo příslušnou MAP kinasou. Vnějším stimulem mohou být různé abiotické stresy jako např. sucho, chlad, přílišná vlhkost, salinita, dotek, poranění (Rentel *et al.*, 2004, Huang *et al.*, 2012) nebo biotické stresy jako například bakteriální a plísňové infekce (Tena *et al.*, 2001). Po zachycení signálu je MAP kinasa fosforylována což způsobí konformační změny a tím je docíleno vzniku aktivované MAP kinasy (Chen a Thorner, 2007) (Obr. 3).

Aktivované MAP kinasy jsou po transportu signálu k cílové molekule inaktivovány. V případě neustálé aktivity některých kinas by docházelo k interakcím, které v klidových podmínkách organismus nevyžaduje. K inaktivaci neboli negativní regulaci fosforylovaných MAP kinas dochází pomocí MAP kinasových fosfat (Tanoue a Nishida, 2003). Jedná se tedy o fosforylaci reverzibilní. Do inaktivace MAP kinas jsou zapojeny např. protein-tyrosin fosfatasy (PTPs), serin-threonin fosfatasy (PSTPs) nebo duálně specifické Ser/Thr a Tyr fosfatasy (DSPs) (Keyse, 2008) (Obr. 3).



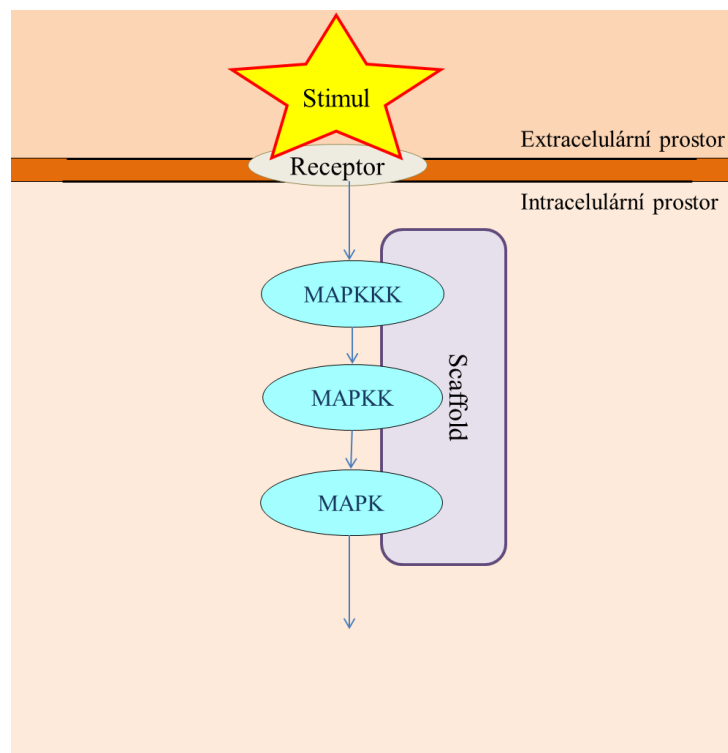
Obr. 3 Schéma ilustrující reverzibilní fosforylaci. MAPK je aktivována fosforylací prostřednictvím MAPKK. Dochází tak k přenosu fosfátové skupiny za hydrolyzy ATP. MAPK se vrací do inaktivního stavu pomocí defosforylace, která je katalyzována specifickou MAPK fosfatasou.

2.1.4 Mitogen-aktivované proteinkinasy a jejich substráty

Jak již bylo zmíněno, poslední komponentou MAPK signální kaskády jsou mitogen-aktivované proteinkinasy (MPK) aktivované prostřednictvím MAP2K. Proteomickou analýzou bylo identifikována 48 substrátů pro MPK3 a 39 substrátů pro MPK6. Celkem 26 těchto substrátů je společných pro obě tyto MAP kinasy. Jako první substrát MAP kinas byla identifikována syntasa 1-aminocyklopropan-1-karboxylové kyseliny (ACC syntasa), která hraje důležitou roli při syntéze rostlinného hormonu etylenu. Dalšími substráty pro MAP kinasy jsou různé transkripční faktory, cytoskeletální proteiny, proteiny účastnící se post-transkripční modifikace mRNA, receptory, histony a enzymy (Feilner *et al.*, 2005). Příkladem substrátu pro MPK3 a MPK6 je transkripční faktor SPCH (SPEECHLESS) regulující vývoj a funkci průduchů (Lampard *et al.*, 2008) a transkripční faktor WRKY46, který pozitivně reguluje expresi mnoha genů, včetně genů *LEA* (late embryogenesis abundant protein), které mají funkci v regulaci osmotického stresu (Ding *et al.*, 2014; Zhong *et al.*, 2014; Sheikh *et al.*, 2016). Mezi substráty MPK3 a MPK6, které regulují biotický stres, patří protein AtPHOS32 aktivovaný bakteriálním elicitorem flagellinem-22 (flg22) (Merkouropoulos *et al.*, 2008).

2.1.5 Scaffold proteiny

Jednotlivé komplexy MAP kinas jsou udržovány pohromadě pomocí tzv. "scaffold" proteinů (Obr. 4). Jejich funkcí je zprostředkování jak interakcí mezi jednotlivými komponenty MAPK komplexu, tak i interakcí mezi jednotlivými komplexy (Morrison a Davis, 2003). Ačkoliv scaffold proteiny nebyly dosud u rostlin identifikovány, předpokládá se, že některé MAP3K mohou mít tuto funkci díky dlouhému N- nebo C-terminálnímu konci. Je například známo, že OMTK1, MAP3K z vojtěšky aktivovaná oxidativním stresem má dvojí funkci. Jednak hraje důležitou roli v přenosu signálu při iniciaci buněčné smrti způsobené H₂O₂, ale také se váže na MAPK zvanou MMK3, kterou selektivně aktivuje (Nakagami *et al.*, 2004).



Obr. 4 Ilustrace funkce "scaffold" proteinů v MAPK kaskádě, jejichž úkolem je držet jednotlivé komplexy pohromadě a zprostředkovávat tak jejich vzájemné interakce.

2.1.6 Mitogen-aktivovaná proteinkinasa 3

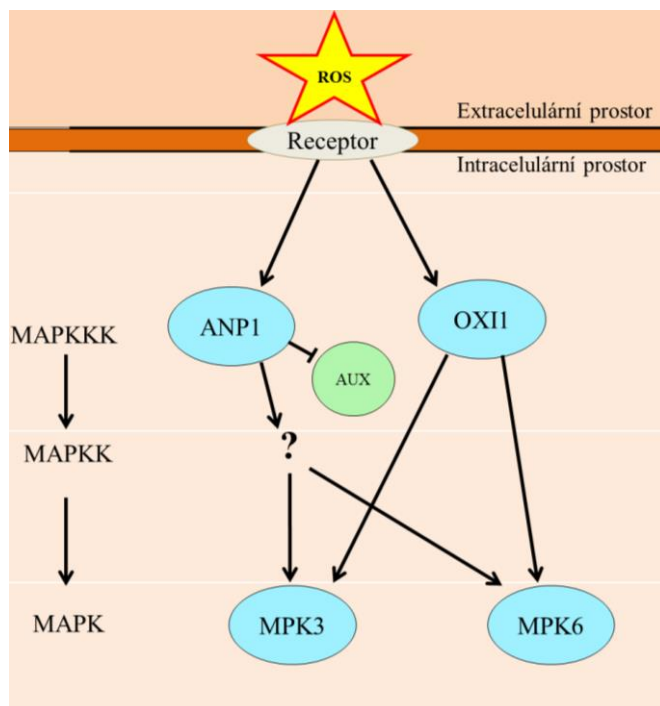
Mitogen-aktivovaná proteinkinasy 3 (MPK3) patří mezi nejlépe charakterizované MAPK u *Arabidopsis thaliana*. Jak již bylo zmíněno dříve, tato MAPK patří do skupiny A a vlastní motiv T-E-Y ve své aktivační smyčce. Gen *MPK3* (At3g45640) je lokalizován na 3. chromozomu a jeho exprese je nejčastěji aktivována oxidativním stresem, hyperosmotickým stresem (Ichimura *et al.*, 2002), stresem vyvolaným těžkými kovy, konkrétně kadmíem (Cd) (Liu *et al.*, 2010) a patogeny (Xu *et al.*, 2016). MPK3 je často aktivován společně s MPK6. Bylo dokázáno, že tyto dvě MAP kinasy sdílí překrývající se funkce v odpovědích na různé stimuly. Studium mechanismu komplexu MPK3/MPK6 při odpovědi rostlin na stresové faktory mimo jiné ukázalo, že MPK3 a MPK6 regulují biosyntézu etylenu, důležitého rostlinného stresového hormonu (Clark *et al.*, 1998, Gao *et al.*, 2003, Yoo *et al.*, 2008) a kamalexinu, což je fytoalexin, který rostlina syntetizuje při infekci patogenem (Ren *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2016). Další podkapitoly pojednávají o roli MPK3 při odpovědi na nejrůznější abiotické a biotické stresy.

2.1.6.1 Role MPK3 při oxidativním stresu

Oxidativní stres je typ abiotického stresu, tedy stresu způsobeného vlivem prostředí. Během oxidativního stresu jsou produkovány reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species – ROS), zahrnující H_2O_2 , superoxidové anionty a hydroxylové radikály (Kovtun *et al.*, 2000; Apel a Hirt, 2004). ROS mohou být při vysoké koncentraci pro rostlinu toxické, avšak v malém množství mají esenciální funkci při buněčné signalizaci, kde fungují jako tzv. druhotní poslové (second messengers). Tímto jsou úzce propojeny s MAPK drahami (Rentel *et al.*, 2004).

MPK3 může být aktivována mnoha stresovými podněty včetně působení H_2O_2 (Kovtun *et al.*, 2000; Yuasa *et al.*, 2001; Rentel *et al.*, 2004) Přítomnost peroxidu vodíku aktivuje již zmiňovanou MAP3K u *Arabidopsis* – ANP1. Tato MAP3K iniciuje aktivaci kaskády zahrnující MPK3 a MPK6, které následně vyvolávají specifickou stresovou odpověď. Naopak ANP1 blokuje funkci rostlinného hormonu auxinu. Existuje tvrzení, že funkce auxinu je v přítomnosti peroxidu vodíku negativně regulována (Kovtun *et al.*, 2000) (Obr. 5).

Reaktivní formy kyslíku také zvyšují expresi genu *OXII* (oxidative signal-inducible 1) v *A. thaliana*. Tento gen kóduje serin/threonin kinasu. Kinasa *OXII* je důležitá pro aktivaci MPK3 a MPK6 (Obr. 5), které se podílejí na obranném mechanismu rostliny vůči oxidativnímu stresu. Tento mechanismus je důležitý například při udržování normálního růstu kořenových vlásků, což bylo prokázáno přípravou *oxi1* mutantu s umlčeným genem *OXII*, ve kterém byla funkce MPK3 a MPK6 a tudíž i obranná funkce narušena (Rentel *et al.*, 2004).



Obr. 5 Schéma MAPK kaskády aktivované oxidativním stresem u *Arabidopsis thaliana*. Reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou vnímány pomocí receptoru, ze kterého je signál přenesen na MAP3K ANP1. Ta dále aktivuje MPK3 a MPK6. Během oxidativního stresu je aktivována i kinasa OXI1, která také přenáší signál až na MPK3 a MPK6. Při oxidativním stresu však dochází k inhibici funkce rostlinného hormonu auxinu (AUX).

2.1.6.2 Role MPK3 při osmotickém stresu

Růst rostlin a jejich produktivita jsou často vystaveny mnoha stresům, včetně osmotického stresu. Osmotický stres je většinou způsoben suchem, vysokou salinitou nebo nízkými teplotami, což vede ke snížené dostupnosti vody (Zhu 2002; Boudsocq a Lauriere 2005). Za osmotických stresových podmínek dochází k mnoha změnám v buňce, např. k biosyntéze kyseliny abscisové (ABA), aktivaci specifických signálních drah a ke změnám v genové expresi tak, aby organismus mohl aktivně reagovat a přizpůsobit se stresovým podmínkám (Zhao *et al.*, 2017).

Během hyperosmotického stresu jsou v rostlinách *A. thaliana* aktivovány MAP kinasové dráhy, které hrají esenciální roli při buněčné odpovědi, jedná se zejména o MPK3 a MPK6. Bylo zjištěno, že rostliny vystavené hypoosmotickému a hyperosmotickému stresu za použití sacharózy, mannitolu a NaCl, vykazují rapidní zvýšení aktivity MAP kinas, včetně MPK3 a MPK6. Srovnáním výsledů aktivity signální dráhy MPK3 a MPK6 při působení hyperosmotického stresu a stresu

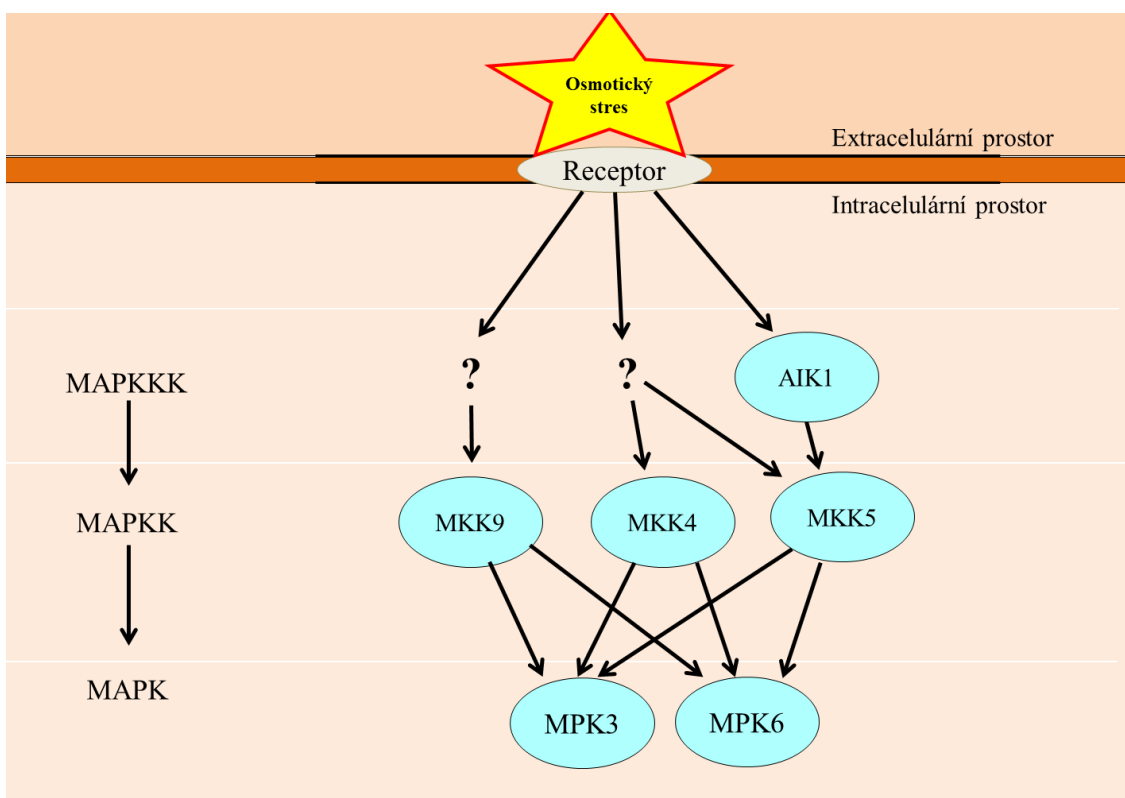
způsobeného mechanickým poškozením bylo zjištěno, že zřejmě existuje určitá spojitost a vzájemné interakce v buněčné odpovědi na tyto dva stresové faktory (Droillard *et al.*, 2002).

V rostlinách vystavených osmotickému stresu bylo detekováno rapidní zvýšení aktivity MAP kinas, které jsou součástí kaskády MKK9-MPK3/MPK6. Tato kaskáda následně vyvolává zvýšení hladiny indolových glukosinolátů (IGS) a 4-methoxy indolyl-3-methyl glukosinolátů (4MI3G), sekundárních metabolitů dobře známých pro svou roli v buněčné odpovědi a obranně rostliny zejména proti herbicidům a patogenům (Agerbirk *et al.*, 2009; Bednarek a Osbourn 2009, Zhao *et al.*, 2017). Nicméně bylo zjištěno, že glukosinoláty jsou zapojeny také v odpovědi na abiotické stresy (Skirycz *et al.*, 2010). Působení osmotického stresu na dvojitého mutantu *mpk3/mpk6* vedlo ke snížené akumulaci 4MI3G a zvýšení citlivosti rostliny stejně tak jako u mutantu *mkk9*. MPK3 a MPK6 jsou tedy v tomto případě aktivovány nadřazenou MKK9 kinasou (Droillard *et al.*, 2002) (Obr. 6).

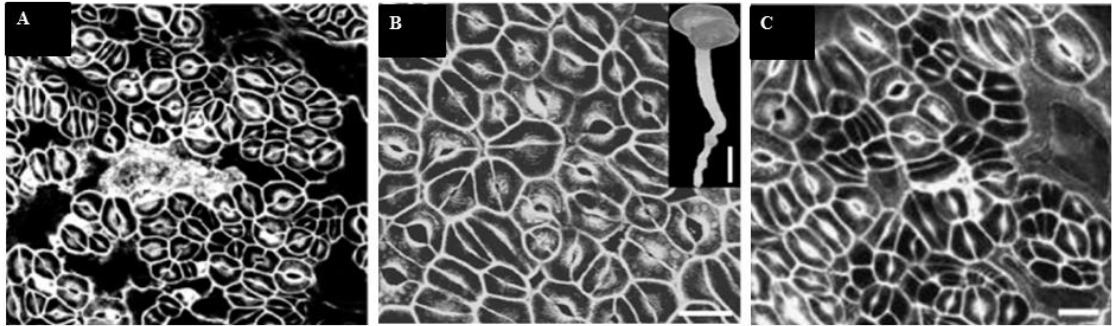
Důležitou roli v odpovědi na osmotický stres hrají specializované epidermální buňky zvané průduchy. Průduchy regulují výměnu plynů (CO₂ a O₂) a vody mezi rostlinami a jejich okolím. Přítomnost průduchů je tedy nezbytně nutná pro růst rostliny a její adaptaci v nepříznivých podmínkách (Nadeau a Sack, 2002; Woodward *et al.*, 2002; Hetherington a Woodward, 2003). Průduchy se mohou vyskytovat jak na abaxiální, tak i adaxiální straně listu v závislosti na druhu rostliny. Jsou formovány pomocí asymetrického buněčného dělení (Nadeau a Sack, 2002) a jejich vývoj a funkce jsou regulovány jak environmentálními podmínkami, tak i geneticky (Wang *et al.*, 2007).

Asymetrické buněčné dělení, a tím tedy i vývoj průduchů, je regulováno již známou dráhou YODA-MKK4/MKK5-MPK3/MPK6 (Bergmann *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007). V knock-out mutantech *mpk3* a *mpk6* a v mutantech s umlčenou funkcí MKK4 a MKK5 byla potlačena funkce a vývoj průduchů. Z toho vyplývá, že MAP kinasová aktivita je pro koordinaci pokožky listu nezbytná (Wang *et al.*, 2007). Pro vizualizaci funkce MPK3 a MPK6 aktivity při vývoji průduchů byl použit dvojitý mutant *mpk3/mpk6*, u kterého byly tvořeny nadměrné shluky průduchů a bylo porušeno pravidlo výskytu minimálně jedné epidermální buňky mezi jednotlivými průduchy jako u divokého typu rostlin *A. thaliana*. Stejných výsledků bylo dosaženo při pozorování dvojitých mutantů *mkk4/mkk5* a mutantu *yda* (mutace genu *YODA*) (Obr. 7), což dokazuje, že YODA, MKK4/MKK5 a MPK3/MPK6 jsou komponenty stejné signální dráhy (Wang *et al.*, 2007).

MAP kinasová aktivita reguluje vývoj a funkci průduchů prostřednictvím rostlinného hormonu kyseliny abscisové (ABA). Role kyseliny abscisové v signalizaci zahrnuje především otevírání a uzavírání průduchů v závislosti na působení vnějších stimulů jako je např. světlo, CO₂ a vlhkost. Často interaguje se signálními molekulami v procesu spojeném s obranou rostliny vůči působení biotického a abiotického stresu (Zhang 2014). Gen *AIK1* (*ABA-insensitive protein kinase 1*) kódující MAPKKK20 hraje důležitou roli v regulaci buněčného dělení, růstu buňky a uzavírání průduchů podmíněného kyselinou abscisovou. Tato MAP3K je pravděpodobně součástí kaskády AIK1-MKK5-MPK3/MPK6 (Obr. 6). Pozorování mutantních rostlin *aik1* ukázalo, že uzavírání průduchů není tak citlivé na působení ABA jako u kontrolních rostlin. Uzavírání průduchů bylo tudíž inhibováno a rostliny tak během působení stresu suchem ztratily mnohem více vody než kontrolní rostliny (Li *et al.*, 2017).



Obr. 6 Schéma MAPK kaskády aktivované osmotickým stresem u *Arabidopsis thaliana*. Osmotický stres vyvolává aktivaci signální dráhy AIK1-MKK5-MPK3/MPK6. MPK3 a MPK6 mohou být také fosforylovány MKK9 nebo MKK4.



Obr. 7 Vizualizace vývoje průduchů na abaxiální straně listu *Arabidopsis thaliana* u knock-out mutantů MAP kinas, které jsou součástí dráhy podílející se na tvorbě průduchů. Mutant *yda* (A), dvojitý mutant *mkk4mkk5* (B) a dvojitý mutant *mpk3mpk6* (C) vykazují nadměrné shluky průduchů, kde je porušeno pravidlo výskytu minimálně jedné epidermální buňky mezi jednotlivými průduchy (převzato z Wang *et al.*, 2007).

2.1.6.3 Role MPK3 při stresu těžkými kovy - kadmíem

Kadmium je toxický těžký kov, způsobující environmentální znečištění. Může způsobit mnoho toxických reakcí v rostlinách, např. inhibici růstu kořenů, poškození listů (Wojcik a Tuckendorf 1999; Nocito *et al.*, 2002), inhibici funkce průduchů, chřadnutí nebo smrt (Barcelo a Poschenrieder 1990). Kadmium způsobuje řadu biochemických změn včetně inhibice fotosyntézy (Nyitrai *et al.*, 2003) a modifikace v expresi genů (Herbette *et al.*, 2006; Sarry *et al.*, 2006). MPK3 a MPK6 z *Arabidopsis* jsou aktivovány při buněčné odpovědi na stres vyvolaný kadmíem díky akumulaci ROS, ale přesná funkce MAP kinas v buněčné odpovědi na stres těžkými kovy není známa (Liu *et al.*, 2010).

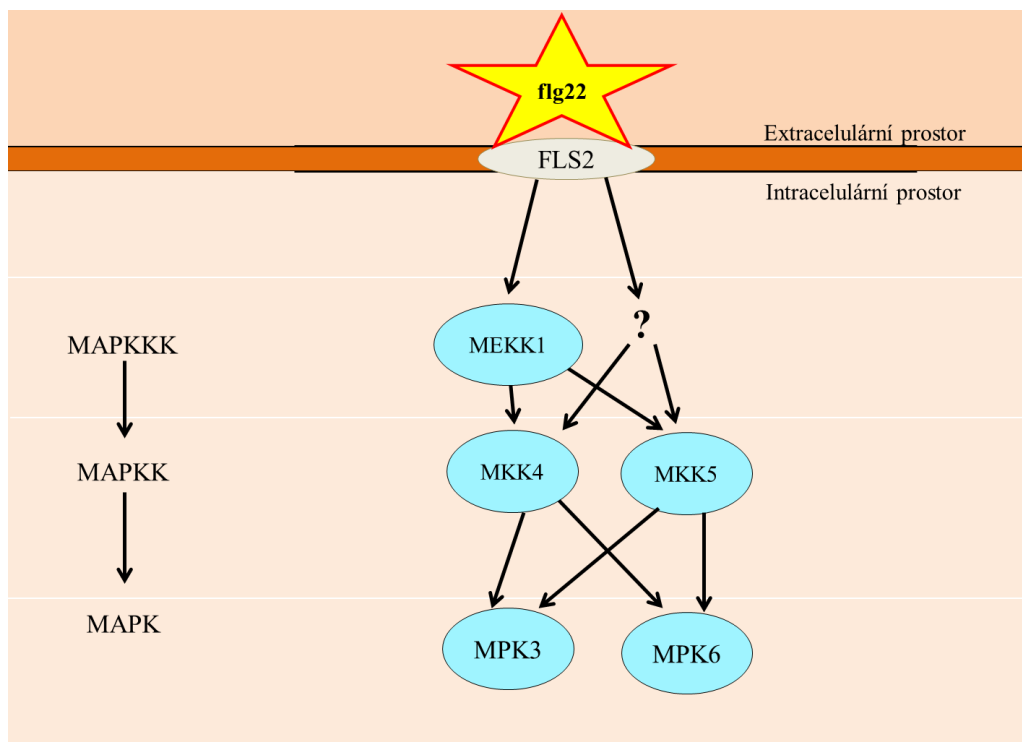
2.1.6.4 Role MPK3 při biotickém stresu

Velmi významnou roli při obraně rostliny hrají již zmiňované glukosinoláty (GS) a jejich deriváty, jejichž zvýšená hladina je indukována aktivitou MPK3 a MPK6. Tyto látky jsou esenciální pro obranu rostliny proti patogenům (Bednarek *et al.*, 2009; Clay *et al.*, 2009; Fan *et al.*, 2011; Stotz *et al.*, 2011). Bylo prokázáno, že látka sulforaphan (4-methylsulfynilbutyl isothiokyanát), přírodní produkt vzniklý z alifatického glukosinolátu (AGS), inhibuje růst bakterie rodu *Pseudomonas* u *Arabidopsis* (Fan *et al.*, 2011). Tento obranný mechanismus působí také při napadení rostliny plísní rodu

Botrytis, kde MAP kinasy indukují zvýšení hladiny indolových glukosinátů (IGS) (Xu *et al.*, 2016).

MPK3 a MPK6 se také účastní odpovědi na působení bakteriálního elicitoru flagellinu-22 (flg22), který se váže na receptor FLS2 (flagellin sensing 2) a z něj je signál dále přenášen pomocí již známé signální dráhy MEKK1-MKK4/MKK5-MPK3/MPK6 (Asai *et al.*, 2002) (Obr. 8). MPK3 a MPK6 jsou aktivovány pomocí flg22 i v nepřítomnosti MEKK1 kinasy (Obr. 8), což naznačuje, že této signální kaskády se mohou účastnit i jiné MAP3K (Ichimura *et al.*, 2006; Nakagami *et al.*, 2006; Suarez-Rodriguez *et al.*, 2007).

Jak již bylo řečeno, MPK3 a MPK6 také regulují biosyntézu etylenu (Clark *et al.*, 1998, Gao *et al.*, 2003, Yoo *et al.*, 2008) a kamalexinu (Ren *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2016). Během biosyntézy etylenu vzniká jako vedlejší produkt kyanovodík (Peiser *et al.*, 1984; Böttcher *et al.*, 2009), který se akumuluje v rostlinách vystavených stresu a účastní se různých biochemických procesů v rostlině. Jeho detoxifikací pomocí nitrilas vznikají aminokyseliny asparagin a asparát, a také amoniak. Kyanovodík má také zřejmě díky své cytotoxicitě schopnost inhibovat růst patogenů v rostlině a díky tomu hraje významnou roli v imunitní reakci rostlin (Xu *et al.*, 2016).



Obr. 8 Schéma MAPK kaskády aktivované biotickým stresem pomocí bakteriálního elcitoru flagellinu-22 (flg22) u *Arabidopsis thaliana*. Po vazbě flg-22 na receptor FLS2 je spuštěna signální dráha MEKK1-MKK4/MKK5-MPK3/MPK6. V nepřítomnosti MEKK1 mohou být ostatní MAP kinasy aktivovány i jinou MAP3K.

2.2 Modelový organismus *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana neboli huseníček rolní se využívá jako modelový organismus v molekulární genetice rostlin. Pro experimentální analýzy bylo sesbíráno mnoho různých ekotypů z přírodních stanovišť. Je vhodným modelovým organismem v mnoha ohledech. Jeho výhodou je rychlý růst v laboratorních podmínkách od klíčení až po dozrání semen, přičemž tento cyklus trvá přibližně šest týdnů. Rostliny *Arabidopsis* dosahují malého vzrůstu (do 25 cm). Květy dorůstají do velikosti 2 mm a jejich výhodou je samosprašnost, tzn., že po otevření květu je pyl přenesen přímo na povrch blizny. Proto je jejich pěstování v podmínkách *in vitro* a *in vivo* velmi vhodné. Listy jsou pokryty drobnými chloupky zvanými trichomy, které jsou vhodnými modely pro studium morfogeneze a diferenciaci buněk. Stonek a kořen mají pro studium fenotypu jednoduchou strukturu. Další výhodou je, že v jedné generaci je rostlina schopna vyprodukovat až několik set šesulí s více než 5000 semen (Meinke *et al.*, 1998).

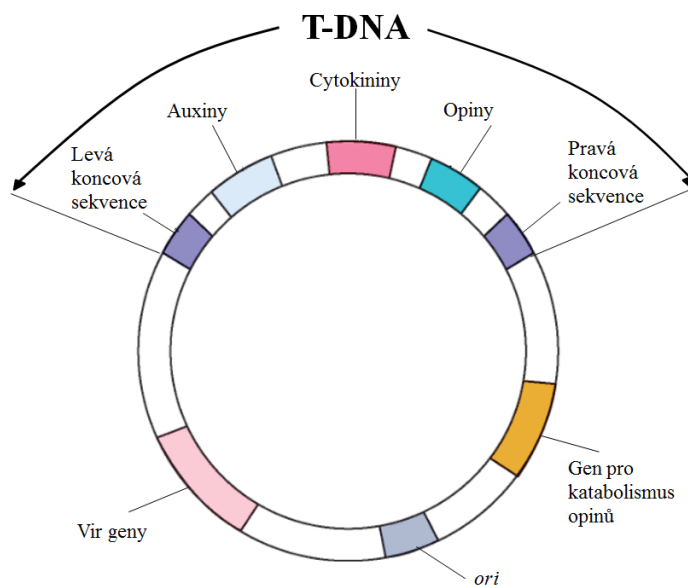
V roce 2000 byl dokončen projekt sekvenování genomu *Arabidopsis*. Výsledky tohoto projektu byly poté publikovány ve speciálním čísle časopisu Nature. Genom *Arabidopsis* je poměrně malý. DNA je tvořena přibližně 100-120 x 10⁶ bp, z toho asi 90% DNA kóduje proteiny (The Arabidopsis Initiative, 2000). Sekvenováním genomu *Arabidopsis thaliana* bylo identifikováno 20 genů kódujících MAPK, 10 genů kódujících MAP2K a přibližně 60 genů kódujících MAP3K, z čehož vyplývá, že mezi jednotlivými MAP kinasami existují vzájemné interakce (viz Obr. 5, Obr. 6 a Obr. 8). Například jedna MAP kinasa může být aktivována více nadřeznými MAP kinasami a sama může aktivovat více než jednu podřezanou MAP kinasu (Colcombet a Hirt, 2008; Rodriguez *et al.*, 2010)

2.3 Transformace rostlin *Arabidopsis thaliana* pomocí *Agrobacterium tumefaciens*

Mnoho mikrobů, které asociují s rostlinnými nebo živočišnými hostiteli koordinovaně regulují velké množství genů potřebných pro tyto asociace. Vyvolávají expresi genů v odpovědi hostitele a uvolňují různé chemické signály. Tato funkce je dobře známa například u bakterie *Agrobacterium tumefaciens*, která je schopna transformovat rostlinné buňky dvouděložných rostlin (Cho a Winans, 2005).

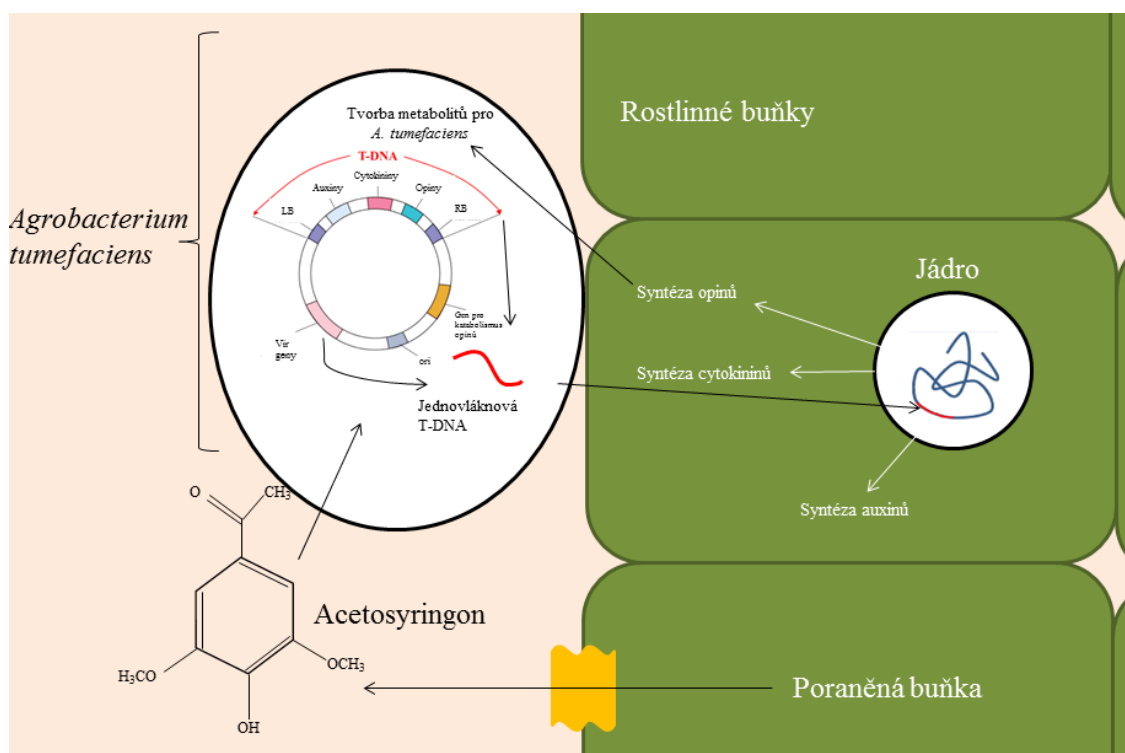
Gram-negativní půdní bakterie *Agrobacterium tumefaciens* je fytopatogen, který je schopen během svého životního cyklu geneticky transformovat buňky dvouděložných rostlin, nejlépe protoplasty a houbové spory (de Groot *et al.*, 1998). Tato genetická transformace je provázena tvorbou tumorů připomínajících korunu obklopující napadené místo (Crown gall tumor). Tumory zasahují do normálního růstu infikovaných rostlin. Hostitelské organismy jsou transformovány v náhodné pozici genomu obvykle v jedné kopii. Formace tumorů je následkem transferu, integrace a exprese genů specifické části bakteriální plasmidové DNA, zvaného T-DNA (transferred DNA), do genomu rostliny. T-DNA je částí Ti-plasmidu (tumor inducing-plasmid), který se nachází ve většině kmenů *A. tumefaciens*. Kmeny *A. tumefaciens*, které nenesou Ti-plasmid nejsou schopny geneticky transformovat hostitelské buňky (Glick *et al.*, 2010). Tento systém byl jako první použit k transformaci spor a mycelií hub rodu *Coccidioidis*, *Fusarium*, *Magnaporthe* a *Agaricus* (Abuodeh *et al.*, 2000; Mullins *et al.*, 2001; Rho *et al.*, 2001).

Základním krokem pro infekční proces je spojení *A. tumefaciens* s rostlinou v místě poranění, díky kterému rostlina produkuje fenolické látky (např. acetosyringon, hydroxyacetosyringon). Na tyto látky reaguje bakterie produkcí sítě celulosových vláken, která ji úzce spojí s povrchem rostlinných buněk a aktivací *Vir* genů. Do hostitelských buněk je tímto signálem transportována T-DNA nesená na Ti-plasmidu bakterie (Glick *et al.*, 2010). Nedílnou součástí Ti-plasmidu jsou geny kódující syntézu rostlinných hormonů (auxinů, cytokininů), které vedou k tvorbě tumorů. Další komponentou je gen pro syntézu opinů - látek ze kterých mohou být syntetizovány aminokyseliny, důležité jako zdroj energie, dusíku a uhlíku pro *Agrobacterium*. Tyto geny se nachází v oblasti T-DNA, která je ohraničena pravou a levou koncovou sekvencí (Nester, 2000) (Obr. 9). Mimo T-DNA je obvykle součástí Ti-plasmidu gen pro katabolismus opinů, které jsou po degradaci využívány bakterií jako zdroj energie, dále gen značící replikační počátek (*ori*) a geny virulence (*Vir* geny), jejichž aktivita je vyvolána funkcí malých fenolických molekul jako je již zmíněný acetosyringon (Mayer *et al.*, 1997) (Obr. 9). Na Ti-plasmidu se vyskytuje 30 *Vir* genů sjednocených do čtrnácti operonů (Cho a Winans, 2005).



Obr. 9 Ilustrační rozložení genů na Ti-plasmidu *A. tumefaciens*. Součástí Ti-plasmidu je T-DNA, která je ohraničena levou a pravou koncovou sekvencí. Nachází se zde geny pro syntézu auxinů, cytokininů a opinů. Na Ti-plasmidu je také přítomný počátek replikace (*ori*), *Vir* geny a geny pro katabolismus opinů (převzato a upraveno z emaze.com).

Funkce *Vir* genů je esenciální pro transport a začlenění T-DNA do genomu hostitelské rostliny (Cho a Winans, 2005). Virulentní geny *VirA* a *VirG* jsou aktivovány produkcí fenolických látek a aktivují proces náhodné inserce T-DNA do hostitelského genomu. Produkty *VirC* a *VirD* operonů vytváří jednovláknovou molekulu T-DNA, která je transportována *VirD2* komplexem do hostitelské cytoplasmy IV. sekrečním systémem (*VirB1-11* a *VirD4*). V hostitelské cytoplasmě je T-DNA translokována do jádra pomocí *VirD2* a *VirE2* a následně integrována do hostitelského genomu (Gelvin, 2000) (Obr. 10).



Obr. 10 Schéma ilustrující proces inserce T-DNA *A. tumefaciens* do genomu rostliny. Po poranění rostliny dochází k syntéze fenolických látek, jako je např. acetosyringon, jejichž přítomnost v bakterii vyvolává expresi *Vir* genů, které se účastní vyštěpení jednovláknové T-DNA a jejího přenosu do genomu rostlinné buňky. Po inserci T-DNA do genomu je aktivována exprese genů, jejichž produkty se podílejí na syntéze rostlinných hormonů (auxiny a cytokininy). Ty následně indukují tvorbu tumorů na rostlině.

Základem vektorů, které jsou konstruovány k úmyslné stabilní nebo transienční transformaci rostlin, je původní Ti-plasmid z *A. tumefaciens*, ze kterého byly odstraněny geny pro syntézu fytohormonů a opinů a místo nich byla mezi levou a pravou koncovou sekvencí vložena cizorodá DNA, která bude integrována do rostlinného genomu. Součástí této sekvence je také gen rezistence na antibiotikum nebo herbicid, pomocí něhož jsou následně transformované rostliny selektovány. Jako nejčastější selekční marker se používá gen rezistence na kanamycin (antibiotikum) nebo na fosfinotricin (herbicid). Jelikož Ti-plasmid je velmi rozsáhlý, většinou je jeho obsah rozdělen do tzv. binárních vektorů. Pomocný plasmid, zvaný velký, nese větší část Ti-plasmidu obsahující všechny geny potřebné pro infekci hostitelské rostliny a pro přenos T-DNA do genomu. Zatímco klonovací plasmid, zvaný malý, nese T-DNA s naklonovaným požadovaným úsekem genetické informace, dále jsou zde zahrnuty replikační počátky a potřebné geny rezistence jak pro bakterii, tak i pro transformovanou rostlinu (Pappas, 2008).

2.4 T-DNA inzerční mutant *Arabidopsis mpk3-4/2*

Stabilní transformací pomocí *A. tumefaciens* byly také připraveny mutantní rostliny *Arabidopsis mpk3-4/2* (SAIL_873_G05) s genem *MPK3* vyřazeným z činnosti (knock out mutant), které jsou předmětem studia této bakalářské práce. Mutant *mpk3-4/2* byl připraven transformací ekotypu Columbia (Col-0). Semena mutantu *mpk3-4/2* jsou součástí kolekce SAIL (The Syngenta Arabidopsis Insertion Library) získané přibližně ze 100 000 T-DNA mutantních rostlin *Arabidopsis*. Pro přípravu této mutantní linie byl použit binární vektor pDAP101 obsahující T-DNA o velikosti 4763 kb. Součástí T-DNA je také gen rezistence na fosfinotricin *bar*, který je využíván pro selekci mutantních rostlin. Přítomnost inzerce T-DNA byla ověřena pomocí modifikované metody TAIL-PCR (thermal asymmetric interlaced PCR), kdy byl amplifikován fragment lemující levou koncovou sekvencí T-DNA (tzv. flanking sekvence). Sekvence tohoto fragmentu byla následně porovnána s genomem *Arabidopsis* pro určení přesné pozice T-DNA v této mutantní linii (Sessions *et al.*, 2002). Inzerce T-DNA v mutantovi *mpk3-4/2* byla potvrzena v promotorové oblasti genu *MPK3*.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Použité přístroje

Analytické váhy (XA 110/2X, RADWAG)

Automatické pipety (Eppendorf)

Binokulární mikroskop + LAS V4-0 software (Leica M165FC)

Dokumentační zařízení Geldoc™ EZ systém

Dokumentační zařízení Chemidoc™ MP systém

Epifluorescenční mikroskop + ZEN (blue) software (Axio Imger M2, ZEISS)

Fytotron (Weiss Gallenkamp)

Horizontální agarosová elektroforéza (Bio-Rad)

Chlazená centrifuga (Beckman)

Laboratorní digestoř (M 1200, MERCI)

Magnetická míchačka (MSH-420, BOECO)

pH metr (PC 2700, Eutech Instruments)

Předvážky (S1502, BEL Eengineering)

Scanner + EPSONscan software

Thermocycler (MyCycler™ Personal Thermal Cycler Bio-Rad)

Třepačka (Labnet)

Vertikální elektroforéza denaturovaných proteinů SDS-PAGE (Bio-Rad)

3.1.2 Software pro zpracování výsledků

LAS V4-0 (Leica)

ZEN blue (ZEISS)

ImageJ (online)

ImageLab (Bio-rad)

3.1.3 Enzymy a chemikálie

Standardy pro elektroforézu

- GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (ThermoFisher scientific, USA)
- Protein dual colour (Bio-Rad, USA)

Použitá antibiotika

- fosfotricin (Duchefa, Nizozemí)

Protilátky použité pro Western blot

- Primární polyklonální protilátka anti-MPK3 (rabbit) (Sigma, USA)
- Sekundární protilátka anti-rabbit (goat) značená křenovou peroxidasou (HRP) (Novex™, USA)

Použité kity

- Phire Plant Direct PCR kit (Thermo Fisher Scientific, USA)

Další použité chemikálie

6x Gel Loading Dye (ThermoFisher scientific), agarosa (Sigma), akrylamid (BioRad), Bradfordovo činidlo (Serva, Německo), bromfenolová modř (Sigma), Coomassie Brilliant Blue R (Sigma), Diluční pufr (Thermo Fisher Scientific), EDTA (Sigma), ECL substrát (Clarity™ Western ELC Substrat, Bio-Rad), etanol 96%, etanol 70%, fluorid sodný (Sigma), glycerol (Sigma), glycin (Sigma), HEPES (Duchefa), hydroxid draselný (Sigma), chloralhydrát (Sigma), chlorid hořečnatý (Sigma), chlorid sodný (Sigma), inhibitory proteas a fosfatas - Complete™, DTT, Pefablock, PhoStop™ (Roche, Švýcarsko), kyselina octová (Sigma), β-merkaptioetanol (Sigma), Midori green DNA Staining Solution, metanol, Murashige-Skoog bez vitamínů (Duchefa), phytigel (Sigma), 2-propanol (Sigma), sacharosa (Sigma), SDS (Sigma), Tris (Sigma), Tween 20, (Sigma)

3.1.4 Složení médií a roztoků

Pevné ½ Murashige & Skoog medium bez vitamínů (1 l)

- 2,2 g Murashige-Skoog bez vitamínů
- 10 g sacharózy
- 0,8 % phytagelu

Doplněno dH₂O na konečný objem 1l, pH upraveno na 5,8 pomocí 1M KOH, sterilizováno autoklávováním.

50x TAE pufr pro agarosovou elektroforézu (1 l)

- 242 g Tris
- 57,1 ml ledové kyseliny octové
- 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)

Clearingový roztok (10 ml)

- 8 g chloralhydrátu rozpuštěno ve 3 ml dH₂O
- 1 ml glycerolu

3.1.4.1 Roztoky a media pro Western blot

4x vzorkovací Laemmli pufr (10 ml)

- 240 mM Tris-HCl, pH 6,8
- 4 ml glycerolu
- 0,8 g SDS
- 4 mg bromfenolové modři

Před použitím přidán 5 % β-merkaptoetanol

Extrakční pufr E (100 ml)

- 1,19 g 50mM HEPES, pH 7,5 (NaOH)
- 0,43 g NaCl
- 38 mg EGTA
- 100 μl 1M MgCl₂
- 4 mg NaF
- 10 ml 10% glycerolu

Sterilizováno pomocí filtru s velikostí pórů 22 μm

Před použitím doplněn inhibitory proteas a fosfatas (na 1 ml extrakčního pufru E)

- 1 µl 1M DTT
- 20 µl Pefablock
- 20 µl Complete™
- 100 µl PhoStop™

10x elektroodový pufr (1 l)

- 30 g Tris
- 144 g glycinu
- 10 g SDS

Transferový pufr (1 l)

- 24,2 g Tris
- 112,6 g glycinu

10x TBS pufr (1 l)

- 24 g Tris/HCl, pH 7,4-7,6
- 80 g NaCl

1x TBS-T pufr (1 l)

- 100 ml 10x TBS
- 1ml Tween 20

Doplněno dH₂O na konečný objem 1 l

Ponceau S (100 ml)

- 1 mg Ponceau S rozpuštěn v 5% kyselině octové

3.1.5 Rostlinný materiál

- *Arabidopsis thaliana*, ekotyp Columbia (Col-0)
- *Arabidopsis thaliana* – mutant *mpk3-4/2* s T-DNA inzercí v promotorové oblasti genu *MPK3* (SAIL_873_G05) (Sessions *et al.*, 2002)
- *Arabidopsis thaliana* – mutant *mpk3-1* s T-DNA inzercí v kódující sekvenci genu *MPK3* (SALK_151594) (Alonso *et al.*, 2003)

3.2 Metody

3.2.1 Povrchová sterilizace semen *Arabidopsis thaliana*

Povrchová sterilizace semen *A. thaliana* byla provedena ve sterilním boxu. Semena byla odsypána do 1,5 ml mikrozkuřavky a následně k nim byl napipetován 1 ml 70% etanolu. Inkubace probíhala 5 min za stálého třepání roztoku etanolu se semeny. Poté byla mikrozkuřavka krátce centrifugována a po usazení semen byl etanol odpipetován. Dále byl přidán 1 ml 96% etanolu. Semena byla třepána v etanolu po dobu 1 min. Poté byla mikrozkuřavka opět krátce centrifugována a etanol odpipetován. Semena byla následně dvakrát promyta v 1 ml sterilní destilované vody. Doba promývání byla 5 min. Mikrozkuřavka byla centrifugována a voda odpipetována. Nakonec byl přidán 1 ml sterilní destilované vody a pomocí špičky s širokým otvorem byla semena přepipetována na sterilní filtrační papír umístěný ve sterilní Petriho misce. Po vysušení filtračního papíru byla Petriho miska uzavřena pomocí parafilmu a uskladněna v lednici.

3.2.2 Výsev semen *Arabidopsis thaliana*

Semena *A. thaliana* byla ve sterilním boxu vyseta na ½ MS médium ve čtvercových Petriho miskách. Poté byly Petriho misky uzavřeny prodyšnou lepicí páskou a uloženy do lednice (4°C) přes noc kvůli procesu stratifikace. Následující den byly misky vertikálně vyloženy do kultivační komory (fytotronu) a kultivovány při teplotě 23°C v režimu dlouhého dne (16 hod světlo/8 hod tma).

3.2.3 Selektce T-DNA inzerčních mutantů *mpk3-4/2*

Semena kontrolních rostlin a mutantu *mpk3-4/2* byla vyseta na selekční ½ MS médium obsahující 50 µM fosfinotricin. Vzorky byly umístěny přes noc do lednice a následující den byly vyloženy do fytostronu (23°C, 16 hod světlo/8 hod tma).

3.2.4 Pozorování semen *Arabidopsis thaliana*

Semena Col-0 a *mpk3-4/2* byla po vysetí na ½ MS médium pozorována pod binokulárním mikroskopem a jednotlivé fotografie byly pořízeny prostřednictvím softwaru LAS V4-0 (Leica).

3.2.5 Pozorování semenáčků *Arabidopsis thaliana*

Semenáčky Col-0 a *mpk3-4/2* byly pozorovány 3. a 17. den po vyklíčení pod binokulárním mikroskopem a jednotlivé fotografie byly pořízeny prostřednictvím softwaru LAS V4-0 (Leica). Pozorování bylo zaměřeno na kořeny semenáčků, kořenové špičky a na trichomy.

3.2.6 Pozorování průduchů na kotyledonech *Arabidopsis thaliana* a měření jejich velikosti

11. den po vyklíčení byl rostlině odebrán 1 děložní lístek (kotyledon) pro pozorování průduchů. Odebrané kotyledony ze semenáčků Col-0 a *mpk3-4/2* byly ponořeny do roztoku etanolu a kyseliny octové v poměru 3:1. Roztok byl během dvou hodin několikrát vyměněn.

Kotyledon byl opatrně osušen a položen na podložní sklíčko s kapkou clearingového roztoku abaxiální (spodní) stranou nahoru. Připravené preparáty byly pozorovány na epifluorescenčním mikroskopu a vyhodnoceny pomocí software ZEN (blue).

3.2.7 Měření délky hlavního kořene semenáčků *Arabidopsis thaliana*

Semenáčky Col-0 a *mpk3-4/2* byly 7. den po vyklíčení naskenovány pomocí software EPSONscan a pomocí softwaru ImageJ byly změřeny délky hlavního kořene od kořenové špičky po hypokotyl. Výsledky měření byly dále zpracovány a vyneseny do grafu.

3.2.8 Genotypová analýza *mpk3-4/2* mutantů metodou PCR

Na genotypizaci byly použity rostliny Col-0 a *mpk3-4/2* 14. den po vyklíčení. Genotypizace byla provedena pomocí Phire Plant Direct PCR kitu.

Do 0,6 ml mikrozkušavky bylo napipetováno 20 μ l dilučního pufru. Z každé rostliny byl ustríhnut list, vložen do mikrozkušavky s tímto pufrem a ihned rozdrcen pomocí špičky. Mikrozkušavky s extrahovanou DNA byly umístěny na led po dobu 1 hod. Takto extrahovaná DNA byla použita jako templát při PCR.

Celkem byly připraveny dvě reakční směsi. První reakční směs pro amplifikaci genu *MPK3* obsahovala 5 μ l 2x Phire Plant PCR pufru obsahujícího nukleotidy, 0,5 μ M primeru LP, 0,5 μ M primeru RP (Tab. 1) a 0,5 μ l DNA templátu. Reakční směs byla doplněna deionizovanou vodou pro PCR na konečný objem 10 μ l a nakonec bylo přidáno 0,2 μ l Phire[®] Hot Start DNA polymerasy. Druhá reakční směs pro identifikaci přítomnosti T-DNA se lišila pouze kombinací primerů. Namísto primeru LP byl použit primer LB (Tab. 1).

Tab. 1 Sekvence primerů použitých na PCR

LP	5'-GCTTGATCTCACGAAGCGTAC-3'
RP	5'-ACGATAAAACCGGATTTACCG-3'
LB	5'-TAGCATCTGAATTCATAACCAATCTCGATACAC-3'

Jednotlivé cykly PCR reakce byly nastaveny podle Tab. 2.

Tab. 2 Podmínky pro nastavení PCR reakce

Krok cyklu	Fáze	Teplota	Čas	Počet opakování
1	Iničiační denaturace	98 °C	5 min	1
2	Denaturace	98 °C	5 s	40
3	Annealing	58 °C	5 s	
4	Elongace	72 °C	1 min	
5	Finální elongace	72 °C	1 min	1

3.2.9 Elektroforéza v agarosovém gelu

Amplifikace genu *MPK3* a T-DNA inzerce byla ověřena agarosovou elektroforézou s použitím 1% gelu. Před samotnou elektroforézou byly ke vzorkům přidány 2 μ l vzorkovacího pufru 6x DNA gel loading dye. Pro vizualizaci DNA bylo do 75 ml agarosového gelu přidáno 3,75 μ l netoxického barviva Midori Green DNA Staining Solution. Elektroforéza probíhala v 1x TAE pufru při konstantním napětí 100 V. Po 40 min byl výsledek elektroforézy vyhodnocen pomocí dokumentačního zařízení GeldocTM EZ systému a softwaru ImageLab (Bio-rad).

3.2.10 Izolace proteinů

14 dní staré semenáčky Col-0 a *mpk3-4/2* byly zmrazeny v tekutém dusíku a následně homogenizovány. Proteiny z rostlinného materiálu byly extrahovány pomocí extrakčního pufru E, do kterého byly těsně před použitím přidány inhibitory proteas a fosfatas (kapitola 3.1.4.1 Roztoky a média pro western blot). Množství homogenizovaného materiálu bylo zváženo na analytických vahách a ke každému vzorku byl napipetován extrakční pufr v poměru 1ml:1g (např.: k 0,2231g vzorku bylo přidáno 221,3 μ l pufru). Vzorky byly centrifugovány při 10 000g, 10 min, 4°C a získaný supernatant byl odpipetován do čisté mikrozkušavky. Koncentrace proteinů byla stanovena spektrofotometricky při vlnové délce 595nm s použitím Bradfordova činidla.

3.2.11 Denaturující polyakrylamidová elektroforéza (SDS-PAGE)

Jednotlivé vzorky byly naředěny na koncentraci 1mg/ml a ke každému vzorku byl přidán 4x vzorkovací Laemmli pufr s 5% β -merkaptoetanolem. Vzorky byly následně denaturovány 10 min při teplotě 95°C.

Pro denaturující polyakrylamidovou elektroforézu (SDS-PAGE) byl připraven dělicí gel (Tab. 3), který byl napipetován mezi dělicí skla přibližně 2,5 cm od vrchní hrany a převrstven 2-propanolem. Po ztuhnutí gelu byl 2-propanol odstraněn, prostor byl

propláchnutý destilovanou vodou a vysušený filtračním papírem. Poté byl připraven zaostřovací gel (Tab. 3) a napipetován na povrch dělicího gelu. Do gelu byl vložen hřebínek, který byl po ztuhnutí odstraněn.

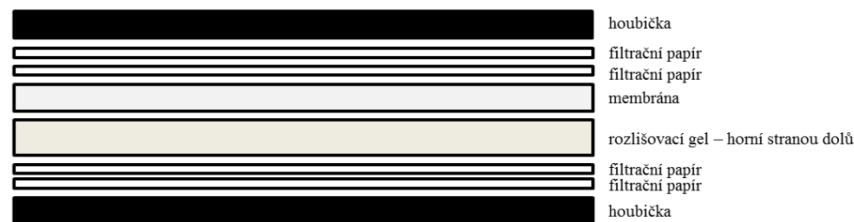
Tab. 3 Složení gelů pro SDS-PAGE

Dělicí gel (5 ml)		Zaostřovací gel (2 ml)	
10%	Objem [ml]	10%	Objem [ml]
dH ₂ O	2,425	dH ₂ O	1,272
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	1,250	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	0,504
40% akrylamid	1,250	40% akrylamid	0,200
10% SDS	0,050	10% SDS	0,020
TEMED	0,0025	TEMED	0,002
APS 10% (4 mg/ 40 μl)	0,025	APS 10% (4 mg/ 40 μl)	0,010

Připravený polyakrylamidový gel byl vložen do elektroforetického aparátu a elektroforetické vany, která byla stejně jako vnitřní cela naplněna 1x elektrolytickým pufrům. Do první jamky bylo napipetováno 5 μl proteinového standardu (Protein dual colour) a do každé následující jamky bylo nanášeno 15 μl proteinového vzorku. SDS-PAGE elektroforéza probíhala při 180V 45 minut.

3.2.11.1 Western blot

Pro Western blot byla použita PVDF membrána, která byla aktivovaná v metanolu (přibližně 10 s). Membrána a polyakrylamidový gel byly poté inkubovány v 1x transferovém pufru po dobu 10 min. Následně byla pro přenos proteinů na membránu připravena komůrka podle Obr. 11. Komůrka byla vložena do vany a zalita 1x transferovým pufrům. Přenos proteinů na membránu probíhal nejprve 10 min při 100V, následně bylo elektrické napětí sníženo na 16V a přenos probíhal přes noc.



Obr. 11 Uspořádání komůrky pro přenos proteinů na PVDF membránu.

Úspěšnost přenosu byla ověřena barvením membrány pomocí barviva Ponceau S. Snímek obarvené membrány byl pořízen pomocí ChemidocTM MP systém a programu ImageLab. Membrána byla následně několikrát promyta roztokem 1x TBS-T až do úplného vymytí barviva.

Poté byla membrána blokována pomocí 5% BSA a 5% sušeného mléka v 1x TBS-T. Blokování probíhalo 1 hod při pokojové teplotě. Následně byla membrána krátce promyta v 1x TBS-T. Pro inkubaci s primární protilátkou byl připraven roztok 4 % BSA v 1x TBS-T, do kterého byla přidána protilátka rabbit anti-MPK3 v poměru 1:5000. Inkubace s primární protilátkou probíhala opět 1 hod při pokojové teplotě.

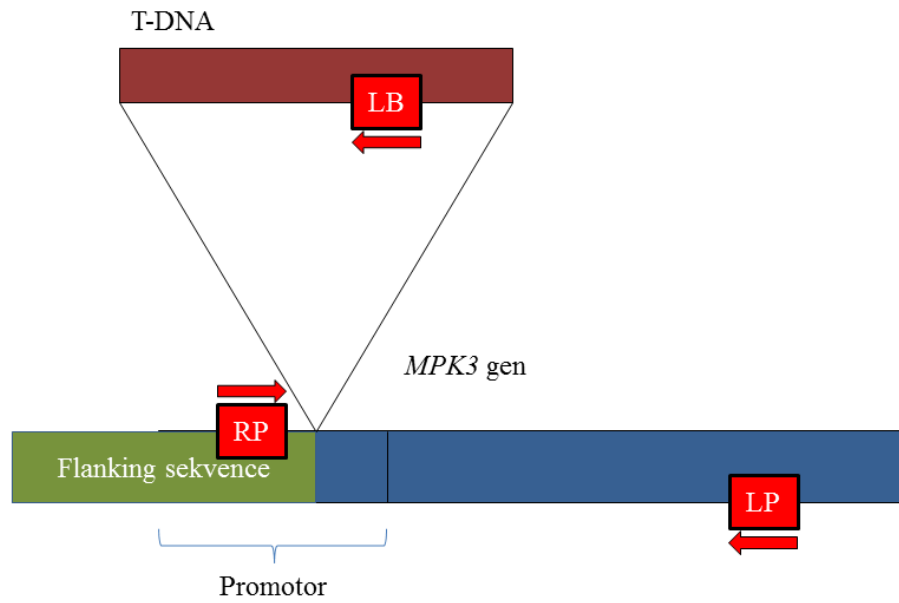
Následovalo promytí membrány 6 x 10 min v 1x TBS-T. Nakonec byla membrána inkubována se sekundární protilátkou goat anti-rabbit konjugovanou s křenovou peroxidasou (HPR). Sekundární protilátka byla ředěna v roztoku 1% BSA-TBS-T v poměru 1:5000. Po inkubaci se sekundární protilátkou, která trvala 1 hod při pokojové teplotě, následovalo opět promytí membrány v 1x TBS-T, 6 x 10 min. Detekce membrány byla zprostředkována pomocí reakce křenové peroxidasy s chemiluminescenčním substrátem (ECL, inkubace 1 min). Chemiluminescenční signál byl získán pomocí dokumentačního zařízení ChemidocTM MP systém a programu ImageLab.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Experimentální část této bakalářské práce byla zaměřena na genotypizaci T-DNA inzerčního mutanta *Arabidopsis mpk3-4-2*. Dále byl studován fenotyp kořenové a nadzemní části, který byl porovnáván s fenotypem kontrolních rostlin Col-0, a také s fenotypem jiného inzerčního mutanta *mpk3-1* (SALK_151594) s T-DNA inzertovanou v kódující oblasti genu *MPK3* (Alonso *et al.*, 2003). U mutanta *mpk3-1* byl již dříve zaznamenán odlišný fenotyp v porovnání s kontrolními rostlinami. U kořene byla pozorována kratší délka hlavního kořene, a také byla naměřena kratší vzdálenost mezi kořenovou špičkou a prvními viditelnými kořenovými vlásky. Nadzemní část rostliny byla robustnější než nadzemní část kontrolních rostlin. Abaxiální strana děložních lístků obsahovala menší počet průduchů, které však měly větší velikost. Také byly pozorovány četněji se větvcí trichomy. V neposlední řadě měla semena mutanta *mpk3-1* jednoznačně větší velikost, než semena kontrolních rostlin (Smékalová, 2014a). Z tohoto důvodu bylo studium fenotypu mutanta *mpk3-4/2* zaměřeno na hodnocení stejných parametrů. Výsledky tak měly sloužit pro potvrzení toho, že mutace dvou alel genu *MPK3* způsobuje stejnou změnu fenotypu, což by potvrdilo, že *MPK3* hraje důležitou roli při vývoji *Arabidopsis*, konkrétně při vývoji kořene a kořenových vlásků, při vývoji průduchů a trichomů a také při embryogenezi.

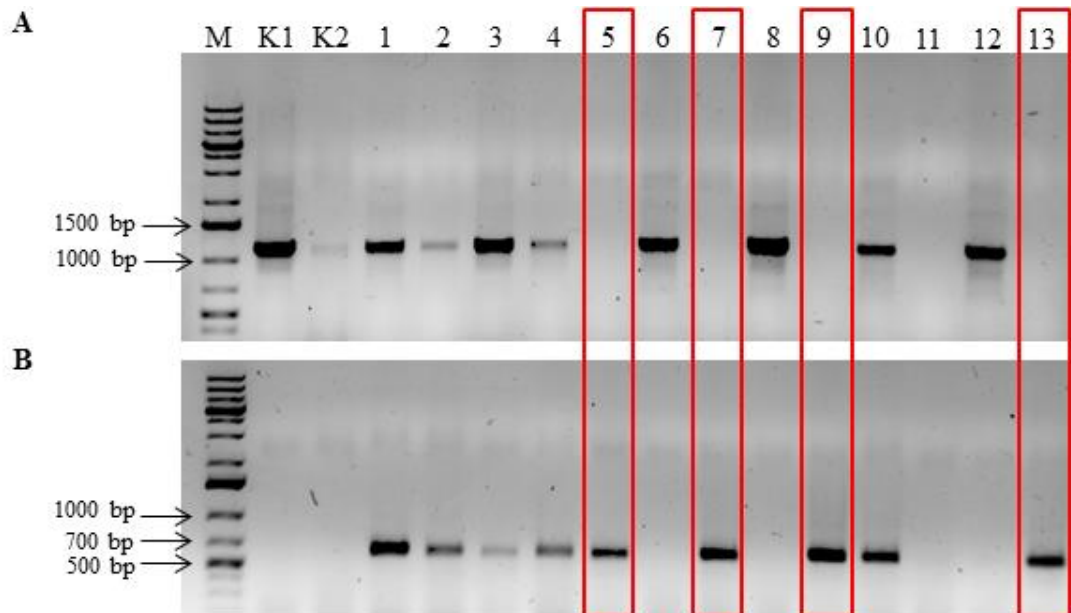
4.1 Genotypizace mutantních rostlin *mpk3-4/2* generace T1

Semena *mpk3-4/2* v generaci T1 a semena Col-0 byla vyseta na Petriho misky obsahující ½ MS médium. Po dvou týdnech od vyklíčení byla u semenáčků provedena genotypizace pomocí PCR pro zjištění homozygotních rostlin. Primery označeny jako left primer (LP), right primer (RP) a left border (LB) byly navrženy pomocí programu T-DNA primer design (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>) tak, aby byl amplifikován jednak úsek nemutovaného genu *MPK3* (kombinace primerů LP+RP), ale také úsek obsahující T-DNA inzerci (kombinace primerů RP+LB), která se u mutanta *mpk3-4/2* nachází v oblasti promotoru (Obr. 12). Díky použití dvou kombinací těchto primerů může být jednoduše rozlišena kontrolní, heterozygotní a homozygotní rostlina.



Obr. 12 Schéma inzerce T-DNA nacházející se v promotorové oblasti genu *MPK3*. T-DNA je lemována tzv. flanking sekvencí, pomocí níž byla identifikována poloha T-DNA v genu *MPK3*. Podle známých sekvencí genu a T-DNA byly navrženy primery, pomocí kterých jsou genotypovány homozygotní jedinci (RP, LB a LP).

Kombinace primerů LP a RP poskytuje PCR produkt o velikosti 1160 bp a kombinace primerů RP a LB poskytuje PCR produkt v rozmezí velikostí 491-791 bp. Toto rozmezí je dáno rozdílem skutečného místa inserce a pozice lemující sekvence, který obvykle bývá 0-300 bp. Na základě výsledku PCR, který byl vizualizován pomocí agarózové elektroforézy, byly vybrány čtyři homozygotní rostliny označeny jako 5, 7, 9 a 13. U těchto rostlin byl amplifikován pouze úsek s inzertovanou DNA o velikosti 491-791 bp (Obr. 13). Vybrané homozygotní rostliny byly následně přesazeny do půdy, kde byly ponechány až do dozrání semen generace T2, která byla použita pro další experimenty.

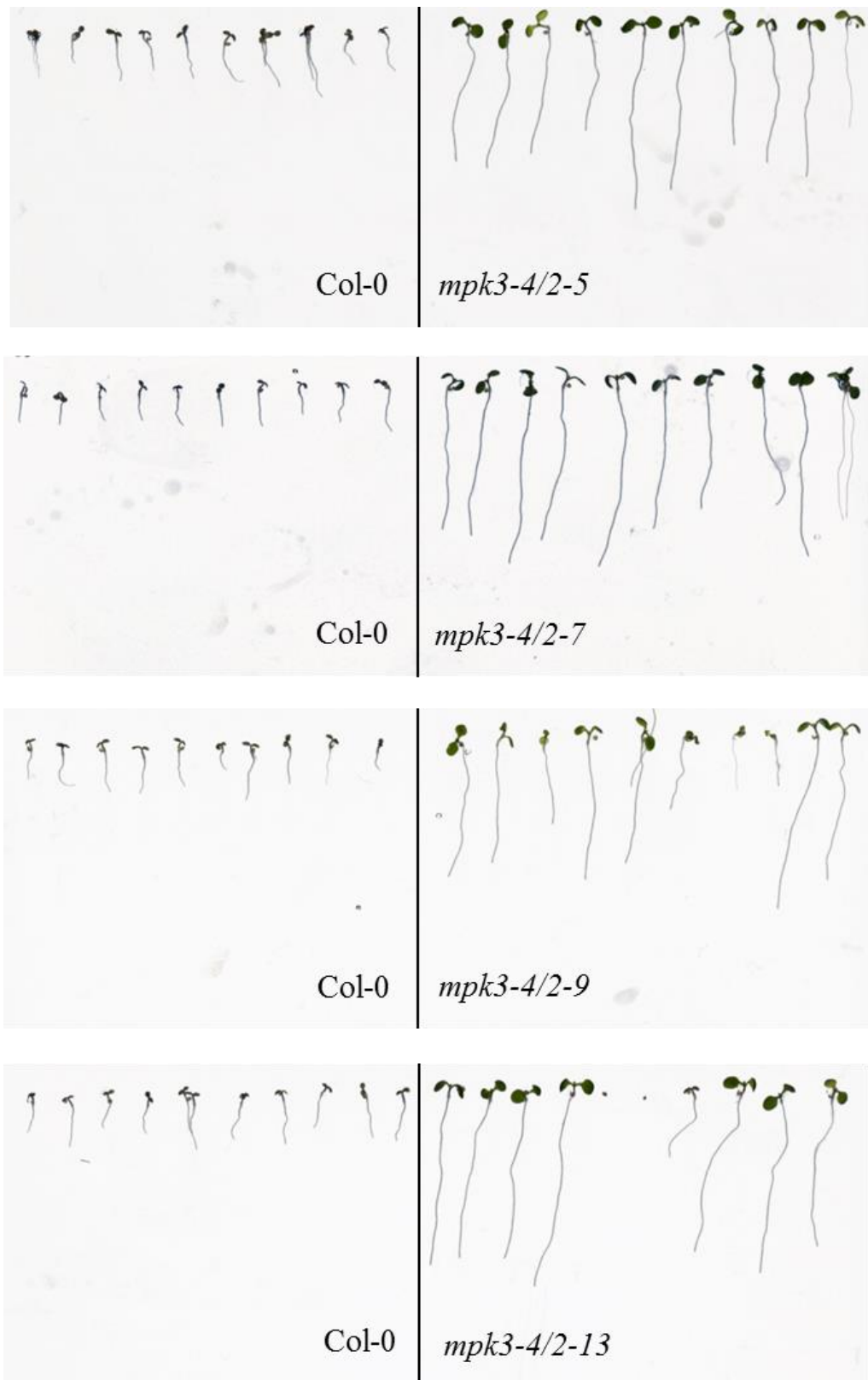


Obr. 13 Genotypizace mutantních rostlin *Arabidopsis thaliana mpk3-4/2* generace T1. **A** kombinace primerů LP+RP, **B** kombinace primerů RP+LB. M – marker (1 kb); K1, K2 – kontrolní rostliny Col-0; 1 – 13 mutantní rostliny *mpk3-4/2*. Homozygotní rostliny jsou vyznačeny červenými rámečky. Velikost produktu RP+LP 1160 bp, RP+LB 491-791 bp.

4.2 Ověření přítomnosti selekčního markeru

Jelikož T-DNA, která byla použita na přípravu mutantních linií, obsahuje gen rezistence na herbicid fosfinotricin (*bar*), bylo nutné ověřit jeho přítomnost v rostlinách *mpk3-4/2* v generaci T2.

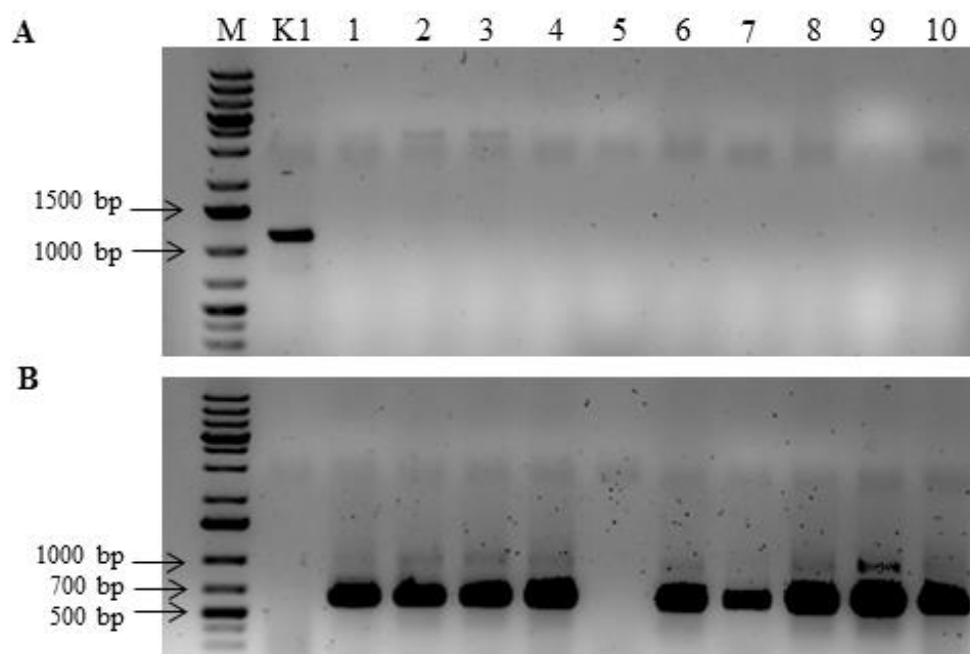
Semena vyselektovaných homozygotních linií (*mpk3-4/2-5*, *mpk3-4/2-7*, *mpk3-4/2-9* a *mpk3-4/2-13*) a semena Col-0 byla vyseta na Petriho misku s ½ MS médiem obsahující 50 µM fosfinotricin. Týden po vyklíčení semen byly Petriho misky se semenáčky *Arabidopsis* skenovány. Na první pohled bylo zřejmé, že semenáčky mutantních linií skutečně obsahují selekční marker, jelikož byly rezistentní k herbicidu přítomnému v kultivačním médiu. Naproti tomu kontrolní semenáčky měly mnohem menší vzrůst a byla u nich také patrná přítomnost antokyanů, což svědčí o tom, že byly pod vlivem stresu (Obr. 14).



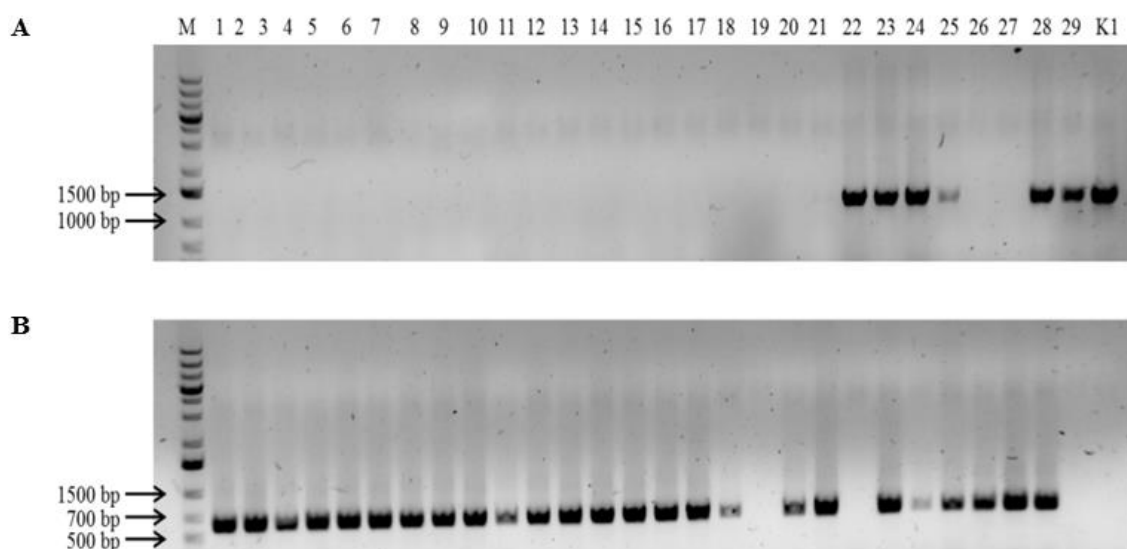
Obr. 14 Ověření přítomnosti genu rezistence na fosfinitricin (*bar*) u 7 dní starých mutantních rostlin *mpk3-4/2* pomocí selekčního média s obsahem 50 μ M fosfinitricinu. Mutantní rostliny jsou narozdíl od kontrolních rostlin rezistentní k herbicidu, což potvrzuje přítomnost selekčního markeru.

4.3 Genotypizace mutantních rostlin *mpk3-4/2* generace T2

Semenáčky mutanta *mpk3-4/2* byly dále použity pro studium fenotypu, proto bylo nutné ověřit, zda se skutečně jedná o homozygoty. Genotypizace pomocí PCR byla provedena stejným způsobem jako genotypizace mutantních rostlin v generaci T1 (kapitola 4.1). PCR byla opět vyhodnocena pomocí agarózové elektroforézy a bylo tak ověřeno, že všechny testované rostliny z linií *mpk3-4/2-5*, *mpk3-4/2-7* a *mpk3-4/2-9* jsou homozygotní (Obr. 15 a 16). Pouze u mutantní linie *mpk3-4/2-13* bylo nalezeno několik heterozygotních rostlin a také rostliny mající stejný profil jako rostliny kontrolní (Obr. 16).



Obr. 15 Genotypizace mutantních rostlin *Arabidopsis thaliana mpk3-4/2-5* generace T2. Všechny testované rostliny, kromě rostliny č. 5, kde se nezdařila PCR reakce, jsou homozygotní. **A** kombinace primerů LP+RP, **B** kombinace primerů RP+LB. M – marker (1 kb); K1 – kontrolní rostlina Col-0; 1 – 10 mutantní rostliny *mpk3-4/2-5*. Velikost produktu RP+LP 1160 bp, RP+LB 491-791 bp.

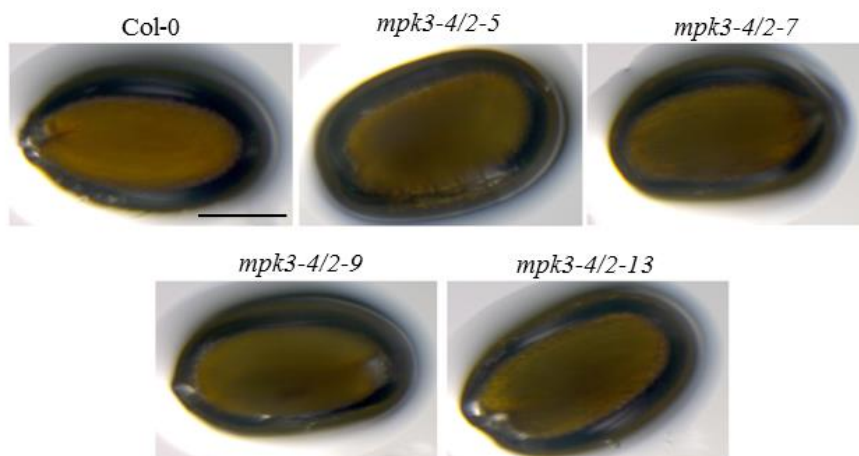
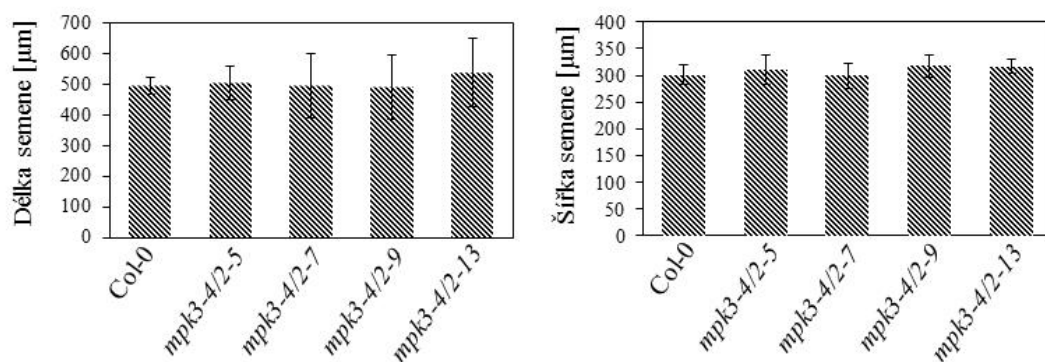


Obr. 16 Genotypizace mutantních rostlin *Arabidopsis thaliana mpk3-4/2* generace T2. Všechny testované rostliny *mpk3-4/2-7* (1-10) a *mpk3-4/2-9* (11-20), kromě rostliny č. 19, kde se nezdařila PCR reakce, jsou homozygotní. U linie *mpk3-4/2-13* (21-29) jsou homozygotní rostliny č. 26 a 27, rostliny č. 23, 24, 25 a 28 jsou heterozygotní a rostliny č. 22 a 29 neobsahují T-DNA inzerci a jsou shodné s kontrolním vzorkem. **A** kombinace primerů LP+RP, **B** kombinace primerů RP+LB. M – marker (1 kb); 1-29 – mutantní rostliny *mpk3-4/2*; K1 – kontrolní rostlina Col-0. Velikost produktu RP+LP 1160 bp, RP+LB 491-791 bp.

4.4 Studium fenotypu mutantu *mpk3-4/2*

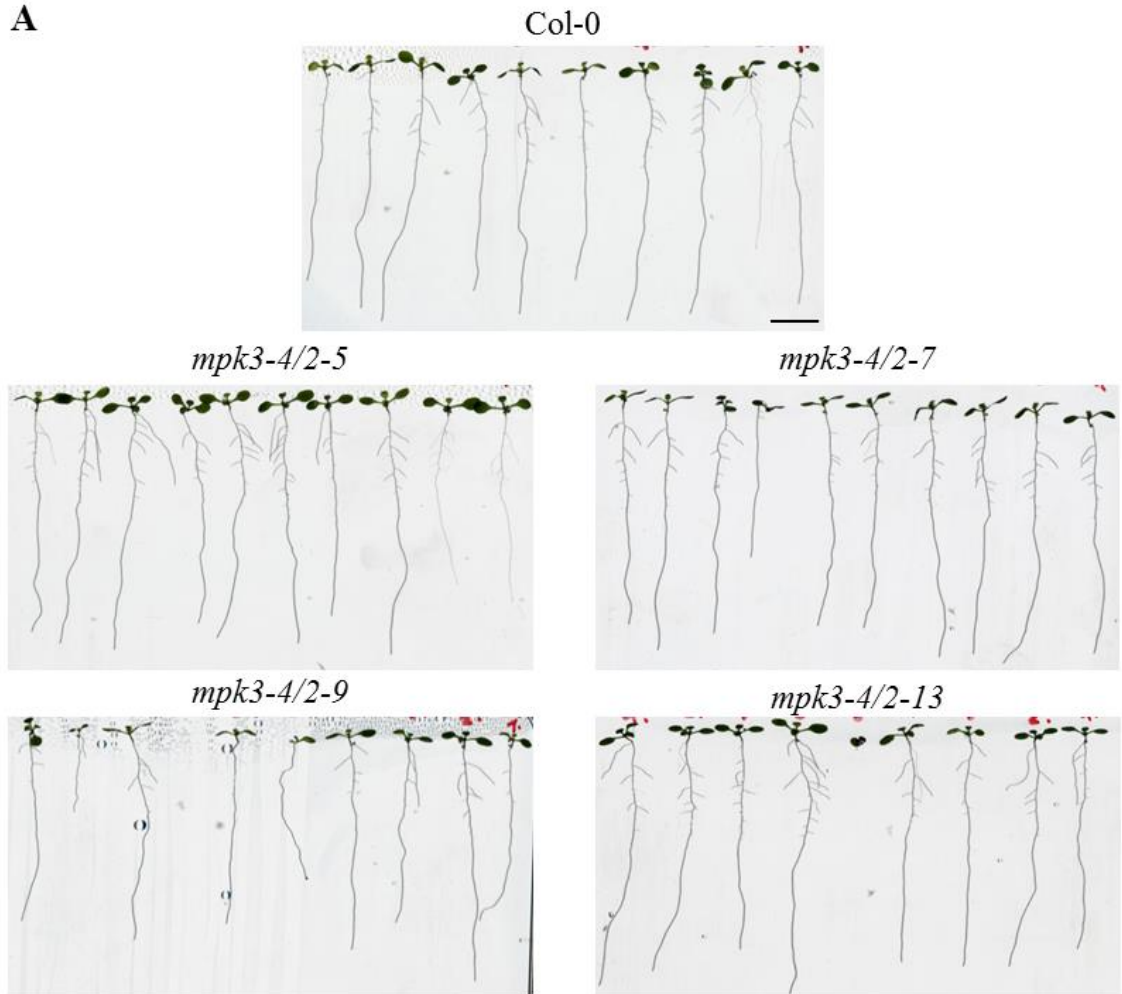
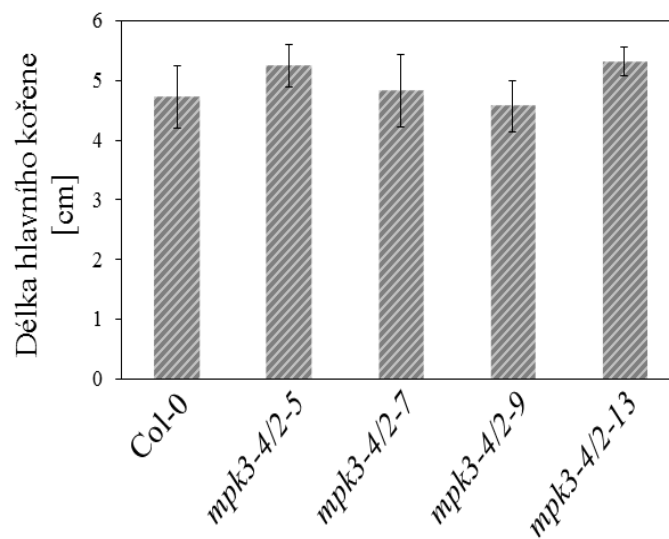
Studium fenotypu mutantu *mpk3-4/2* bylo zaměřeno na kořenovou a nadzemní část a na semena. Jak již bylo řečeno, bylo očekáváno, že fenotyp tohoto mutantu bude porovnatelný s fenotypem mutantu *mpk3-1*, kde byly pozorovány jisté rozdíly mezi mutantními a kontrolními rostlinami (Smékalová, 2014a). Studium fenotypu mutantu *mpk3-4/2* zahrnovalo měření velikosti semen, měření délky hlavního kořene, měření vzdálenosti od kořenové špičky k prvním viditelným kořenovým vláskům, pozorování průduchů a měření jejich velikosti a pozorování trichomů. Byly studovány semenáčky generace T2 vybraných homozygotních linií *mpk3-4/2-5*, *mpk3-4/2-7*, *mpk3-4/2-9* a *mpk3-4/2-13*, které byly vždy porovnávány se stejně starými semenáčky Col-0.

Velikost semen byla měřena po vysetí semen na ½ MS médium a jejich následné dokumentaci pomocí stereomikroskopu. Vždy byla měřena délka a šířka 10 semen, z naměřených hodnot byly vypočítány průměry, jejichž hodnoty byly vyneseny do grafu. Bylo očekáváno, že semena budou větší, tak jak je tomu v případě mutantu *mpk3-1* (nepublikovaná data). Nicméně semena měla velmi podobnou velikost jako semena Col-0 (Obr. 17).

A**B**

Obr. 17 Semena mutantních rostlin *Arabidopsis thaliana mpk3-4/2*. **A** U mutantních semen nebyly pozorovány významné rozdíly ve velikosti v porovnání se semeny Col-0. **B** Grafy vyjadřující délku a šířku semene. Chybové úsečky reprezentují SD, $n=10$. Měřítka: 200 μm .

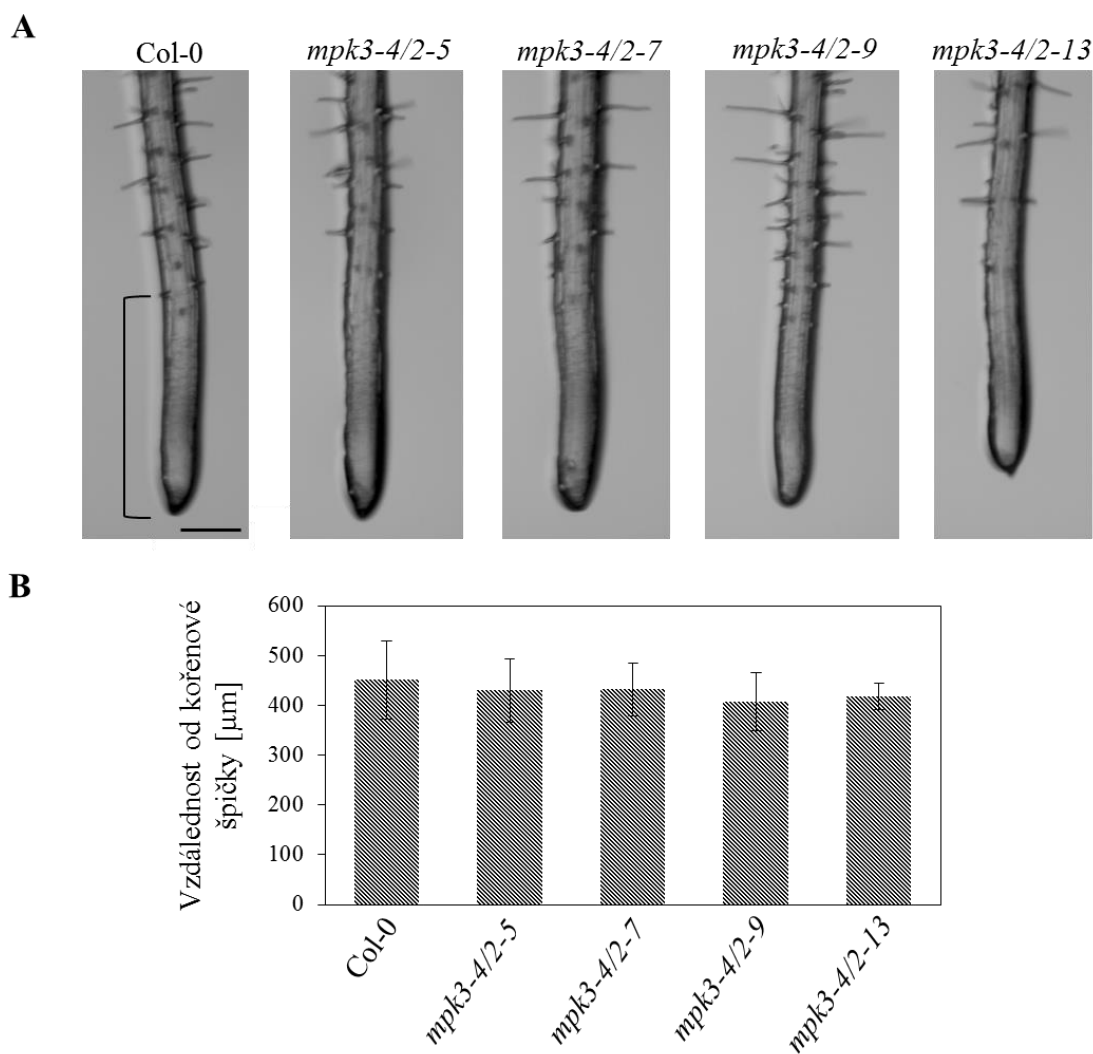
Dále byla měřena délka hlavního kořene mutantních linií *mpk3-4/2* u 7 dní starých semenáčků. Jelikož bylo pozorováno, že kořen *mpk3-1* je kratší (Smékalová, 2014a), očekávalo se, že i kořen linií *mpk3-4/2* bude mít kratší vzdálenost. Tento předpoklad se však nepotvrdil, jelikož délka hlavního kořene mutantních linií *mpk3-4/2-5*, *mpk3-4/2-7*, *mpk3-4/2-9* a *mpk3-4/2-13* byla víceméně stejná jako délka semenáčků Col-0 (Obr. 18).

A**B**

Obr. 18 Sedm dní staré semenáčky mutantních rostlin *Arabidopsis thaliana* *mpk3-4/2*.

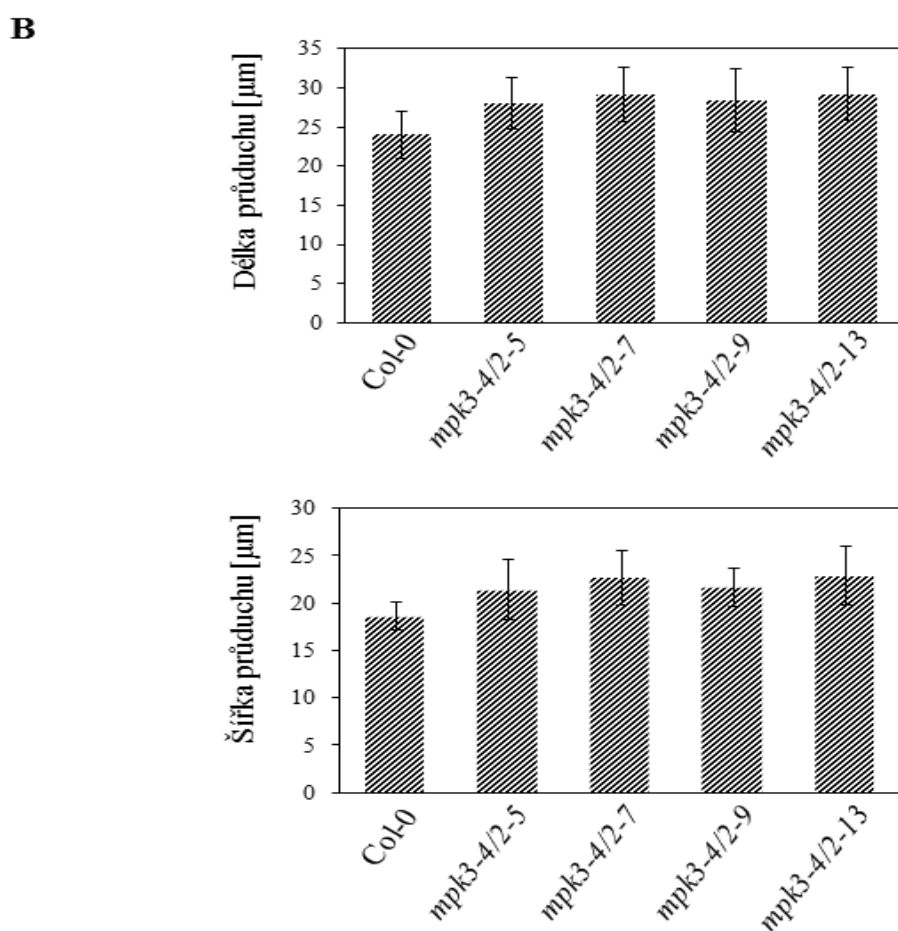
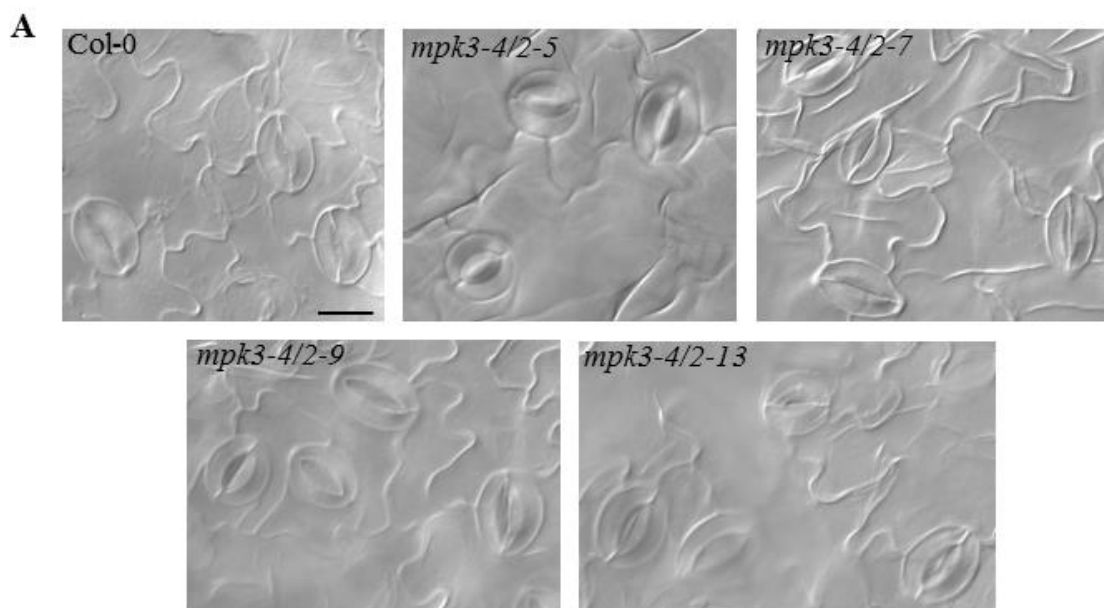
A U mutantních semenáčků nebyly pozorovány významné rozdíly v délce hlavního kořene v porovnání se semenáčky Col-0. **B** Graf vyjadřující délku hlavního kořene. Chybové úsečky reprezentují SD, $n=10$ (Col-0, *mpk3-4/2-5*, *mpk3-4/2-7*), $n=8$ (*mpk3-4/2-9*, *mpk3-4/2-13*). Měřítka: 1 cm.

Do studia fenotypu mutanta *mpk3-4/2* bylo také zahrnuto měření vzdálenosti od kořenové špičky po první viditelné kořenové vlásce u 3 dny starých semenáčků, jelikož tato vzdálenost je kratší u mutanta *mpk3-1* (Smékalová, 2014a). Výsledky naměřených hodnot však neprokázaly signifikantní rozdíly mezi mutantními a kontrolními liniemi (Obr. 19), proto se ani tento předpoklad nepotvrdil.



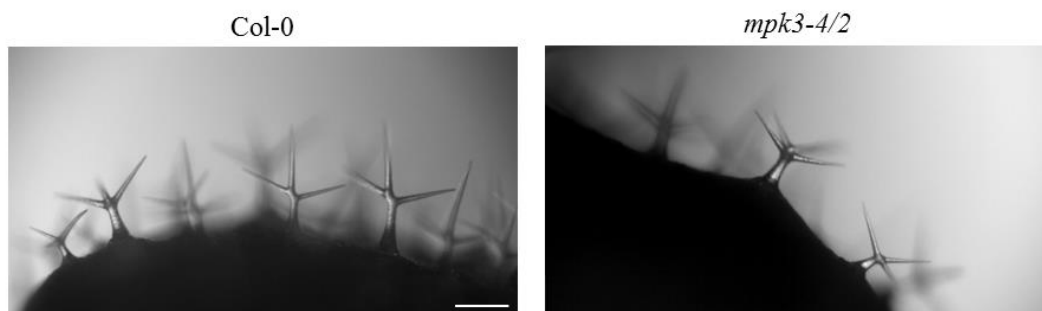
Obr. 19 Fenotyp kořenové části semenáčků *Arabidopsis thaliana mpk3-4/2* třetí den po vyklíčení. **A** Svorkou označena vzdálenost od kořenové špičky po první viditelné kořenové vlásce u kontrolního semenáčku Col-0 a u mutantních semenáčků *mpk3-4/2-5*, *mpk3-4/2-7*, *mpk3-4/2-9* a *mpk3-4/2-13*. **B** Graf vyjadřující průměrnou vzdálenost od kořenové špičky. Chybové úsečky reprezentují SD, $n=10$. Měřítka: 200µm.

Dalším parametrem, který byl analyzován, byly průduchy na děložních lístcích (kotyledonech) 11 dní starých semenáčků *mpk3-4/2*. Z děložních lístků byl extrahován chlorofyl, a poté byl připraven mikroskopický preparát za použití clearingového roztoku pro projasnění preparátu. Protože u mutanta *mpk3-1* byly pozorovány průduchy větší velikosti (nepublikovaná data), byly očekávány stejné výsledky u mutanta *mpk3-4/2*. Při srovnání velikosti průduchů u kontrolních a mutantních rostlin bylo zjištěno, že velikost průduchů u mutantních linií *mpk3-4/2-5*, *mpk3-4/2-7*, *mpk3-4/2-9* a *mpk3-4/2-13* je sice větší, ale naměřené hodnoty nejsou statisticky významné (Obr. 20).



Obr. 20 Fenotyp průduchů na kotyledonech u 11 dní starých rostlin *Arabidopsis thaliana mpk3-4/2*. **A** Vizualizace průduchů u Col-0 a linií *mpk3-4/2-5*, *mpk3-4/2-7*, *mpk3-4/2-9* a *mpk3-4/2-13*. **B** Grafy znázorňující průměrnou délku a šířku průduchu. Chybové úsečky reprezentují SD, $n=20$. Měřítko: 20μm.

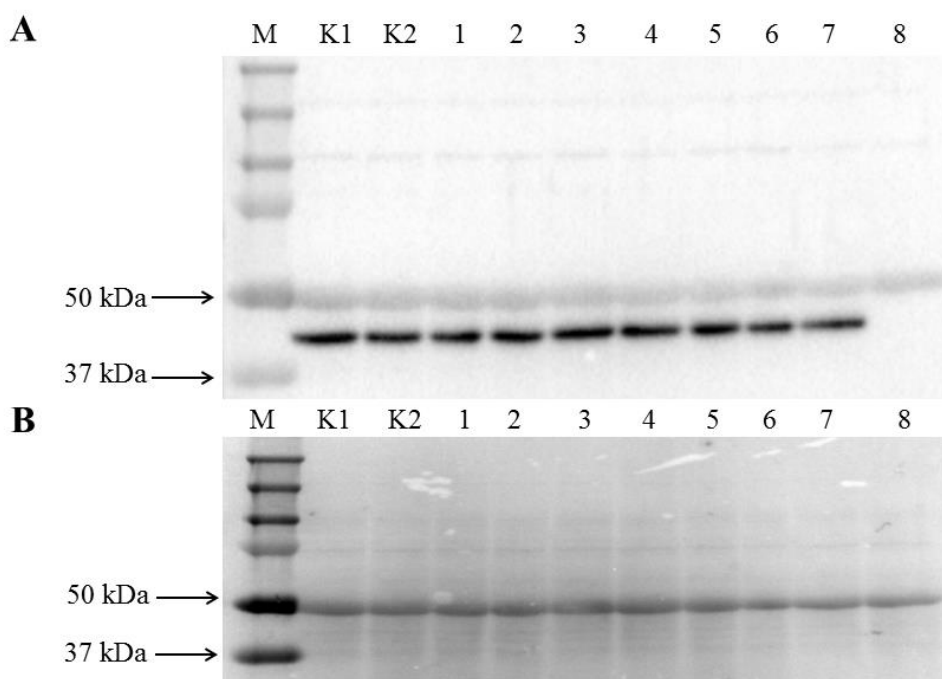
Posledním fenotypovým znakem, který byl studován u mutantu *mpk3-4/2*, byly trichomy. U kontrolních rostlin jsou trichomy vždy dvakrát rozvětveny, ale například u mutantu *mpk3-1* bylo pozorováno i více větvení (nepublikovaná data). Trichomy byly vždy pozorovány na třetím pravém listu 17. denních rostlin. Více rozvětvené trichomy byly na listech mutantních rostlin *mpk3-4/2* pozorovány, avšak ve velmi malém zastoupení (Obr. 21). Nelze tedy říct, že by se jednalo o jednoznačný výsledek.



Obr. 21 Větvení trichomů na třetím pravém listu 17 denních kontrolních rostlin Col-0 a mutantních rostlin *mpk3-4/2*. Byly pozorovány převážně dvakrát větvené trichomy. Měřítko: 200 μm .

4.5 Ověření přítomnosti proteinu MPK3 v mutantních rostlinách *mpk3-4/2* pomocí metody Western blot

Jelikož fenotyp mutantu *mpk3-4/2* nevykazoval stejné znaky jako již zmiňovaný fenotyp mutantu *mpk3-1*, bylo nutné ověřit, že protein MPK3 není u tohoto mutantu skutečně přítomen. Proto byly ze 14 dní starých rostlin Col-0, *mpk3-4/2* (*mpk3-4/2-5*, *mpk3-4/2-7*, *mpk3-4/2-9* a *mpk3-4/2-13*) a *mpk3-1* extrahovány proteiny. Každý vzorek byl vždy připraven ze 3 semenáčků, kromě vzorku pro *mpk3-4/2-13*, který byl připraven pouze ze 2 semenáčků. Proteinové vzorky byly separovány SDS-PAGE elektroforézou a přeneseny na PVDF membránu. Membrána byla poté inkubována s primární protilátkou proti MPK3 a nakonec byl díky sekundární protilátce konjugované s křenovou peroxidasou získán chemiluminiscenční signál. Pomocí této metody bylo zjištěno, že ve všech liniích T-DNA inzerčního mutantu *mpk3-4/2* je protein MPK3 přítomen na rozdíl od mutantu *mpk3-1*, kde protein detekován nebyl (Obr. 22). Kromě bandu odpovídajícímu velikosti MPK3 (42 kDa) byl na membráně také patrný band o větší velikosti, který pravděpodobně odpovídal velké podjednotce enzymu ribulosa-1,5-bisfosfát karboxylasa/oxygenasa (RuBisCO) o velikosti 50 kDa. Tento enzym je velmi abundatní v nadzemních částech rostliny a z tohoto důvodu může dojít k nespecifické vazbě protilátky na protein.



Obr. 22 Detekce proteinu MPK3 u mutantních rostlin *Arabidopsis thaliana mpk3-4/2*. **A** Membrána inkubována s primární protilátkou proti MPK3 a sekundární protilátkou

konjugovanou s křenovou peroxidázou, detekovaná pomocí chemiluminiscenčního substrátu. Protein MPK3 o velikosti 42 kDa byl detekován u všech testovaných linií *mpk3-4/2* (1-7) narozdíl od mutantu *mpk3-1* (8), kde protein MPK3 nebyl přítomný. **B** Membrána barvená barvivem Ponceau S. M – marker; K1, K2 – kontrolní rostliny Col-0; 1, 2 - *mpk3-4/2-5*; 3, 4 - *mpk3-4/2-7*; 5,6 - *mpk3-4/2-9*; 7 - *mpk3-4/2-13*; 8 – *mpk3-1*.

Díky tomuto experimentu je možné vysvětlit, proč fenotyp mutantu *mpk3-4/2* neodpovídá fenotypu jiného inzerčního mutantu *mpk3-1*. Protein MPK3 je u mutantu *mpk3-4/2* syntetizován, i když je v promotorové oblasti genu inzertována T-DNA, která by měla způsobit vyřazení genu z činnosti. T-DNA inzerce pravděpodobně nezasahuje regulační oblasti promotoru, jako je např. TATA box nebo CAAT box, důležité pro vazbu transkripčních faktorů a označují tak počátek transkripce. Z tohoto důvodu je gen *MPK3* pravděpodobně normálně exprimován za vzniku proteinu.

Jsou známí i další T-DNA inzerční mutanti, jako například mutant *fsd1-2* (SALK_036006, Alonso *et al.*, 2003), u kterých byla T-DNA integrována do promotorové oblasti genu. Mutant *fsd1-2* má nefunkční gen kódující Fe²⁺ superoxidodismutasu (FeSOD). Ačkoliv se T-DNA u tohoto mutantu nachází v oblasti promotoru, bylo potvrzeno, že k proteosyntéze FeSOD skutečně nedochází (Kuo *et al.*, 2012). Patrně zde T-DNA narušuje regulační oblasti důležité pro transkripci genu.

Mutant *mpk3-4/2* tedy nemůže být využit pro studium funkce MPK3 během vývoje *Arabidopsis*, jelikož i přes přítomnost T-DNA v promotoru genu u něj dochází k syntéze proteinu MPK3. Pro potvrzení fenotypu mutantních rostlin *mpk3-1* s vyřazeným genem *MPK3* z činnosti tak není mutant *mpk3-4/2* vhodným kandidátem.

5 ZÁVĚR

V teoretické části byla vypracována literární rešerše na téma mitogen-aktivované proteinkinasy (MAPK) a jejich role při vývoji rostlin a při adaptaci rostlin během nepříznivých podmínek. Práce byla zaměřena na mitogen-aktivovanou proteinkinasu 3 (MPK3), která hraje významnou roli právě při obraně rostlin vůči různým abiotickým a biotickým stresům, a také během rostlinného vývoje.

Experimentální část byla zaměřena na fenotypovou a genotypovou analýzu mutantních rostlin *Arabidopsis thaliana mpk3-4/2* s vyřazeným genem *MPK3* z funkce. Jedná se o T-DNA inzerčního mutanta, u něhož byla přítomnost T-DNA potvrzena v oblasti promotoru genu *MPK3*. Pomocí metody PCR, která potvrdila inzerci T-DNA v genomu mutanta *mpk3-4/2*, byly vybrány čtyři homozygotní rostliny, jejichž další generace byla podrobena studiu fenotypu nadzemní a kořenové části. Výsledky fenotypové analýzy byly porovnány s kontrolními rostlinami Col-0, ale nebyly zde pozorovány žádné významné rozdíly tak, jak bylo očekáváno. Nakonec byl také proveden Western blot, pomocí kterého byla detekována přítomnost proteinu MPK3 ve všech čtyřech mutantních liniích. Výsledky tak prokázaly nenarušenou expresi genu *MPK3*, jelikož T-DNA je pravděpodobně inzertována v promotoru tohoto genu mimo důležité regulační oblasti. Proto byl tedy fenotyp mutanta *mpk3-4/2* shodný s kontrolními rostlinami Col-0 a z tohoto důvodu nemůže být tato mutantní linie dále použita pro studium funkce MPK3 během vývoje *Arabidopsis thaliana*.

6 LITERATURA

- Abuodeh R.O., Orbach M.J., Mandel M.A., Das A., Galgiani J.N. (2000): Genetic transformation of *Coccidioides immitis* facilitated by *Agrobacterium tumefaciens*. *J. infect. Dis.* **181**:2106-2110.
- Agerbirk N., De Vos M., Kim J.H., Jander G. (2009): Indole glucosinolate breakdown and its biological effects. *Phytochem Rev* **8**:101-120.
- Alonso J.M., Steponova A.N., Leisse T.J., Kim C.J., Chen H., Shinn P., Stevenson D.K., Zimmerman J., Barajas P., Cheuk R., Gadrinab C., Heller C., Jeske A., Koesma M., Meyers C.C., Parker H., Prednis L., Ansari Y., Choy N., Deen H., Geralt M., Hazari N., Hom E., Karnes M., Mulholland C., Ndubaku R., Schmidt I., Guzman P., Aguilar-Henonin L., Schmid M., Weigel D., Carter D.E., Marchand T., Risseuw E., Brogden D., Zeko A., Crosby W.L., Berry C.C., Ecker J.R. (2003): Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**:653-657.
- Apel K., Hirt H. (2004): Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* **55**:373-399.
- Asai T., Tena G., Plotnikova J., Willmann M.R., Chiu W.L., Gomez-Gomez L., Baller T., Ausubel F.M., Sheen J. (2002): MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* **415**:977-983
- Barcelo J., Poschenrieder C. (1990): Plant-water relations as affected by heavy metal stress. *Rev. J. Plant Nutr* **13**:1-37.
- Bednarek P., Osbourn A. (2009): Plant-microbe interactions: chemical diversity in plant defense. *Science* **324**:746-748.
- Bednarek P., Pislewska-Bednarek M., Svatos A., Schneider B., Doubsky J., Mansurova M., Humphry M., Consonni C., Panstruga R., Sanchez-Vallet A., Molina A., Chulze-Lefert P. (2009): A glucosinolate metabolism pathway in living plant cells mediates broad-spectrum antifungal defense. *Science* **323**:101-106.
- Bergmann D.C., Lukowitz W., Somerville C.R. (2004): Stomatal development and pattern controlled by a MAPKK kinase. *Science*. **304**: 1494–1497.
- Böttcher C., Westphal L., Schmotz C., Prade E., Scheel D., Glawischnig E. (2009): The multifunctional enzyme CYP71B15 (Phytoalexin deficient3) converts cysteine-indole-3-acetonitrile to camalexin in the indole-3-acetonitrile metabolic network of *Arabidopsis thaliana*. *Plant cell* **21**:1830-1845.
- Boudsocq M., Lauriere C. (2005) Plant-microbe interactions: chemical diversity in plant defense. *Science* **324**:746-748.
- Clark K.L., Larsen P.B., Wang X., Chang C. (1998): Association of the *Arabidopsis* CTR1 Raf-like kinase with the ETR1 and ERS ethylene receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**:5401–5406.
- Clay N.K., Adio A.M., Denoux C., Jander G., Ausubel F.M. (2009) Glucosinolate metabolites required for an *Arabidopsis* innate immune response. *Science Signal* 2009;323:95.
- Colcombet J. and Hirt H. (2008): *Arabidopsis* MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochemical journal* **413**:217–226.

- de Groot M.J., Bundock P., Hooykaas P.J., Baijersbergen A.G. (1998): *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nat. Biotechnol.* **16**:839-842.
- Ding Z.J., Yan J.Y., Xu X.Y., Yu D.Q., Li G.X., Zhang S.Q., Zheng S.J. (2014): Transcription factor WRKY46 regulates osmotic stress responses and stomatal movement independently in *Arabidopsis*. *Plant journal* **79**:13-27.
- Droillard M., Boudsocq M., Barbier-Brygoo H., Lauriere C. (2002): Different protein kinase families are activated by osmotic stresses in *Arabidopsis thaliana* cell suspensions. *FEBS lett* **527**:43–50.
- Emaze home page: <https://www.emaze.com/@AOTFCLRR/GENETIC-ENGINEERING-IN-PLANTS.pptx>; (1.3.2017).
- Fan J., Crooks C., Creissen G., Hill L., Fairhurst S., Doerner P., Lamb C. (2011): *Pseudomonas sax* genes overcome aliphatic isothiocyanate-mediated non-host resistance in *Arabidopsis*. *Science* **331**:1185-1187.
- Feilner T., Hultschig C., Lee J., Meyer S., Immink R.G., Koenig A., Possling A., Seitz H., Beveridge A., Scheel D., Cahill D.J., Lehrach H., Kreutzberg J., Kersten B. (2005): High throughput identification of potential *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinases substrates. *Mol. Cell Proteomics* **4**:1558-1568.
- 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 Res.* **18**:1190–1198.
- Gao Z., Chen Y.F., Randlett M.D., Zhao X.C., Findell J.L., Kieber J.J., Schaller G.E. (2003): Localization of the Raf-like kinase CTR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis* through participation in ethylene receptor signaling complexes. *J Biol Chem.* **278**:34725–34732.
- Gelvin S.B. (2000): *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and intergration. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* **51**:223-256.
- Glick B.R., Pasternak J.J., Patten C.L. (2010): Genetic engineering of plants: methodology In: *Molecular biotechnology; principles and applications of recombinant DNA*. 4. edice; Washington D.C.; 726-730.
- Herbette S., Taconnat L., Hugouvieux V., Piette L., Magniette M., Cuine S., Auroy P., Richaud P., Forestier C., Bourguignon J., Renou J.P., Vavasseur A., Leonhardt N. (2006): Genome wide transcriptome profiling of the early cadmium response of *Arabidopsis* roots and shoots. *Biochimie.* **88**:1751-1765.
- Hetherington A.M., Woodward F.I. (2003): the role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature* **424**:901-908.
- Huang G.T., Ma S.L., Bai L.P., Zhang L., Ma H., Liu J., Zhong M., Guo Z.F. (2012): Signal transduction during cold, salt and drought stresses in plants. *Molecular biology reporter* **39**:969-987.
- Chen R.E., Thorner J. (2007): Function and regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemica et Biophysica acta* **1773**:1311-1340.

- Cho H., Winans S.C. (2005): ViA and Vir G activate the Ti-plasmid repABC operon, elevating plasmid copy number in response to wound-released chemical signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**:14843-14848.
- Ichimura et. al (MAPK group) (2002): Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: A new nomenclature. *Trends in plant science* **7**:301-308.
- Ichimura K., Casais C., Peck S.C., Shinozaki K., Shirasu K. (2006): MEKK1 is required for MPK4 activation and regulates tissue-specific and temperature dependent cell death in Arabidopsis. *J Biol Chem.* **281**:36969–36976.
- Ishihama N., Yoshioka H. (2012): Post-translational regulation of WRKY transcription factors in plant immunity. *Curr Opin Plant Biol* **15**:431–437.
- Jonak C., Okr sz L., B gre L., Hirt H.. (2002): Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling. *Current Opinion in Plant Biology* **2002**;5:415-24.
- Keshet Y., Seger R. (2010): The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions. *Methods Mol Biol* **661**:3–38.
- Keyse S.M. (2008): Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs) and cancer. *Cancer Metastasis Rev* **27**:253-261
- Kong Q., Qu N., Gao M., Zhang Z., Ding X., Yang F., Li Y., Dong O.X., Chen S., Li X., Zhang Y. (2012): The MEKK1-MKK1/MKK2-MPK4 kinase cascade negatively regulates immunity mediated by a mitogen-activated protein kinase kinase kinase in Arabidopsis. *Plant Cell.* **24**:2225–2236.
- Kovtun Y., Chiu W..L, Tena G., Sheen J. (2000): Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**:2940-2945.
- Krysan P.J., Jester P.J., Gottwald J.R., Sussman M.R. (2002): An Arabidopsis mitogen-activated protein kinase kinase kinase gene family encodes essential positive regulators of cytokinesis. *Plant Cell.* **14**:1109–1120.
- Kuo W.Y., Huang C.H., Liu A.C., Cheng C.P., Li S.H., Chang W.C., Weiss C., Azem A., Jinn T.L., (2012): Chaperonin 20 mediates iron superoxide dismutase activity independent of its co-chaperonin role in Arabidopsis thaliana chloroplasts. *New phytologist* **197**:99-110.
- Lampard G.R., Macalister C.A., Bergmann D.C. (2008): Arabidopsis stomatal initiation is controlled by MAPK-mediated regulation of the bHLH SPEECHLESS. *Science* **322**:1113-1116.
- Lewis T.S., Shapiro P.S., Ahn N.G. (1998): Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv. Cancer Res.* **74**:49-139.
- Li K., Yang F., Zhang G., Song S., Li Y., Ren D., Miao Y., Song C.P. (2017): AIK1, a mitogen-activated protein kinase, modules abscisic acid responses through the MKK5-MPK6 kinase cascade. *Plant Physiol.* **173**:1391-1408.

- 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.
- Lukowitz W., Roeder A., Parmenter D., Somerville C. A. (2004): MAPKK kinase gene regulates extra-embryonic cell fate in *Arabidopsis*. *Cell* **116**:109–119.
- Madhani H.D., Fink G.R. (1998): The riddle of MAP kinase signaling specificity. *Trends Genet.* **14**:151-155.
- Mayer A.D., Aebi R., Meins F. Jr. (1997): Tobacco plants carrying a tms locus of Ti-plasmid origin and the HI-1 allele are tumor prone. *Differentiation* **61**:213-221.
- Meinke D.W., Cherry J.M., Dean C., Rounsley S.D., Koornneef M. (1998): *Arabidopsis thaliana*: A model plant for genome analysis. *Science* **282**: 662-682.
- Menges M., Dóczy R., Okrészl L., Morandini P., Mizzi L., Soloviev M., Murray J.A., Bögre L. (2008): Comprehensive gene expression atlas for the *Arabidopsis* MAP kinase signalling pathways. *New phytologist* **179**:643-662.
- Merkouropoulos G., Andreasson E., Hess D., Boller T., Peck S.C. (2008): An *Arabidopsis* protein phosphorylated in response to microbial elicitation AtPHOS32, is a substrate of MAP kinases 3 and 6. *J. Biol. Chem.* **283**:10493-10499.
- Mizoguchi T., Irie K., Hirayama T., Hayashida N., Yamaguchi-Schizonaki K., Matsumoto K., Schinozaki K. (1996): A gene encoding a mitogen-activated protein kinase 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*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**:765-769.
- Morris P.C, Guerrier D., Leung J., Giraudat J. (1997): Cloning and characterization of MEK1, an *Arabidopsis* gene encoding a homologue of MAP kinase kinase. *Plant Mol Biol* **35**:1057-1064.
- Morris P.C. (2001): MAP kinase signal transduction pathways in plants. *New phytol.* **151**:67-89.
- Morrison D.K., Davis R.J. (2003): Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annu Rev Cell Biol* **19**:91-118.
- Mullins E.D., Chen X., Romaine P., Raina R., Geiser D.M., Kang S. (2001): *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: an efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. *Phytopathology* **91**:173-180.
- Nadeau J.A., Sack F.D. (2002): Control of stomatal distribution on the *Arabidopsis* leaf surface. *Science* **296**:1697-1700.
- Nakagami H., Kiegerl S., Hirt H. (2004): OMTK1, a novel MAPKKK, channels oxidative stress signalling through direct MAPK interaction. *J Biol Chem* **279**:26959–26966.
- Nakagami H., Soukupová H., Schikora A., Zárský V., Hirt H. (2006): A mitogen-activated protein kinase kinase kinase mediates reactive oxygen species homeostasis in *Arabidopsis*. *J-Biol- Chem.* **281**:28697-39704.
- Nester E.W. (2000): DNA and protein transfer from bacteria to eukaryotes – the *agrobacterium* story. *Molecular plant phyto* **1**:87-90.

- Nocito F.F., Pirovano L, Cocucci M, Sacchi GA (2002): Cadmium-induced sulphate uptake in maize roots. *Plant physiol* **129**:1872-1879.
- Nyitrai P., Böka K., Gáspár .L, Sárvári É., Lenti K., Keresztes Á. (2003): Characterization of the stimulating effects of low-dose stressors in maize and bean seedlings. *J. Plant Physiol.* **160**:1175-1183.
- Osakabe Y., Yamaguchi-Schinozaki K., Shinozaki K., Tran L.-S.P. (2013): Sensing the environment: key roles of membrane-localized kinases in plant perception and response to abiotic stress. *J. Exp. Bot.* **64**:445-458.
- Pappas K.M. (2008): Cell-cell signaling and the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid copy number fluctuations. *Plasmid* **60**:89-107.
- Peiser G.D., Wang T.T., Hoffman N.E., Yang S.F., Liu H., Walsh C.T. (1984): Formation of cyanide from carbon 1 of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid during its conversion to ethylene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:3059-3063.
- Popescu S.C., Popescu G.V., Bachan S., Zhang Z., Gerstein M., Snyder M., Dinesh-Kumar S.P. (2009): MAPK target networks in *Arabidopsis thaliana* revealed using functional protein microarrays. *Genes Dev* **23**:80–92.
- Potikha T.S., Collins C.C., Johnson D.I., Delmer D.P., Levine A. (1999): The involvement of hydrogen peroxide in the differentiation of secondary walls in cotton fibers. *Plant physiology* **119**:849-858.
- Qiu J.L., Zhou L., Yun B.W., Nielsen H.B., Fiil B.K., Petersen K., MacKinlay J., Loake G.J., Mundy J., Morris P.C. (2008): *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinase MKK1 a MKK2 have overlapping functions in defense signaling mediated by MEKK1, MPK4 and MKS1. *Plant physiol* **148**:212-222.
- Ren D.T., Liu Y., Yang K.Y., Han L., Mao G., Glazebrook J., Zhang S. (2008): A fungal-responsive MAPK cascade regulates phytoalexin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**:5638-5643.
- 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.
- Rho H.S., Kang S., Lee Y.H. (2001): *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the plant pathogenic fungus, *Magnaporthe grisea*. *Mol. Cells* **12**:407-411.
- Rodriguez M.C., Petersen M., Mundy J. (2010): Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol* **61**:621-649.
- Romeis T. (2001): Protein kinases in the plant defence response. *Curr. Opin. Plant. Biol.* **4**:407-414.
- Sarry J.E., Kuhn L., Ducruix C., Lafaye A., Junot C., Hugouvieux V., Jourdain A., Bastien O., Fievet J.B., Vailhen D., Amekraz B., Moulin C., Ezan E., Garin J., Bourguignon J. (2006): The early responses of *Arabidopsis thaliana* cells to cadmium exposure explored by protein and metabolite profiling analyses. *Proteomics* **6**:2180-2198.

- Sessions A., Burke E., Presting G., Aux G., McElver J., Patton D., Dietrich B., Ho P., Bacwaden J., Ko C., Clarke J.D., Cotton D., Bullis D., Snell J., Miguel T., Hutchison D., Kimmerly B., Mitzel T., Katagiri F., Glazebrook J., Law M., Goff S.A. (2002): A high-throughput Arabidopsis reverse genetic system. *Plant cell* **14**:2985-2994.
- Sheikh A.H., Eschen-Lippold L., Pecher P., hoehenwarter W., Sinha A.K., Scheel D., Lee J. (2016): Regulation of WRKY46 transcription factor function by mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Science* **7**:61.
- Schaeffer H.J., Weber M.J. (1999): Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol. Cell. Biol.* **19**:2435-2444.
- Skirycz A., De Bodt S., Obata T., De Clercq I., Claeys H., De Rycke R., Andriankaja M., Van Aken O., Van Breusegem F., Fernie AR., Inzé D. (2010): Developmental stage specificity and the role of mitochondrial metabolism in the response of *Arabidopsis* leaves to prolonged mild osmotic stress. *Plant physiology* **152**:226-244.
- Smékálová V. (2014a): *Characterization of selected Arabidopsis thaliana mitogen-activated protein kinase mutants*. Disertační práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika
- Smékálová V., Doskočilová A., Komin G., Šamaj J. (2014b): Crosstalk between secondary messengers, hormones and MAPK modules during abiotic stress signaling in plants. *Biotechnology Advance* **32**:2-11.
- Stotz H.U., Sawada Y., Shimada Y., Hiray M.Y., Sasaki E., Krischke M., Brown P.D., Saito K., Kamiya Y. (2011): Role of camalexin, indole glucosinolates, and side chain modification of glucosinolate-derived isothiocyanates in defense of *Arabidopsis* against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant J.* **67**:81-93.
- Suarez-Rodriguez M.C., Adams-Phillips L., Liu Y., Wang H., Su S.H., Jester P.J., Zhang S., Bent A.F., Krysan P.J. (2007): MEKK1 is required for flg22-induced MPK4 activation in *Arabidopsis* plants. *Plant Physiol.* **143**:661–669.
- Šamajová O., Komis G., Šamaj J. (2013): Emerging topics in the cell biology of mitogen activated protein kinases. *Trends Plant Sci* **18**:140–148.
- Tanoue T., Nishida E. (2003): Molecular recognitions in the MAP kinase cascades. *Cell Signal* **15**:455–462.
- Tena G., Asai T., Chiu W.L., Sheen J. (2001): Plant mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Plant biology* **4**:392–400.
- Teige M., Scheikl E., Eulgem T., Dóczi R., Ichimura K., Shinozaki K., Dangl J.L., Hirt H. (2004): The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in *Arabidopsis*. *Mol Cell.* **15**:141–152.
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000): Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**:796-815.
- Ulm R., Ichimura K., Mizoguchi T., Peck S.C., Zhu T., Wang X., Shinozaki K., Paszkowski J. (2002): Distinct regulation of salinity and genotoxic stress responses by *Arabidopsis* MAP kinase phosphatase 1. *EMBO J.* **21**:6483-6493.

- Virk N., Li D., Tian L., Huang L., Hong Y., Li X., Zhang Y., Liu B., Zhang H., Song F. (2015): Arabidopsis Raf-like mitogen-activated protein kinase kinase kinase gene Raf43 is required for tolerance to multiple abiotic stresses. *PLoS One* 10:e0133975.
- Wang H., Ngwenyama N., Liu Y., Walker J.C., Zhang S. (2007): Stomatal development and patterning are regulated by environmentally responsive mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *Plant cell* 19:63-73.
- Widmann C., Gibson S., Jarpe M.B., Johnson G.L. (1999): Mitogen-activated protein kinase: conservation of three-kinase module from yeast to human. *Physiol. Rev.* 79:143-180.
- Wojcik M., Tuckendorf A. (1999): Cd-tolerance of maize, rye and wheat seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum* 21:99-107.
- Woodward F.I., Lake J.A., Quick W.P. (2002): Activation of mitogen-activated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:741-746.
- Xu J., Li Y., Wang Y., Liu H., Lei L., Yang H., Liu G., Ren D. (2008): Activation of MAPK kinase 9 induces ethylene and camalexin biosynthesis and enhances sensitivity to salt stress in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 283:26996-27006.
- Xu J., Meng J., Meng X., Zhao Y., Liu J., Sun T., Liu Y., Wang Q., Zhang S. (2016): Pathogen-responsive MPK3 and MPK6 reprogram the biosynthesis of indole glucosinolates and their derivatives in *Arabidopsis* immunity. *Plant cell* 28:1144-1162.
- Yoo S.D., Cho Y.H., Tena G., Xiong Y., Sheen J. (2008): Dual control of nuclear EIN3 by bifurcate MAPK cascades in C₂H₄ signalling. *Nature*. 451:789–795.
- Yuasa T., Ichimura K., Mizoguchi T., Shinozaki K. (2001): Oxidative stress activates AtMPK6, an *Arabidopsis* homologue of MAP kinase. *Plant Cell Physiology* 42:1012-1016.
- Zhang S., Klessig D.F. (2001): Salicylic acid activates a 48-kD MAP kinase in tobacco. *Plant cell* 9:809-824.
- Zhao L., Wang C., Zhu F., Li Y. (2017): Mild osmotic stress promotes 4-methoxy indolyl-3-methyl glucosinolate biosynthesis mediated by the MKK9–MPK3/MPK6 cascade in *Arabidopsis*. *Plant cell reports* <http://link.springer.com/article/10.1007/s00299-017-2101-8>.
- Zhu J.K. (2002): Salt and Drought Stress Signal Transduction in Plants. *Annual Review of Plant Biology* 53,247-273.

7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

4MI3G – 4-methoxy indolyl-3-methyl glukosinolát

ABA – kyselina abscisová

ACC – 1-aminocyklopropan-1-karboxylová kyselina

AGS – alifatické glukosinoláty

AIK1 – gen kódující MAPKKK20

ANP1 – *Arabidopsis* NPK1 homolog

AUX – auxiny

BAR – gen rezistence na fosfotricin

BSA – hovězí sérový albumin

Col-0 – *A. thaliana* ekotyp Columbia

dNTPs – deoxynukleotidy

DSPs – duálně specifické Ser/Thr a Tyr fosfatasy

DTT – dithiotreitol

ECL – chemiluminescenční substrát

FLG 22 – flagellin 22

FLS2 – receptor detekující přítomnost flagellinu 22

IGS – indolové glukosinoláty

LB – levá koncová sekvence

LEA – geny účastníci se regulace osmotického stresu u *A. thaliana*

LP – levý primer

MAPK – mitogen-aktivované proteinkinasy

MAPKK (MAP2K, MKK) – mitogen-aktivované proteinkinasy kinasy

MAPKKK (MAP3K, MEKK) – mitogen-aktivované proteinkinasy kinasy kinasy

MKS1 – substrát pro MAP kinasy

MMK3 – MAPK z *Medicago sativa*

MS – Murashige & Skoog

OMTK1 – MAP3K z *Medicago sativa*

OXII – gen účastnící se regulace oxidativního stresu u *A. thaliana*

ORI – replikační počátek

PCR – polymerázová řetězová reakce

PAGE – polyakrylamidová gelová elektroforéza

PPT – fosfinotricin

PSTPs – serin-threonin fosfatasy

PTPs – protein-tyrosin fosfatasy

PVDF – polyvinylidendifluorid

RLK – receptorová kinasa

RLP – receptorový protein

ROS – reaktivní formy kyslíku

RB – pravá koncová sekvence

RP – pravý primer

SAIL – Inzerční knihovna *Arabidopsis*

SALK – Institut biologických studií (Jonas Edward Salk)

SD – směrodatná odchylka

SDS – dodecylsulfát sodný

TAIL PCR – polymerázová řetězová reakce neznámých DNA fragmentů

T-DNA – inzerční DNA nesena na Ti-plasmidu

Ti plasmid – plasmid *Agrobacterium tumefaciens* vyvolávající růst tumorů

Vir geny – geny podílející se na virulenci při transformaci pomocí *A. tumefaciens*