

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Laboratoř růstových regulátorů**



**Úloha mitogenem aktivované protein kinázy MPK6 ve vývoji**

*Arabidopsis thaliana*

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Bc. Pavlína Floková</b>
Studijní program:	R141032 Fyziologie rostlin
Studijní obor:	Fyziologie rostlin
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Georgios Komis, PhD.</b>
Termín odevzdání práce:	2016

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Pavlína Floková
Název práce	Úloha mitogenem aktivované protein kinázy MPK6 ve vývoji <i>Arabidopsis thaliana</i>
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra buněčné biologie a genetiky
Vedoucí práce	Georgios Komis, PhD.
Rok obhajoby práce	2016
Abstrakt	<p>Předložená diplomová práce byla zaměřena na studium regulačních mechanismů subcelulární lokalizace a funkce jedné z hlavních mitogenem aktivovaných protein kináz <i>Arabidopsis thaliana</i>, MPK6. Kaskády MAP kináz jsou zapojeny do klíčových procesů vývoje rostlin a bylo zjištěno, že MPK6 se účastní těchto procesů. V této práci byl studován mechanismus subcelulární lokalizace a funkce MPK6 během postembryonálního vývoje kořene. Byla studována organizace mikrotubulů v průběhu mitózy, lokalizace MPK6 a reakce MPK6 na inhibitory jaderného transportu a aktivace MAPK. Výsledky této práce ukazuje vztah mezi MPK6 a organizací preprofázního svazku mikrotubulů a fragmoplastu, které ovlivňují orientaci roviny dělení buněk. Jaderná lokalizace MPK6 byla ovlivněna po aplikaci inhibitorů jaderného transportu (importazol a ratjadon C), avšak nereagovala k inhibitoru aktivace MAPK (PD98059). Celkově tato studie poskytuje poznatky o mechanismech subcelulární lokalizace MPK6 a navrhuje úlohu MPK6 ve vývoji, nezávislou na aktivitě MAPK.</p>
Klíčová slova	Arabidopsis, fragmoplast, kořenový meristém, MPK6, mikrotubuly, preprofázní svazek, orientace roviny dělení buněk
Počet stran	107
Jazyk	Český (anglický)

## **Bibliographical identification**

Author's first name and surname	Bc. Pavlína Floková
Title of thesis	Developmental role of <i>Arabidopsis</i> MAP kinase MPK6
Type of thesis	Diploma thesis
Department	Department of Cell Biology and Genetics
Supervisor	Georgios Komis, PhD.
The year of presentation	2016
Abstract	<p>The present thesis focused on the study of regulatory mechanisms subcellular localization and function of one the main <i>Arabidopsis thaliana</i> mitogen-activated protein kinases, MPK6. MAP kinase cascades are involved in key processes of plant development and it was found that MPK6 is involved in such processes. In the present thesis, we studied mechanisms of MPK6 subcellular localization and function of MPK6 during postembryonic root development. We studied organization of mitotic microtubule systems, the localization of MPK6 and its response to inhibitors of nucleocytoplasmic transport and MAPK inhibition. Results of this work show relationship between MPK6 and organization of the preprophase microtubule band and the phragmoplast, affecting cell division plane orientation. Localization of MPK6 particularly to the nucleus was sensitive to nucleocytoplasmic transport inhibitors (importazole and ratjadone C) but insensitive to MAPK activation inhibitor (PD98059). Overall the present study provides insights on the mechanisms of MPK6 subcellular localization and suggests a developmental role of MPK6 independent of its MAPK activity.</p>
Keywords	<i>Arabidopsis</i> , cell division plane orientation, microtubules, MPK6, phragmoplast, preprophase band, root meristem
Number of pages	107
Language	Czech (English)

**Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Georgiose Komise, PhD. a uvedla jsem veškeré použité literární zdroje.

V Olomouci dne.....

.....

## **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat Georgiosu Komisovi, PhD. za odborné vedení, trpělivé vyučování a čas, který mi věnoval . Zároveň bych mu chtěla poděkovat za vstřícný a přátelský přístup ke všem studentům. Mé poděkování patří také Ivanu Luptovčiakovi za poskytnutí biologického materiálu, Anně Kuchařové, PhD. za korektury textu, a mojí rodině a přátelům, kteří mi byli oporou po celou dobu studia.

## Obsah

1	Úvod.....	8
2	Signalizace na úrovni MAP kináz u rostlin.....	9
2.1	Základní charakteristika MAPK signalizace.....	9
2.2	Aktivace a inaktivace MAPK kaskády .....	10
2.3	Vlastnosti MAP kináz u rostlin .....	12
2.3.1	Charakterizace MAP3 kináz (MAPKKK).....	12
2.3.2	Charakterizace MAP2 kináz (MAPKK) .....	14
2.3.3	Charakterizace MAP kináz (MAPK) .....	14
2.3.4	Úloha mitogenem aktivované protein kinázy MPK6 u Arabidopsis.....	17
2.3.5	Buněčná lokalizace MAPK kaskád .....	17
3	Úloha cytoskeletu při buněčném dělení u rostlin .....	19
3.1	Preprofázní svazek mikrotubulů a fragmoplast.....	20
3.2	Uspořádání cytoskeletu během mitózy .....	22
4	Vývoj kořene Arabidopsis thaliana.....	25
4.1	Embryogeneze Arabidopsis .....	25
4.2	Architektura kořenového meristému dvouděložných rostlin .....	26
5	Imunofluorescence a mikroskopie jako nástroj k vizualizaci buněčných struktur.....	28
5.1	Imunofluorescenční značení proteinů .....	28
5.1.1	Imunolokalizace metodou whole mount .....	28
5.1.2	Provedení metody whole mount.....	29
5.2	Studium rostlin pomocí mikroskopických technik.....	30
6	Použité genotypy rostliny Arabidopsis pro studium úlohy MPK6.....	32
7	Cíle práce .....	34
8	Materiál a metody .....	35
8.1	Rostlinný materiál .....	35
8.2	Pozorování fenotypu semenáčků a dospělých rostlin .....	35
8.2.1	Příprava semen .....	35
8.2.2	Příprava kultivačního média a výsev semen .....	36
8.3	Příprava embryí.....	36
8.4	Pozorování struktury kořene nativních vzorků .....	36
8.5	Metoda whole mount.....	36
8.6	GFP lokalizace .....	39
8.7	Aplikace inhibitorů.....	40
8.8	Biochemická analýza buněčných extraktů .....	41
8.9	Programy pro zpracování výsledků.....	42

8.10	Přístrojové vybavení.....	43
8.11	Seznam použitých roztoků .....	44
9	Výsledky .....	49
9.1	Průběh experimentů .....	49
9.2	Pozorování fenotypu mutantů <i>mpk6-4</i> , <i>MPK6AEF</i> a WT Col-0.....	49
9.2.1	Pozorování fenotypu semenáčků.....	49
9.2.2	Pozorování fenotypu dospělých rostlin .....	51
9.3	Embryogeneze u mutantů <i>mpk6-4</i> , <i>MPK6AEF</i> a WT Col-0 .....	53
9.4	Pozorování struktury kořene nativních vzorků .....	56
9.5	Pozorování struktury kořene fixovaných vzorků .....	62
9.5.1	Organizace cytoskeletu v průběhu buněčného dělení u WT a mutantů MPK6.....	62
9.5.2	Organizace cytoskeletu ve vztahu k orientaci roviny dělení buněk .....	67
9.5.3	Lokalizace MPK6 metodou whole mount.....	69
9.5.4	GFP lokalizace MPK6.....	84
9.6	Imunochemická charakterizace mutantů a WT .....	84
10.1	Fenotyp MPK6 mutantů je ovlivněn poruchami v orientaci roviny buněčného dělení....	86
10.2	Funkce MPK6 při organizaci cytoskeletu.....	87
10.3	Lokalizace MPK6 .....	87
	Seznam literatury .....	91
	Seznam zkratk .....	105

## 1 Úvod

Rostliny jsou sesilní organismy bez schopnosti uniknout před nepříznivými vlivy prostředí. Většina rostlin je po celý život vázána na jedno stanoviště, kde musí odolávat měnícím se podmínkám prostředí a útokům škůdců. Změny v prostředí mohou mít různý charakter i délku působení a vedou k odchylkám od fyziologického optima. Rostliny se v průběhu života často potýkají s teplotními rozdíly, nedostatkem či nadbytkem vody, živin, s působením toxických látek, infekcí nebo herbivorů. Neschopnost rostlin uniknout před nepříznivými vlivy prostředí vedla k vyvinutí řady obranných a adaptačních mechanismů, které rostlinám umožňují přežít určitou míru zátěže, způsobenou dynamickými změnami podmínek. Během růstu a vývoje jsou rostliny vystaveny mnoha vnitřním i vnějším faktorům, na které mimo jiné reagují pomocí komplexního systému signálních drah. Jedná se o biochemické kaskády schopné rozpoznávat a šířit různé typy signálů, spouštějících odezvu organismu na podněty z prostředí. Cílem buněčné signalizace je zajistit přežití rostlin, proto musí být tyto reakce rychlé a specifické. Funkce některých signálních drah se v průběhu evoluce rozšířila také do dalších oblastí vývoje. Mezi tyto signální dráhy patří například ústřední kaskáda proteinové rodiny serin/treoninových kináz, souhrnně nazývaná mitogenem aktivované protein kinázy, zkráceně MAPK nebo MAP kinázy (Rodriguez *et al.*, 2010). Signální dráhy MAP kináz jsou velmi univerzální kaskády. Bylo zjištěno, že zastupují mnoho úloh při buněčné signalizaci u rostlin, včetně adaptace na abiotický a biotický stres, regulace vrozené imunity nebo embryonálního vývoje.



## 2 Signalizace na úrovni MAP kináz u rostlin

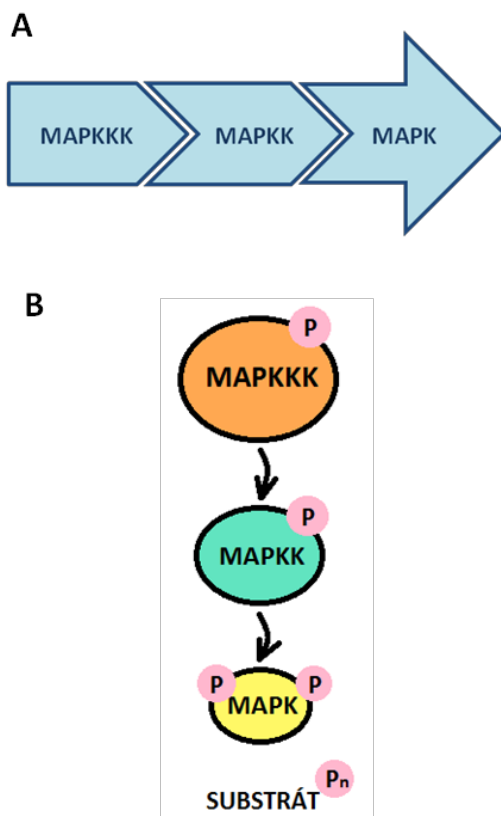
### 2.1 Základní charakteristika MAPK signalizace

Reakce rostlin na molekulární úrovni zahrnují především rychlou modifikaci enzymatické aktivity a genové exprese. Mezi nejčastější mechanismy regulace patří posttranslační modifikace proteinů, které zvyšují funkční rozmanitost proteomu, například kovalentní vazbou funkčních skupin a proteinů, proteolytickým štěpením regulačních podjednotek, nebo degradací proteinů. Tyto modifikace zahrnují fosforylaci, glykosylaci, hydroxylaci, metylaci, acetylaci a ubikvitinaci, a ovlivňují téměř všechny procesy na úrovni buňky (Beevers, 1982; Prabakaran *et al.*, 2012).

Tato diplomová práce je zaměřena na studium významných signálních kaskád eukaryotických organismů, regulovaných prostřednictvím fosforylace. Proteiny jsou fosforylovány pomocí enzymů kináz, které zprostředkovávají přenos fosfátové skupiny z vysokoenergetické molekuly (např. ATP) na molekulu substrátu. Důležitou roli v buněčné signalizaci u rostlin hrají mitogenem aktivované protein kinázy (MAPK, MAP kinázy; Rodriguez *et al.*, 2010), které jsou typicky uspořádány v signalizačních kaskádách (Mishra *et al.*, 2006) a jejichž funkce je úzce spojena s lineární kaskádou fosforylačních dějů. MAP kinázy jsou zapojeny v klíčových procesech jako je například buněčná proliferace, diferenciací a buněčná smrt u všech eukaryotických organismů, od kvasinek až po člověka (Qi a Elion 2005; Raman *et al.*, 2007; Keshet a Seger 2010). U rostlin jsou MAP kinázy zapojeny při odezvě na abiotický stres (Moustafa *et al.*, 2014), hormonální regulaci (Smékalová *et al.*, 2014a), včetně působení kyseliny abscisové (de Zelicourt *et al.*, 2016), auxinů (DeLong *et al.*, 2002), jasmonátů (Ahmad *et al.*, 2016), při odezvě na biotický stres vyvolaný působením patogenů (bakterií, hub, hlístic; Meng a Zhang, 2013; Hamel *et al.*, 2012; Turrà *et al.*, 2014), herbivorů (Hettenhausen *et al.*, 2015), a rovněž jsou zapojeny při regulaci vývoje rostlinných pletiv (Colcombet a Hirt, 2008).

Signalizační kaskády MAP kináz jsou vysoce konzervované moduly u všech eukaryotických buněk (Zhang *et al.*, 2006). Přestože MAPK ovlivňují odlišné procesy, mají společný vzorec uspořádání kaskády a shodný mechanismus aktivace – fosforylaci. Každá kaskáda zahrnuje nejméně tři proteinové kinázy v sérii, které jsou fosforylovány předchozí kinázou a tím se navzájem aktivují (Pearson *et al.*, 2001). Proto také všechny MAP kinázy obsahují aktivní místa s aminokyselinami serin/treonin a tyrosin, na které se váže fosfátová skupina (Ichimura *et al.*, 2002). MAPK tvoří komplexní systém vzájemně propojených drah, kdy jedna nebo více složek jedné signální dráhy může ovlivňovat další. Tato křížová komunikace je označována jako crosstalk a je typická pro složité signální dráhy, mezi které MAPK signalizace patří (např. Jonak *et al.*, 2002). Některé kinázy téhož typu tak mohou být zapojeny do odlišných fyziologických procesů (Colcombet a Hirt, 2008). Signální dráha MAPK začíná fosforylací serin/treoninové kinázy, tzv.

trojité kinázy MAPKKK (MAP3K), pokračuje aktivací MAPKK (MAP2K) s duální specifitou a je zakončena aktivací ústřední MAPK prostřednictvím dvojité fosforylace (Colcombert a Hirt, 2008). Poslední kináza signálního modulu je schopna fosforylovat řadu substrátů, včetně transkripčních faktorů pro regulaci genové exprese (Andreasson a Ellis, 2009). Pořadí posloupnosti signální dráhy MAP kináz je znázorněno na obrázku 1. Uspořádání tohoto systému také ukazuje, že všechny články MAPK kaskád jsou fyzicky zapojeny v konkrétní MAPK kaskádě.



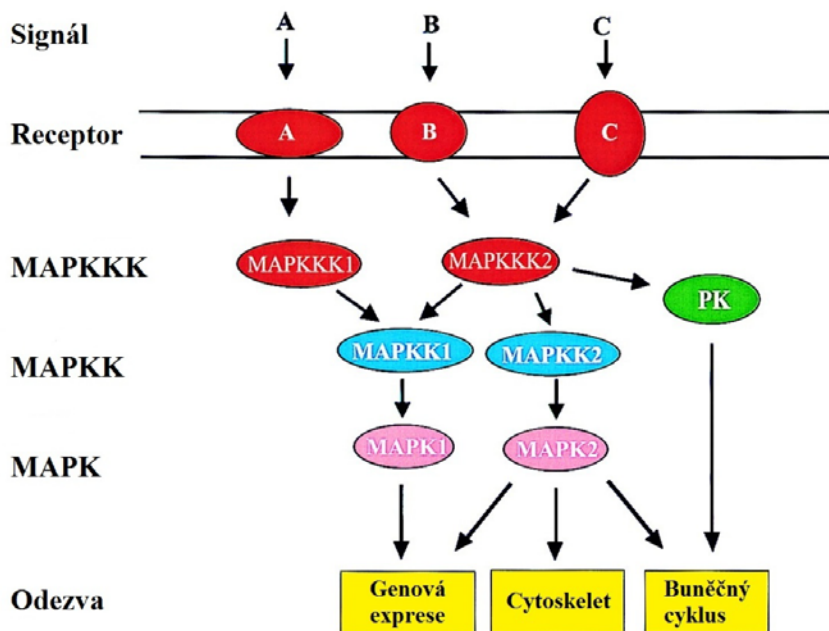
**Obr. 1** (A) Lineární uspořádání přenosu signálu a (B) procesy fosforylace typické pro MAPK kaskádu tvořenou MAPKKK, MAPKK a MAPK. Sériové uspořádání kináz umožňuje vytvoření fyzického komplexu, který zahrnuje všechny tři členy kaskády a zprostředkovává přenos fosfátové skupiny (P) z MAPKKK na MAPK. Toto uspořádání MAP kinázových kaskád je bez výjimky konzervováno u všech eukaryotických organismů (Zhang *et al.*, 2006). MAPK je fosforylována dvojitě, počet fosforylací substrátu není definován ( $P_n$ ).

## 2.2 Aktivace a inaktivace MAPK kaskády

Každá MAPK kaskáda je zahájena specifickými extracelulárními podněty a vede k aktivaci MAPKKK. Podnětem pro spuštění kaskády jsou abiotické i biotické signály, které aktivují membránové receptory, heterotrimerní GTPázy nebo malé GTPázy a následně aktivují příslušnou kinázu (Chen a Thorner, 2007). Stimulem mohou být plísňové nebo bakteriální elicitory (Meng a Zhang, 2013), nadměrná salinita prostředí (Huang *et al.*, 2012), působení škodlivého záření (Nawkar *et al.*, 2013; Wankhede *et al.*, 2013), nedostatek vody (Huang *et al.*, 2012), teplotní extrémy (chlad nebo teplo; Huang *et al.*, 2012), působení mechanických stimulů (např. vliv větru,

srážek, mechanické poškození; Rodriguez *et al.*, 2010) nebo hormonální signály (Smékalová *et al.*, 2014a; Singh *et al.*, 2015). MAPKKK přímo fosforyluje a aktivuje MAPKK a ta následně aktivuje MAPK dvojitou fosforylací zbytků treoninu a tyrosinu v motivu T-X-Y (X-libovolná aminokyselina) v aktivačním místě smyčky (tzv. T-smyčka) mezi katalytickými subdoménami VII a VIII (Tena *et al.*, 2001). Po aktivaci MAPK fosforyluje různé substráty, například transkripční faktory, cytoskeletální proteiny nebo jiné kinázy a fosfatázy, které jsou pak přímo nebo nepřímo zodpovědné za odezvu na podněty (Hirt, 2000; Morrison, 2012; Obr. 2).

Aktivované MAPK jsou inaktivovány prostřednictvím defosforylace treoninových a/nebo tyrosinových zbytků v aktivačním místě smyčky. Defosforylace může být dosaženo působením serin/treoninových fosfatáz, tyrosinových fosfatáz a fosfatáz s duální specifitou (Keyse, 2000; Kondoh a Nishida, 2007). Do skupiny serin/treoninových fosfatáz defosforylujících MAPK patří PP2A a PP2C (Alessi *et al.*, 1995) a mezi tyrosinové fosfatázy patří tři specifické fosfatázy STEP, HePTP a PTP-SL (Pulido *et al.*, 1998; Saxena *et al.*, 1999). Fosfatázy s duální specifitou jsou například PHS1 (Quettier *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2016) nebo MKP1 (Ulm *et al.*, 2001; Anderson *et al.*, 2011). Často je celá dráha přísně regulována prostřednictvím tvorby zpětnovazebných smyček mezi MAPK a fosfatázami, které zajišťují kontrolu aktivity MAPK v prostoru a čase a zabraňují jejich aktivaci (Park *et al.*, 2011).



**Obr. 2** Příklad MAPK kaskády zapojené v reakci na oxidativní stres. Schéma znázorňuje základní princip činnosti MAP kinázových drah. Receptory vnímají specifické extracelulární podněty (označeny A, B, C), které aktivují kinázy MAPKKK a to vede k fosforylaci a aktivaci MAPKK. Některé

MAPKKK jsou také schopny aktivovat jiné protein kinázy (PK). MAPKK aktivují MAPK a ty fosforylují různé substráty (např. transkripční faktory, cytoskeletální proteiny nebo jiné kinázy a fosfatázy), které jsou pak přímo nebo nepřímo zodpovědné za odezvu na podněty. Šipky označují aktivaci dané cílové molekuly (převzato z Hirt, 2000).

## 2.3 Vlastnosti MAP kináz u rostlin

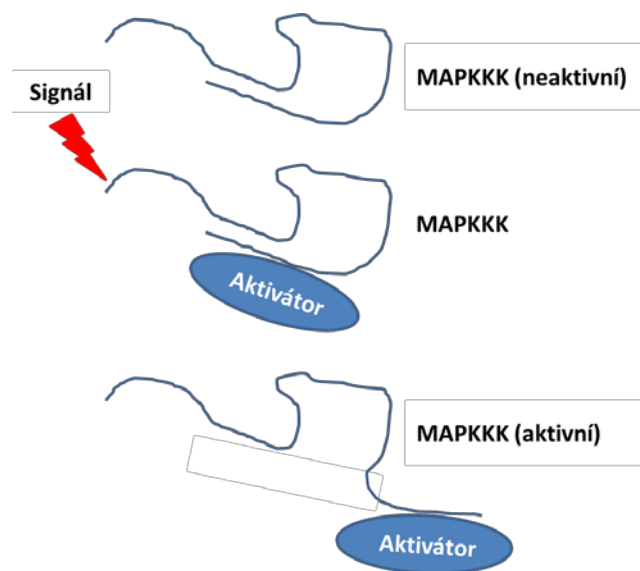
Genom *Arabidopsis thaliana* zahrnuje rozsáhlou skupinu členů MAP kinázové kaskády. Podle anotovaných sekvencí genů existuje přibližně 80 genů kódujících MAPKKK, 10 genů kódujících MAPKK a 20 genů pro MAPK (Rodriguez *et al.*, 2010). U *Arabidopsis* byly experimentálně prokázány všechny kinázy typu MAPKK a MAPK, stále však chybí mnoho informací o funkci 80 MAPKKK. Experimentálně bylo ověřeno pouze několik z nich, mezi které patří například kináza MEKK1 (MAP kináza nebo ERK kináza kináza 1; Asai *et al.*, 2002), YODA (Bergmann *et al.*, 2004), ANP (Krysan *et al.*, 2002), CTR1 (Kieber *et al.*, 1993), EDR1 (Zhao *et al.*, 2014), HT1 (Hashimoto-Sugimoto *et al.*, 2016), Raf43 (Virk *et al.*, 2015), SIS8 (Huang *et al.*, 2014) a některé další.

### 2.3.1 Charakterizace MAP3 kináz (MAPKKK)

Mitogenem aktivované protein kinázy skupiny MAP3K (tzv. Mitogenem Aktivované Protein Kinázy Kinázy Kinázy) patří mezi serin/treonin kinázy zahajující MAPK kaskádu (Craig *et al.*, 2008; Sinha *et al.*, 2011). Jak již bylo zmíněno (viz výše), MAP3K jsou aktivovány na základě vnějších či vnitřních podnětů a vedou k aktivaci MAP2K fosforylací. Genom *Arabidopsis* zahrnuje velkou proteinovou rodinu MAP3 kináz a díky rozmanitosti této skupiny mohou být vytvářeny různé varianty kaskád, ve kterých jsou zapojeny stejné MAP2K a MAPK (Jonak *et al.*, 2002; Menges *et al.*, 2008; Rodriguez *et al.*, 2010). Takovým příkladem jsou ANP MAP3 kinázy ovlivňující MPK4 prostřednictvím dvojité kinázy MKK6 pro regulaci cytokineze (Beck *et al.*, 2010, 2011; Komis *et al.*, 2011) nebo trojitá kináza MEKK1 ovlivňující opět MPK4 prostřednictvím MKK1/2 kinázy pro regulaci vrozené imunity (Gao *et al.*, 2008).

Sekvence aminokyselin primární struktury MAP3 kináz je tvořena centrální doménou s katalytickou aktivitou kináz, ohraničenou amino a karboxyterminálními doménami, které mají různé vlastnosti (Chong *et al.*, 2003). Umožňují upevnění MAP3K ke specifickým buněčným strukturám, například k plazmatické membráně (He *et al.*, 2006), endoplazmatickému retikulu (Ju a Chang, 2012), mikrotubulům (Beck *et al.*, 2010, 2011; Komis *et al.*, 2011), mitochondriím (Lampard *et al.*, 2014) nebo k jádru (Sasabe *et al.*, 2011), v závislosti na tom, kde by měla kaskáda plnit svou funkci. Další funkcí N a C-terminálních domén je autoinhibice udržující MAP3 kinázy v neaktivním stavu (Chong *et al.*, 2003). Podle charakteru kinázy je katalytická doména zablokována prostřednictvím N nebo C-konce. Například ANP MAP3 kinázy jsou inhibovány C-koncem, zatímco kináza YODA je blokována N-terminální doménou (Sasabe a Machida, 2012; Lukowitz *et al.*, 2004). Navázáním aktivátoru na autoinhibiční doménu dochází k uvolnění domény

s katalytickou aktivitou, což umožňuje opětovnou aktivaci MAP3K (Sasabe a Machida, 2012; Obr. 3). Tato vlastnost byla využita pro vytvoření konstitutivně aktivního mutantu  $\Delta$ Nyda s defektem v autoinhibiční funkci MAP3 kinázy YODA (Lukowitz *et al.*, 2004), který trvale aktivuje kinázy MPK3 a MPK6 a negativně ovlivňuje ontogenezi průduchů (Bergmann *et al.*, 2004).



**Obr. 3** Schéma autoregulace MAP3 kináz prostřednictvím N nebo C-terminální domény blokující aktivační oblast katalytické domény. Signál iniciuje navázání aktivátoru, katalytická oblast je uvolněna a MAP3K se stává aktivní.

Dalším příkladem MAP3 kináz s autoinhibiční doménou je NPK1 kináza objevena u rostlin tabáku. Gen pro NPK1 je homologní s třídou Arabidopsis ANP MAP3 kináz (Banno *et al.*, 1993) kam patří ANP1, 2 a 3 (Krysan *et al.*, 2002). NPK1 řídí proces tvorby fragmoplastu a uspořádání buněčné přepážky během buněčného dělení. Před samotnou cytokinezí je aktivita NPK1 (a ANP) autoinhibována regulační C-terminální oblastí kinázy (Sasabe a Machida, 2012), zatímco na počátku cytokineze dochází k fosforylaci serin/ treoninových zbytků C-terminální domény NPK1 prostřednictvím cyklin dependentních kináz (CDK; Ishikawa *et al.* 2002). Z experimentálních studií vyplývá, že některé Arabidopsis MAP3 kinázy zastupují specifické role při organizaci příslušných MAPK kaskád. Patří sem například CTR 1 kináza, lokalizovaná na endoplazmatickém retikulu, zapojená v signalizaci a vnímání etylénu (Kieber *et al.*, 1993), MEKK1 kináza regulující vrozenou imunitu a odezvu na abiotický stres (Kong *et al.*, 2012; Furuya *et al.*, 2014), ANP kinázy řídící průběh cytokineze (Beck *et al.*, 2010, 2011; Komis *et al.*, 2011) a MAP3 kináza YODA zapojená v regulaci embryogeneze, určování roviny dělení buněk a vývoje průduchů (Bergmann *et al.*, 2004; Lukowitz *et al.*, 2004; Smékalová *et al.*, 2014b).

### 2.3.2 Charakterizace MAP2 kináz (MAPKK)

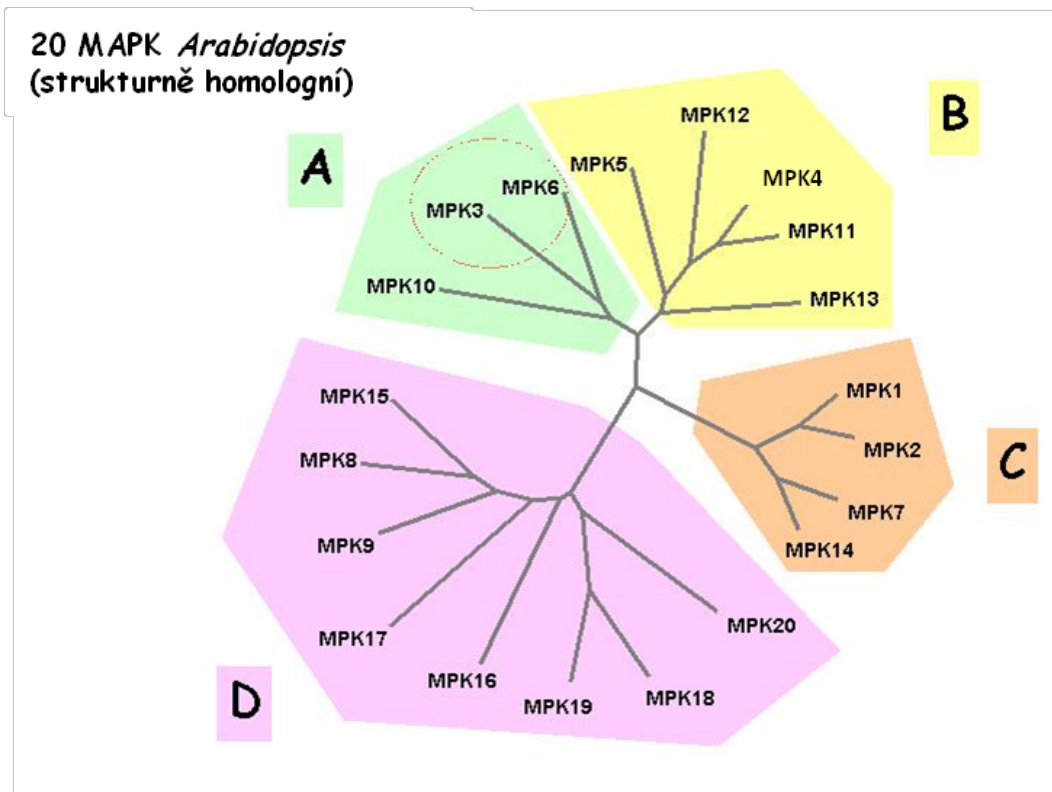
Mitogenem aktivované protein kinázy MAP2K (Mitogenem Aktivované Protein Kinázy Kinázy) tvoří specifickou skupinu členů proteinové super rodiny kináz. Stejně jako MAP3 kinázy patří mezi serin/treoninové kinázy, ale na rozdíl od ostatních členů MAPK kaskády jsou schopny díky duální specificitě současně fosforylovat treonin/tyrosinové zbytky v aktivační smyčce cílových MAPK (Wu *et al.*, 1993). MAP2K interagují s MAPK prostřednictvím D-motivu na N-terminálním konci, který je tvořen bazickými a hydrofobními zbytky aminokyselin. D-motiv (tzv. D-doména, z angl. Docking motif, nebo KIM motiv; Pitzschke, 2015) má podobu sekvence [K/R]1–2X2–6[L/I]-X-[L/I] (K-lysin, R-arginin, X-libovolná aminokyselina, L-leucin, I-izoleucin) a je kompatibilní s CD doménou MAPK (Ichimura *et al.*, 2002). Jak již bylo zmíněno, genom *Arabidopsis* kóduje mnoho různých MAP3K, ale pouze 10 MAP2K (Rodriguez *et al.*, 2010), z čehož vyplývá, že několik MAPK kaskád bude MAP2 kinázy sdílet (Jonak *et al.*, 2002).

MAP2 kinázy jsou aktivovány MAP3 kinázami, které jsou jim v signalizační kaskádě nadřazeny (tzv. upstream signalizace) a slouží jako jejich regulátory (Cheng a Karin, 2001; Keshet a Seger, 2010). Jak bylo popsáno v případě savčích MAP2 kináz MEK1 a MEK2 (členové Ras–Raf–MEK–ERK kaskády), k aktivaci MAP2 kináz dochází fosforylací serin/treoninových zbytků v aktivačním místě MEK1/2 protein kináz s duální specificitou (Raman, 2007). Toto uspořádání je konzervováno u všech eukaryotických organismů (Roskoski, 2012). Aktivaci MEK1/2 katalyzují Raf kinázy (Gardner *et al.*, 1994) a aktivované MEK1/2 následně zprostředkovávají fosforylací tyrosinu a treoninu kináz ERK1 a ERK2, které jsou jejich jedinými, doposud známými, fyziologickými substráty (Ray a Sturgill, 1988; Roskoski, 2012). Činnost MEK1/2 kináz je přísně regulována prostřednictvím zpětnovazebné inhibice fosforylací aktivovanou ERK kinázou (Roskoski, 2012), avšak tento mechanismus doposud nebyl podrobně studován u rostlin. MAP2 kinázy jsou stejně jako MAP3 kinázy zapojeny do signálních drah několika procesů, například MEK1/2 se podílí na regulaci vrozené imunity a při chladové aklimaci (Kong *et al.*, 2012; Furuya *et al.*, 2014), nebo MAP2 kinázy 4, 5, 7 a 9 jsou zapojeny v signalizační kaskádě MAP3 kinázy YODA při vývoji průduchů (Wang *et al.*, 2007). Kinázy MEK5 a 9 se navíc účastní signalizace při solném stresu (Xu *et al.*, 2008a), což potvrzuje, že různé MAPK kaskády se sbíhají na úrovni MAP2 kináz.

### 2.3.3 Charakterizace MAP kináz (MAPK)

Na konci typické MAP kinázové kaskády jsou mitogenem aktivované protein kinázy (MAPK, Mitogenem Aktivované Protein Kinázy), které rovněž patří mezi serin/treoninové kinázy. Stejně

jako ostatní členové MAP kaskády mají ve své struktuře centrální katalytickou doménu s aktivačním motivem T-X-Y (treonin-X-tyrosin), kde X může být zbytek kyseliny glutamové (E), asparagové (D), glycinu (G) nebo prolinu (P), zejména pak zbytky kyseliny asparagové a glutamové interagují se zbytky lysinu a argininu u MAP2 kináz (Tanoue *et al.*, 2000). U savců a kvasinek může být zbytek X-aminokyseliny použit pro klasifikaci různých MAPK, jako je například ERK kináza s TD/EY motivem (T-treonin, D-kys. asparagová/E-kys. glutamová, Y-tyrosin), kináza p38/Hog1p s TGY motivem (T-treonin, G-glycin, Y-tyrosin; Mittelstadt *et al.*, 2005) nebo JNK kináza s TPY motivem (T-treonin, P-prolin, Y-tyrosin; Davis, 1999; Kyriakis a Avruch, 2012). Všechny doposud identifikované rostlinné MAPK jsou homologní se savčí ERK kinázou a obsahují TD/EY motiv v aktivační smyčce (Nishimoto a Nishida, 2006), kromě imunoreaktivních druhů MAPK p38 (tj. proteiny reagující s protilátkou p38 ze savčích buněk při analýze Western blot), identifikovaných u pšenice (*Triticum turgidum* cv. Athos; Komis *et al.*, 2004) a u řas tolerantních k zasolení (*Dunaliella viridis*; Jiménez *et al.*, 2004). Podle sekvenčních homologií a evolučních vztahů jsou Arabidopsis MAPK klasifikovány do čtyř odlišných skupin A-D (Ichimura *et al.*, 2002; Obr. 4). Klasifikace MAPK je založena na evolučních vztazích mezi primárními sekvencemi MAPK a na typu fosforylačních motivů v aktivační smyčce (Menges *et al.*, 2008). Každá MAPK skupina zahrnuje kinázy, které spolu úzce souvisí díky sekvenční podobnosti a které se od ostatních skupin MAPK liší. Proteinová rodina rostlinných MAPK zahrnuje dva strukturální podtypy kináz: první z nich obsahuje v aktivační smyčce fosforylační motiv TEY, druhý TDY (Menges *et al.*, 2008). Skupina MAPK A, B a C obsahuje motiv TEY, zatímco vzdálenější skupina D patří mezi kinázy s TDY motivem (Ichimura *et al.*, 2002).



**Obr. 4** Schéma klasifikace a fylogenetické vztahy 20 MAPK *Arabidopsis thaliana*. Skupiny A-C obsahují v aktivační smyčce motiv TEY, zatímco MAPK skupiny D motiv TDY (pře-vzato z [http://mol.bio.mgh.harvard.edu/sheenweb/mapk\\_project.html](http://mol.bio.mgh.harvard.edu/sheenweb/mapk_project.html)).

Kromě aktivační smyčky se ve struktuře MAPK nachází také rozpoznávací místa, které se váží k již zmíněným D-motivům nebo jiným doménám interagujících proteinů – substrátů (Pitzschke, 2015). V několika studiích bylo popsáno, že MAPK interagují s buněčnými kompartmenty, jako jsou mikrotubuly (Beck *et al.*, 2010, 2011; Komis *et al.*, 2011; Smékalová *et al.*, 2014b), aktinový cytoskelet (Šamaj *et al.*, 2002) nebo s plazmatickou membránou a endosomálními váčky (Müller *et al.*, 2010). Doposud však není známo, zda jsou v těchto interakcích zapojeny pouze specifické domény, nebo k interakci dochází nepřímo prostřednictvím jiných proteinů. Prostorové uspořádání aktivační smyčky MAPK a substrátů umožňuje fosforylaci serinových nebo treoninových zbytků prostřednictvím aminokyseliny prolinu (S/T-P motivy), serin a treonin jsou totiž fosforylovány pouze tehdy, pokud následuje prolin (Pines a Hunter, 1990). V oblasti rozpoznávacího místa MAPK se nachází tzv. CD doména, která rozpoznává interakční kinázovou doménu (tj. D-motiv, viz výše) a všeobecně konzervovaný F-X-P-F motiv (F-fenylalanin, X-libovolná aminokyselina, P-prolin) proteinu interagujícího s příslušnou kinázou (Šamajová *et al.*, 2013; Pitzschke, 2015).



### 2.3.4 Úloha mitogenem aktivované protein kinázy MPK6 u *Arabidopsis*

Významnou úlohu při vývoji *Arabidopsis* zastupuje kináza MPK6, patřící mezi 20 MPK identifikovaných u *Arabidopsis thaliana* (MAPK Group, 2002). Bylo zjištěno, že tato kináza je zapojena do několika MAPK kaskád pro regulaci vrozené imunity po napadení patogenem (Pecher *et al.*, 2014; Yi *et al.*, 2015; Sidonskaya *et al.*, 2016), odezvy rostlin na abiotický stres, jako je například nadměrná salinita a osmotický stres (Liu *et al.*, 2013; Han *et al.*, 2014), teplotní stres (Li *et al.*, 2012; Evrard *et al.*, 2013) nebo oxidativní stres (Pérez-Salamo *et al.*, 2014). Několik studií také odhalilo, že MPK6 úzce souvisí s příbuznou skupinou kináz MPK3, a je zapojena do klíčových vývojových procesů. Mezi tyto procesy patří například formování průduchů kotyledonů a listů na abaxiální straně, prostřednictvím regulování orientace roviny dělení během jednotlivých fází tvorby stomat (Wang *et al.*, 2007). Ontogeneze průduchů je zahájena hormonální signalizací brassinosteroidů (Kim *et al.*, 2012), které spouští kaskádu MAP3 kinázy YODA, následuje aktivace MAP2 kináz MKK4/5/7/9 (Lampard *et al.*, 2009, 2014) a fosforylace MPK6 kinázy, iniciované s YODA signalizační kaskádou (Bergmann *et al.*, 2004).

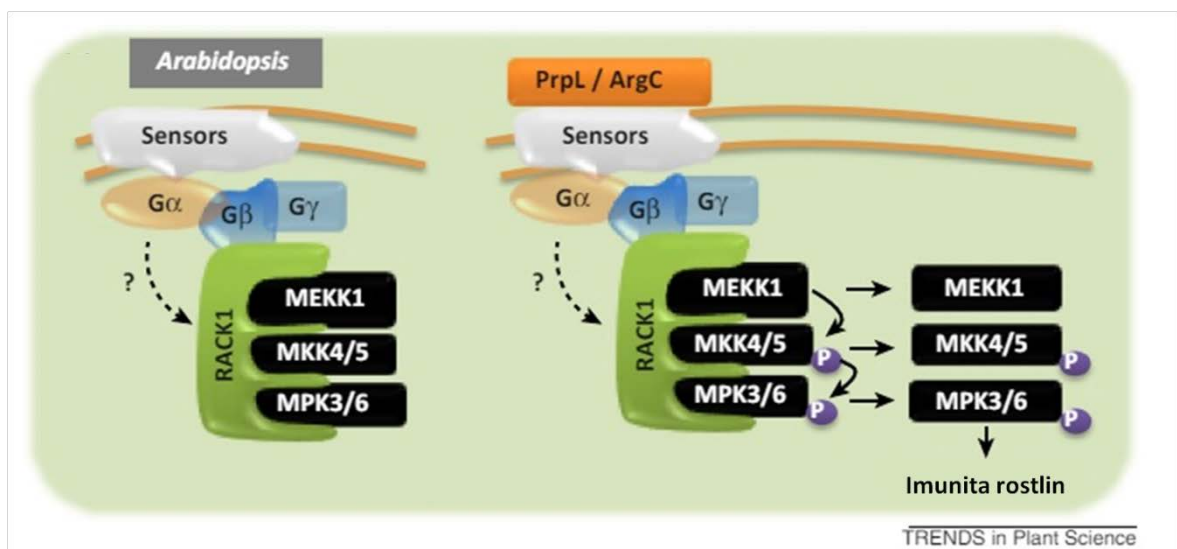
Rovněž bylo zjištěno, že YODA (a pravděpodobně také MPK3/6) kontrolují průběh embryogeneze (Lukowitz *et al.*, 2004; Bayer *et al.*, 2009) a postembryonální vývoj kořene (Müller *et al.*, 2010; Smékalová *et al.*, 2014b), a proto se uvažuje, že se tato kaskáda významně podílí na regulaci orientace roviny dělení buněk. Na základě těchto poznatků byla navržena ústřední role MPK6 při vývoji *Arabidopsis thaliana*, která byla potvrzena na základě identifikace několika fenotypů v jediné MPK6 u knock-out mutantů (Müller *et al.*, 2010; López-Bucio *et al.*, 2014; tato studie).

### 2.3.5 Buněčná lokalizace MAPK kaskád

Mnoho MAPK plní různé úlohy v závislosti na jejich buněčné lokalizaci. Často jsou MAPK po aktivaci přemístěny do jiné části buňky. Například savčí kináza ERK1/2, lokalizovaná na plazmatické membráně (Liang a Sheikh, 2016), se po aktivaci přemístí do jádra, kde fosforylací aktivuje transkripční faktory (Zehorai *et al.*, 2010; Roskoski, 2012). Řada členů MAPK kaskád (tj. MAP3K, MAP2K a MAPK) obsahuje ve své struktuře domény, které předurčují jejich subcelulární lokalizaci (Pitzschke, 2015). Takovým příkladem je již zmíněná *Arabidopsis* kináza MPK6, která je lokalizovaná v jádře. Aktivovaná MPK6 je transportována do jádra prostřednictvím interakce jaderného lokalizačního signálu (NLS, z angl. Nuclear Localization Signal) ve své struktuře, a transportního komplexu importin-RanGTPázy. Ven z jádra je transportována v neaktivní formě pomocí interakce jaderného exportního signálu (NES, z angl. Nuclear Export Signal) a komplexu

exportin-RanGTPázy (Šamajová *et al.*, 2013 a uvedené odkazy). Dalším příkladem je MAP3 kináza CTR1, která je nepřímo ukotvena na membráně endoplazmatického retikula prostřednictvím interakcí s etylenovým receptorem (Ju a Chang, 2012), zatímco členové YODA kaskády obsahují sekvence pro přímé ukotvení na membráně mitochondrií (Lampard *et al.*, 2014), případně mohou interagovat s membránovými efekty (např. s IRAK kinázami; Bayer *et al.*, 2009).

U živočišných buněk a kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* jsou MAP kinázy jednotlivých kaskád rozčleněny pomocí tzv. scaffold proteinů, které se váží ke všem MAPK členům, určují jejich subcelulární lokalizaci a umožňují prostorové oddělení odlišných signálních modulů se stejnými složkami (Chen a Thorner, 2007). Na rozdíl od kvasinek a živočichů byl u rostlin identifikován pouze jeden scaffold protein, tzv. RACK1 (Ron *et al.*, 1994), který propojuje signalizaci heterotrimerních GTPáz s MAPK kaskádou (Su *et al.*, 2015). Komponenty Arabidopsis MAPK kaskády [MEKK1 (MAP3K), MKK4/MKK5 (dvě vysoce homologní MAP2 kinázy) a MPK3/MPK6 (dvě vysoce homologní MAPK)] jsou v nepřítomnosti stimulů připojeny k plazmatické membráně prostřednictvím interakce s proteinem RACK 1 a komplexem G proteinů. RACK 1 asociuje s G $\beta$  podjednotkou heterotrimerických G proteinů a při stimulaci senzoru bakteriálními proteázami dochází ke spuštění MAPK kaskády a vyvolání imunitní odpovědi (Su *et al.*, 2015; Obr. 5).

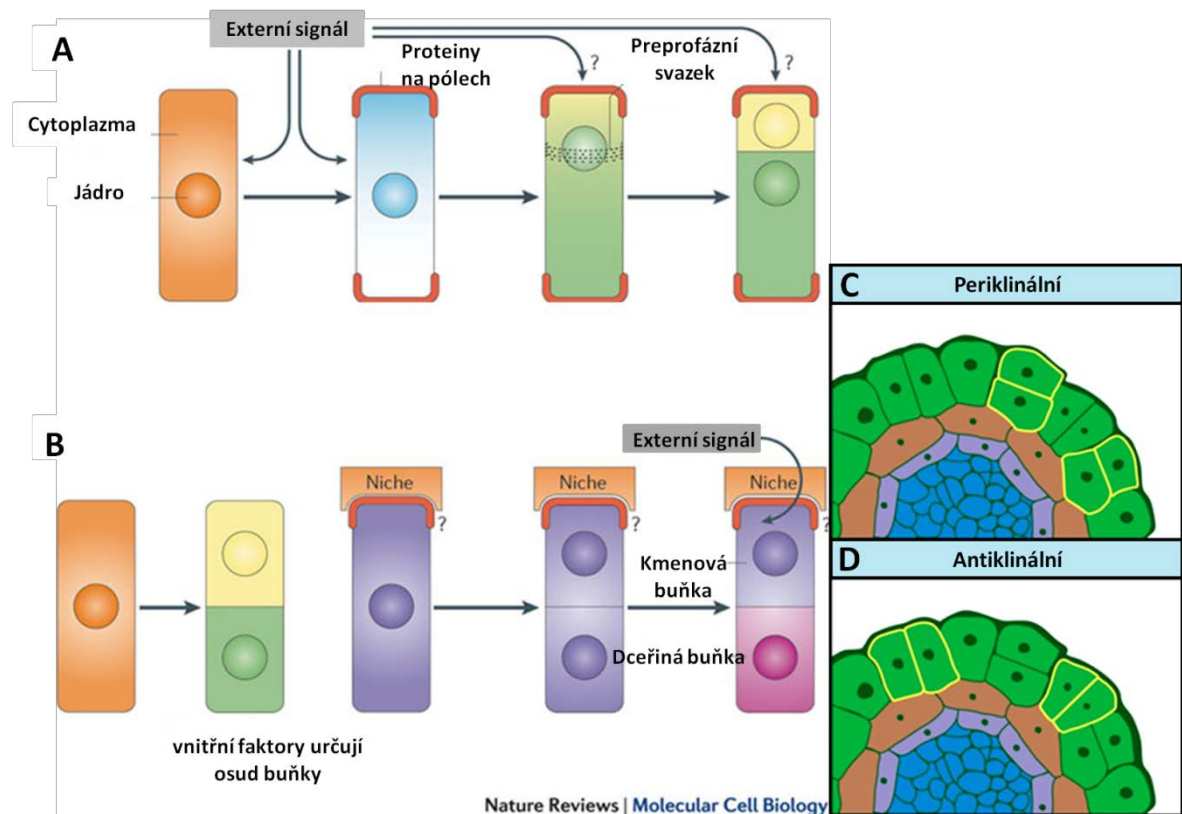


**Obr. 5** Schematické znázornění scaffold proteinů RACK 1 u rostlin. Členové MAPK kaskády jsou připojeny k plazmatické membráně pomocí RACK 1, asociovaného s G $\beta$  podjednotkou G proteinů. Při působení dvou typů proteáz (PrpL nebo ArgC) vylučovaných *Pseudomonas aeruginosa* a *Xanthomonas campestris* dochází ke stimulaci senzorů, aktivaci MAPK kaskády a oddělení všech MAPK komponent z jejich scaffold proteinu. Aktivované MPK3/MPK6 vyvolají imunitní odpověď prostřednictvím fosforylační aktivity jejich substrátů (převzato ze Su *et al.*, 2015).

### 3 Úloha cytoskeletu při buněčném dělení u rostlin

Jak již bylo zmíněno, rostliny jsou přisedlé organismy bez schopnosti pohybu. Rostliny se na toto omezení přizpůsobily vytvořením specifické architektury buněk a orgánů, které jsou formovány během procesů buněčného růstu, při utváření orientace roviny buněčného dělení a následné morfogenezi buněk (Wasteneys, 2002; Rasmussen *et al.*, 2011). Tyto procesy jsou ovlivňovány uspořádáním cytoskeletu, zejména kortikálních mikrotubulů, které interagují s komplexem pro syntézu celulózy na plazmatické membráně (Paredes *et al.*, 2006). Uspořádání kortikálních mikrotubulů tedy určuje orientaci celulózových mikro fibril a výslednou podobu buněčné stěny (Komis *et al.*, 2015; Watanabe *et al.*, 2015; Worden *et al.*, 2015).

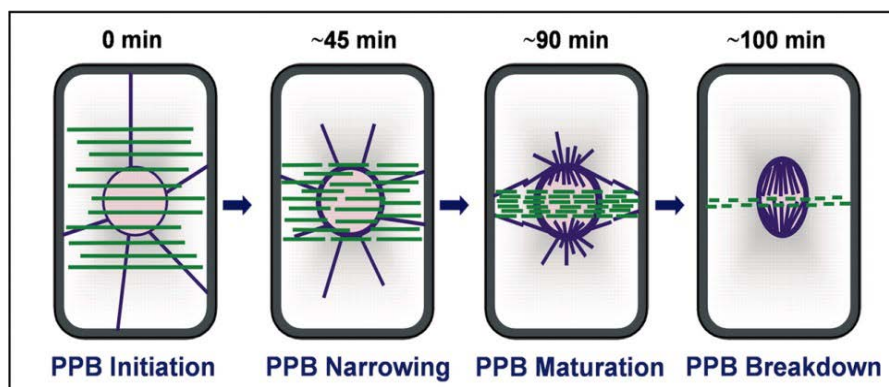
Růst a morfogenezi buněk významným způsobem ovlivňuje kontrola orientace roviny dělení buněk. U rostlin se vyskytují dva základní typy dělení buněk: prvním z nich je symetrické a vede k tvorbě dvou identických dceřiných buněk na konci cytokineze, zatímco výsledkem asymetrického dělení je tvorba dvou odlišných typů dceřiných buněk (Obr. 6). Ve vztahu k ose buňky mohou být oba typy dělení příčné, podélné, nebo šikmé, a zpravidla se buněčná přepážka tvoří v nejkratší vzdálenosti dvou protilehlých stěn mateřské buňky, bez ohledu na její tvar (Wright a Smith, 2007). Například buňky kořenového meristému jsou z velké části rozděleny symetricky, kdy je buněčná přepážka orientovaná příčně (tj. kolmo k povrchu kořene – antiklinálně, Obr. 6D), nebo podélně (rovnoběžně s povrchem kořene – periklinálně, Obr. 6C). Příčně rozdělené buňky určují expanzi odlišných typů buněk (tj. buněk epidermis, kortexu, endodermis, pericyklu a cévních svazků), zatímco podélné dělení je formativní a vytváří dceřiné buňky s různým osudem (Rost, 2011; Choi a Lim, 2016). Určení orientace roviny dělení buněk závisí na vnitřních a vnějších stimulech. Vnitřním stimulem může být například určité množství proteinů, signálních faktorů, hladina cytosolického vápníku, nebo pH (Hurst a Kropf, 1991; Gibbon and Kropf, 1993). Vnějšími stimulemi mohou být peptidové signály sousedních buněk nebo hladina hormonů, např. auxinu (Heidstra, 2007; Lee *et al.*, 2015; Hronková *et al.*, 2015). Na začátku každého dělení musí být nejprve stanovena polarita buňky, což je nezbytné pro určení pozice jádra před zahájením mitózy. Správné určení polarity je nesmírně důležité zejména při asymetrickém dělení (Obr. 6A).



**Obr. 6** Schéma průběhu (A) asymetrického a (B) symetrického dělení v závislosti na vnitřních či vnějších faktorech (převzato z De Smet a Beckman, 2011). Znázornění geometrie (C) periklinálního a (D) antiklinálního dělení buněk kořene (převzato z [http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL3530/DEVO\\_07/ch07f05.jpg](http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL3530/DEVO_07/ch07f05.jpg)).

### 3.1 Preprofázní svazek mikrotubulů a fragmoplast

Orientace roviny dělení buňky a místo utváření nové buněčné stěny je určeno umístěním preprofázního svazku mikrotubulů při mitóze (Lucas *et al.*, 2006). Preprofázní svazek (PPB, z angl. Preprophase microtubule band) vzniká uspořádáním kortikálních mikrotubulů do kruhu, který se vytváří u buněk vstupujících do mitózy na rozhraní S a G2 fáze buněčného cyklu (Mineyuki *et al.*, 1988). PPB může existovat po neurčitou dobu až po zahájení mitózy (Lipka *et al.*, 2015), kdy se postupně zužuje, až zcela zanikne při rozpadu jaderné obálky (Obr. 7; Lipka *et al.*, 2015).

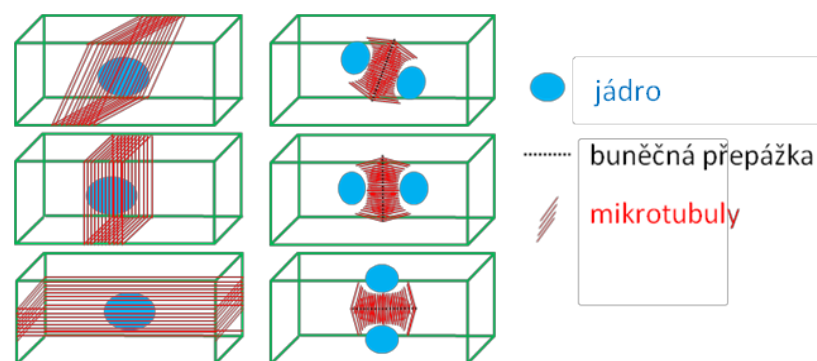


**Obr. 7** Schéma znázorňuje postupné shlukování kortikálních mikrotubulů do struktury PPB a následné zužování PPB až po vytvoření bipolárního profázního vřeténka (převzato z Dhonukshe a Gadella, 2003).

Vytváření svazku kortikálních mikrotubulů v průběhu formování PPB zajišťují specifické mikrotubulární proteiny (tzv. crosslinking proteiny), mezi které patří například protein asociovaný s mikrotubuly MAP65-1 (Beck *et al.*, 2010). Proteiny asociované s mikrotubuly (tzv. MAP proteiny, z angl. Microtubule Associated Proteins; Davis, 1993) se vážou na povrch mikrotubulů a stabilizují jejich strukturu proti depolymerizaci (Kreis a Vale, 1999). MAP proteiny nesou ve své struktuře dvě odlišné domény, z nichž jedna má kladný náboj a váže se elektrostatickými silami k záporně nabitému povrchu mikrotubulů (Hoshi *et al.*, 1992). Tato vazba je regulována prostřednictvím fosforylace, která je příčinou oddělení mikrotubulů od MAP proteinů (Ainsztein a Purich, 1994). Jak již bylo zmíněno, mitogenem aktivované protein kinázy fosforylují řadu substrátů, mezi které se řadí také MAP proteiny, a ovlivňují uspořádání cytoskeletu při odezvě na buněčné podněty (Davis, 1993). Existuje několik eukaryotických MAP proteinů, negativně regulovaných prostřednictvím fosforylace MAP kináz. Do této skupiny patří například savčí protein depolymerizující mikrotubuly - stathmin, savčí proteiny stabilizující mikrotubuly - MAP2 a MAP4 (Hoshi *et al.*, 1992), a rostlinné proteiny MAP65-1, -2 a -3 (Smertenko *et al.*, 2006; Beck *et al.*, 2010, 2011; Takahashi *et al.*, 2010; Sasabe *et al.*, 2011).

Není přesně známo, které děje určují pozici PPB, avšak podle modelu na obrázku 6 (viz výše) se rovina formování PPB téměř vždy shoduje s ekvatoriální (rovníkovou) rovinou jádra (Granger a Cyr, 2001). Bylo zjištěno, že PPB přesně definuje místa v buněčném kortexu pro umístění buněčné přepážky, kde se v průběhu cytokineze vytvoří fragmoplast a nová buněčná stěna (Lipka *et al.*, 2015; Obr. 8). Otázkou zůstává, jak dochází ke koordinaci roviny PPB a fragmoplastu v prostoru, protože PPB zaniká dlouho před tím, než se fragmoplast vytvoří (cca 45 min po zmizení PPB a nástupu mitózy Beck *et al.*, 2011). Uvažuje se, že PPB nějakým způsobem zanechává značku na vnitřním povrchu plazmatické membrány, v místě budoucího umístění buněčné přepážky. Některé studie identifikovaly proteinové markery, které jsou umístěny na kortikální straně PPB a trvají po celou dobu mitózy i po zániku PPB. Mezi tyto trvalé markery regulující

orientaci roviny dělení patří proteinová fosfatáza typu 2A, podjednotky FASS/TONNEAU - POK1/2 (Müller *et al.*, 2006), protein vázající mikrotubuly AIR9 (Buschmann *et al.*, 2006, 2015), protein TANGLED (Walker *et al.*, 2007) a RanGAP1 (Xu *et al.*, 2008b). Kromě AIR9 všechny zmíněné markery zůstávají na kortikální straně PPB po celou dobu mitózy. AIR9 je kolokalizován s PPB, takže mizí na počátku mitózy a znovu se objeví, když se fragmoplast začne rozšiřovat směrem od středu k obvodu buňky (Buschmann *et al.*, 2015).



**Obr. 8** Prostorové uspořádání PPB před mitózou a následná tvorba fragmoplastu při cytokinezi. Rozšiřování fragmoplastu vždy následuje orientaci PPB, bez ohledu na to, zda PPB definuje příčné, podélné, nebo šikmé umístění roviny dělení.

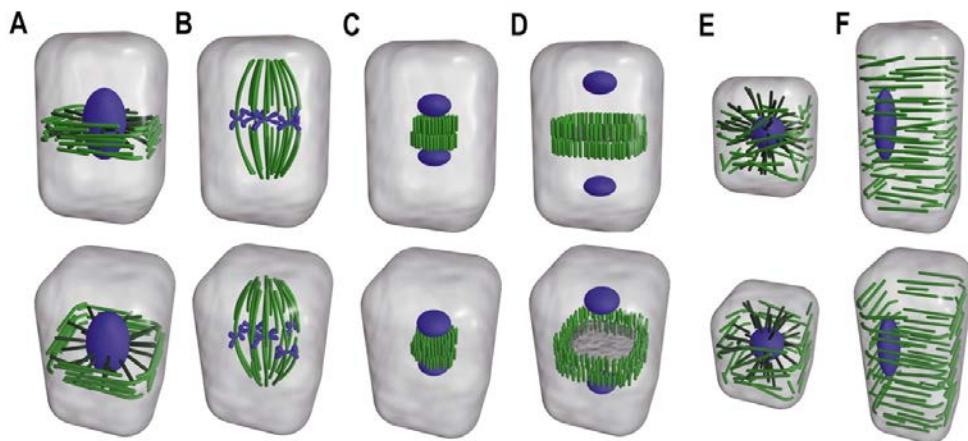
U mutantů výše zmíněných proteinových markerů se vyskytují výrazné defekty v kontrolování pozice roviny dělení buněk, avšak přesný mechanismus působení těchto markerů není doposud objasněn. Je pozoruhodné, že některé regulační proteiny, jako je například kináza MPK6 *Arabidopsis thaliana*, určitým způsobem interagují s PPB i fragmoplastem (Müller *et al.*, 2010; Smékalová *et al.*, 2014b). To naznačuje, že orientace roviny dělení buněk je regulována prostřednictvím fosforylačních dějů, jak bylo uvedeno v předchozích studiích (Colasanti *et al.*, 1993; Hush *et al.*, 1996; Ayaydin *et al.*, 2000; Mészáros *et al.*, 2000; Weingartner *et al.*, 2001; Hemsley *et al.*, 2001; Nogami a Mineyuki, 1999; Krupnova *et al.*, 2009).

### 3.2 Uspořádání cytoskeletu během mitózy

Ve všech eukaryotických organismech je účelem mitózy předání rodičovského genetického materiálu do dvou dceřiných buněk, nezávisle na tom, zda bude dělení asymetrické, nebo symetrické (Lipka *et al.*, 2015). Během mitózy v buňkách dochází k reorganizaci mikrotubulů do struktury mitotického vřeténka, které zajišťuje přesnou segregaci sesterských chromatid



k opačným pólům buňky (Bannigan *et al.*, 2008). Mitóza je zahájena vytvořením bipolárního, profázního vřeténka, které obklopuje jádro. V průběhu tvorby vřeténka se PPB zužuje a postupně rozkládá (Hasezawa a Kumagai, 2002). Kondenzované chromozomy se váží svými kinetochory na mitotické vřeténko a pomocí něj jsou organizovány v ekvatoriální rovině buňky (prometafáze až metafáze). Jakmile jsou chromozomy seřazeny, sesterské chromatidy se rozdělí a mitotické vřeténko táhne každý ekvivalent chromatid k opačným pólům buňky (anafáze). Poté, co se sesterské chromatidy dostanou k oběma pólům buňky, jsou kinetochorové mikrotubuly rozebrány a místo nich se vytvoří dvě sady antiparalelních mikrotubulů, které oddělují postupně vznikající dceřiná jádra. Tato struktura se nazývá fragmoplast a rozšiřuje se od středu k okraji buňky, dokud nenarazí na stěny mateřské buňky (Gunning, 1982). Mikrotubuly fragmoplastu dodávají do místa vzniku buněčné přepážky vezikuly z Golgiho aparátu, které obsahují polysacharidy pro výstavbu buněčné stěny (Yasuhara *et al.*, 1995; Sonobe *et al.*, 2000). Fúze vezikul a ukládání materiálu pro výstavbu buněčné stěny umožňuje tvorbu buněčné přepážky, která je prekurzorem stěny dceřiné buňky (cytokineze; Whaley a Mollenhauer, 1963). Na obrázku 9 je znázorněna reorganizace mikrotubulů v průběhu dělení u buněk rostlin, vzájemné uspořádání jádra nebo chromozomů, PPB, mitotického vřeténka a fragmoplastu.



**Obr. 9** Grafické znázornění přeskupení mikrotubulů během vybraných fází dělení buněk u rostlin. Struktury mikrotubulů jsou znázorněny zeleně, jádro a chromozomy modře. (A) Seskupení mikrotubulů do struktury PPB okolo jaderné ekvatoriální roviny. (B) Utváření mitotického vřeténka a připevnění k chromozomům. (C) Tvorba a (D) expanze fragmoplastu při cytokinezi mezi dvěma dceřinými jádry. (E, F) Obnovení a reorganizace kortikálních mikrotubulů po mitotickém dělení prostřednictvím nukleace mikrotubulů (převzato z Wasteneys, 2002).

Kromě mikrotubulů se při buněčném dělení účastní také aktinový cytoskelet. Během preprofáze jsou aktinová vlákna rozmístěna v kortikální oblasti, kde vytváří pás podobný PPB a tento útvar mizí na počátku mitózy (Panteris *et al.*, 2009). Aktinová mikrofilamenta se během mitózy vyskytují na obvodu buňky, avšak jsou přísně vyčleněny z kortikální oblasti preprofázního svazku až do nástupu cytokineze. Poté aktinová vlákna vytváří útvar, který následuje vzor uspořádání mikrotubulů do struktury fragmoplastu (Panteris, 2008). Po skončení mitózy je fragmoplast mikrotubulů a aktinových vláken iniciován mezi dvěma dceřinými jádry, kde usměrňuje pohyb vezikul, obsahujících materiál pro výstavbu buněčné stěny (Smith, 2001). Jak bylo již zmíněno dříve, aktivace MAP kináz má negativní vliv na vazbu cytoskeletálních proteinů a jejich elementů. Příkladem může být regulace aktin vázajícího protein - profilinu (tzv. ABP, z angl. Actin binding protein) prostřednictvím kinázy p45Ntf4 (Limmongkon *et al.*, 2004). Fosforylace snižuje asociaci profilinu k monomerům aktinu, a tak ovlivňuje tvorbu a dynamiku aktinového cytoskeletu (Yarmola a Bubb, 2009). Aktinová mikrofilamenta a mikrotubuly interagují prostřednictvím elektrostatických sil s asociovanými proteiny, a proto se předpokládá, že fosforylace narušuje tyto interakce a zeslabuje vazbu aktinu nebo mikrotubulů s asociovanými proteiny, například s ABP nebo MAP proteiny (Šamajová *et al.*, 2013).

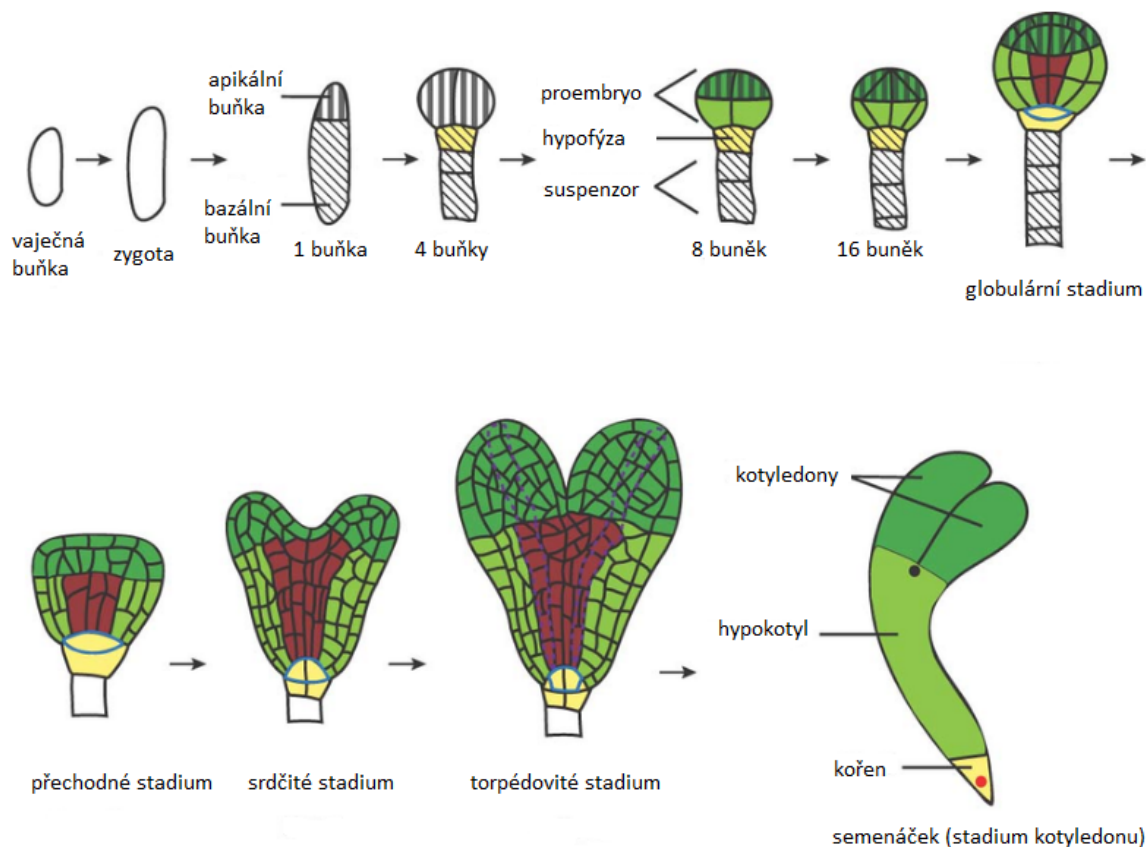


## 4 Vývoj kořene *Arabidopsis thaliana*

### 4.1 Embryogeneze *Arabidopsis*

Vývoj embrya rostliny *Arabidopsis thaliana* je přísně regulovaný proces, který vyžaduje přesnou posloupnost buněčného dělení a vede ke tvorbě dvouděložné sazenice s primárním kořenem a hypokotylem (ten Hove *et al.*, 2015). Proces embryogeneze úzce souvisí s hormonální (Robert *et al.*, 2015) a MAPK signalizací (Lukowitz *et al.*, 2004), zejména s činností MPK6 (a možná také MPK3) kináz signalizační kaskády YODA (López-Bucio *et al.*, 2014). Úloha MAPK v procesu embryogeneze není doposud známá, ale uvažuje se, že MAPK regulují prostřednictvím fosforylace některé specifické transkripční faktory (Jeong *et al.*, 2012; Musielak a Bayer, 2014). Účelem embryogeneze je vytvořit miniaturní dospělé rostliny, které se budou následně vyvíjet regulovaným dělením buněk meristémů všech vegetativních orgánů (Wendrich a Weijers, 2013). Jednotlivá stadia embryogeneze *Arabidopsis* jsou znázorněny na obrázku 10. Schéma naznačuje, že správná orientace roviny dělení buněk během embryogeneze je nezbytná pro vývoj rostliny.

Celý proces embryogeneze začíná oplozením vajíčka pylovým zrnem a následným formováním diploidní zygoty. První dělení zygoty je asymetrické a jeho výsledkem jsou dvě různé velké buňky (stadium 2 buněk). Menší z nich dává základ apikální části, která je v následujícím stadiu je rozdělena symetricky, větší buňka tvoří bazální část a postupně se vyvíjí do struktury suspensoru (stadium 4 buněk). Bazální buňka je následně rozdělena v sérii symetrického, příčného dělení na jednotné buňky suspensoru, zatímco apikální buňka se dvakrát rozdělí symetricky a vzniká proembryo tvořené stejnými buňkami (stadium 8 buněk; Jürgens a Mayer, 1994). Následné formování apikální části embrya je regulováno prostřednictvím porušení symetrie dělení v pozdním globulárním, přechodném a srdcovitém stadiu (Petricka *et al.*, 2009). Na konci embryogeneze se z apikální části vytváří děložní listy a hypokotyl, zatímco bazální část dává základ kořeni semenáčku (Jürgens a Mayer, 1994). Buňky suspensoru v průběhu embryogeneze zanikají, kromě kmenové buňky – hypofýzy v apikální části suspensoru, která tvoří základ kořenového apikálního meristému (RAM; Petricka *et al.*, 2012).



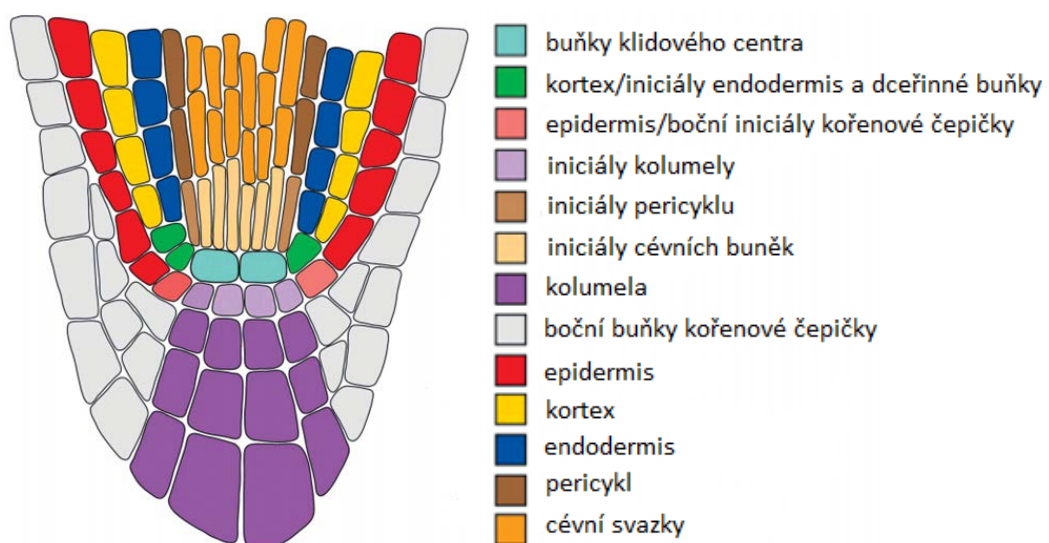
**Obr. 10** Schématické znázornění hlavních stadií embryogeneze *Arabidopsis thaliana*. Zelená barva označuje apikální část embrya, z níž vznikají kotyledony a hypokotyl. Bílou barvou je označen suspensor, který v průběhu embryogeneze zaniká. Žlutě je zvýrazněn suspensor, který dává vzniku kořene (převzato z Cederholm *et al.*, 2012).

#### 4.2 Architektura kořenového meristému dvouděložných rostlin

Struktura primárního kořene je utvářena prostřednictvím přísně regulovaného dělení buněk v apikálním meristému a následnou expanzí a diferenciací těchto buněk. Všechny typy buněk kořene vznikají z kořenového apikálního meristému (RAM), který se zakládá v raných stádiích embryogeneze (Altamura *et al.*, 2007). RAM charakterizují buňky klidového centra s nízkou aktivitou mitózy (QC; Doerner, 1998), obklopené kmenovými buňkami aktivních iniciál (Stahl a Simon, 2005). Soubor těchto dvou typů buněk se nazývá niche (Spradling *et al.*, 2000, 2001). Kmenové buňky se dělí asymetricky a diferencují se v různé typy buněk s odlišnou funkcí (Stahl a Simon, 2005), zatímco buňky klidového centra představují zónu pomalu se dělicích buněk (v počtu přibližně 500-600 buněk u zralé kukuřice; Clowes, 1959). Klidové centrum funguje jako rezerva buněk, které mohou přežít stresovou zátěž a regenerovat meristém. Kromě těchto dvou

typů buněk jsou v meristému přítomny také intenzivně se dělicí buňky, a to buď periklinálně, nebo antiklinálně. Smyslem periklinálního dělení je snaha zachovat organizaci souborů buněk, naopak antiklinální dělení podporuje růst jednotlivých souborů buněk pro udržení nepřetržitého růstu kořene (Wachsman *et al.*, 2015).

Dělení buněk kořene může probíhat ve třech rovinách: kolmo k ose kořene (antiklinálně), podél obvodu kořene (periklinálně), nebo paprskovitě (radiálně). Tyto způsoby dělení vedou ke zvětšování délky a šířky kořene. Samostatné dělení buněk na špičce kořene vytváří kořenovou čepičku, která se prodlužuje směrem dopředu a chrání vrchol kořene. Centrální buňky kořenové čepičky jsou často orientovány ve svislých řadách a bývají rychle opotřebovány při pronikání kořene půdními částicemi. Tyto buňky také vylučují glykoproteiny bohaté na mucigel a tím snižují tření mezi kořenem a půdní matricí (Oades, 1978). Kmenové buňky dávají vzniknout populaci rychle se dělicích progenitorových buněk, které reagují na vývojové stimuly. Progenitorové buňky se dělí asymetricky a produkují klonálně příbuzné buňky daného typu kořenového meristému. Po sérii dělení se tyto buňky diferencují v pletiva tvořící epidermis, kůru (kortex), endodermis a cévní pletiva v prodlužovací a diferenciační zóně (Perilli *et al.*, 2012). Od povrchu kořene do jeho středu jsou buňky organizovány do specifických vrstev: povrch kořene chrání buňky kořenové čepičky, následuje vrstva epidermis, kortex, endodermis, pericykl a středový válec, který obsahuje protoxylém a protofloém, základy cévních svazků. Kmenové buňky umístěné na středové rovině kořene udržují meristemickou aktivitu tvorby výše uvedených buněk kořenových pletiv. Na obrázku 11 je znázorněno uspořádání buněk kořene *Arabidopsis thaliana*.



**Obr. 11** Architektura tkáně kořene *Arabidopsis thaliana* (Stahl a Simon, 2005). Odlišné typy buněk apikální části kořene jsou označeny příslušnou barvou a uvedeny v legendě.

## 5 Imunofluorescence a mikroskopie jako nástroj k vizualizaci buněčných struktur

### 5.1 Imunofluorescenční značení proteinů

Detailní vizualizace struktury buněk a lokalizace proteinů vyžaduje specifickou, vysoce citlivou metodu. Takovou metodou je imunofluorescenční značení proteinů, dnes již běžně používaná laboratorní technika založená na principu vazby antigenu a protilátky. Antigenem je většinou protein, který chceme lokalizovat a na který se specificky váže protilátka (imunoglobulin) značená fluorescenční značkou - fluoroforem. Molekula fluoroforu má vlastnosti fluorescence a je schopna při osvětlení světlem určité vlnové délky absorbovat kvantum energie a následně jej vyzářit při vyšší vlnové délce. Detekovaný fluorescenční signál pak ve spojení s fluorescenční mikroskopií umožňuje podrobné studium buněk a jejich komponent.

Vlastností každé protilátky je schopnost rozpoznat a specificky se navázat na vazebnou oblast antigenu. Podle způsobu vazby se protilátky dělí do dvou základních skupin na monoklonální a polyklonální. Monoklonální protilátky jsou kopií jediné molekuly a váží se pouze na určitou oblast antigenu, kdežto polyklonální protilátky tvoří heterogenní směs imunoglobulinů (Ig) a mají schopnost vázat se na různá místa téhož antigenu. V případě použití monoklonálních protilátek se na jeden antigen může navázat pouze jedna značená protilátka, což umožňuje přesnou detekci hledaného proteinu. Avšak nevýhodou této techniky je slabý fluorescenční signál poskytovaný jedinou molekulou fluoroforu navázaného na protilátce. Proto se pro zesílení signálu používá technika, využívající protilátky dvě. První (primární) protilátka bez značky se specificky váže na cílovou molekulu antigenu, druhá (sekundární) protilátka nesoucí značku se poté váže k protilátce primární. V případě, že je sekundární protilátka polyklonální, má schopnost vázat se na různá místa antigenu a umožňuje tak navázání několika sekundárních protilátek na jednu primární. Tím se zvýší počet molekul fluoroforu a zesílí se fluorescenční signál.

#### 5.1.1 Imunolokalizace metodou whole mount

Většina doposud vyvinutých imunolokalizačních metod pro vizualizaci rostlinných pletiv vyžadují přípravu řezů, avšak tato příprava je velmi pracná, časově náročná a nevhodná pro větší množství vzorků. Řešením může být imunolokalizační metoda whole mount založená na principu vazby protilátky na antigen, která umožňuje rychlou a spolehlivou *in situ* lokalizaci proteinů ve tkáních a pletivech. Tato metoda je relativně jednoduchá a poskytuje vysoké rozlišení bez nutnosti přípravy tkáňových řezů. Zároveň umožňuje zachování integrity tkání/pletiv, což je velmi důležité pro vývojové studie. Protokol metody whole mount je vhodný zejména pro lokalizaci proteinů v buňkách kořenové špičky, postranních kořenů, mladých pletiv, hypokotylů, děloh a embryí *Arabidopsis thaliana*, také byl úspěšně použit pro tabák (*Nicotiana tabacum*) a kořeny rajčat

(*Lycopersicon esculentum*), (Sauer *et al.*, 2006). Hlavním omezením tohoto protokolu ale zůstává malá propustnost tkání a pletiv, kdy značené protilátky špatně pronikají do vnitřních vrstev buňky.

### 5.1.2 Provedení metody whole mount

Základem metody whole mount je pět kroků: fixace tkáně/pletiva, permeace, blokování a inkubace s primární a sekundární protilátkou (Sauer *et al.*, 2006). Každý z těchto kroků zahrnuje rozšířený postup, který je nutno dodržovat, aby mohla být metoda úspěšná. V této práci byl použit protokol dle Sauer a kol. (2006), který byl v naší laboratoři upraven (viz Materiál a metody), avšak principy jednotlivých kroků zůstávají stejné. Prvním krokem přípravy vzorků je fixace rostlin, která má za úkol imobilizovat antigeny a zachovat morfologii buněk, což je velmi důležité pro úspěšnou imunolokalizaci. Nesprávně provedená fixace může vést ke snížení fluorescenčního signálu nebo změně morfologie. Nejlepší výsledky fixace byly dosaženy při použití formaldehydu. Pro zajištění vstupu protilátek dovnitř buňky je nutná permeace buněčné stěny a buněčné membrány. Toho je dosaženo ve druhém kroku enzymatickým štěpením celulózy a pektinu, a použitím detergentu pro vytvoření malých pórů v membránách (extrakcí lipidů). Promývání po štěpení enzymem je velmi důležitým krokem, který je třeba provést velmi rychle a pečlivě. Ponechání rostlin v roztoku enzymů delší dobu nebo jeho nedostatečné promytí znamená zničení rostlinného pletiva a vzorků jako takových. Dalším krokem je redukce a provádí se z důvodu zablokování reaktivních aldehydických skupin na molekule glutaraldehydu (GA), na které by se mohla navázat protilátka a poskytovat falešný signál. Jako redukční činidlo slouží tetrahydridoboritan sodný ( $\text{Na}[\text{BH}_4]$ ), který je donorem alespoň dvou vodíků při reakci s GA. Následuje permeabilizace zajišťující propustnost membrány pro vstup protilátek dovnitř buňky a usnadnění přístupu protilátek k antigenům. Pro zvýšení propustnosti membrány se často používají detergenty, např. DMSO. Před navázáním protilátek je nutné zabránit jejich nespecifické interakci s ostatními antigeny ve vzorku, použitím 3% blokovacího roztoku s obsahem hovězího albuminu (BSA) rozpuštěného v pufru.

Prvních pět kroků metody whole mount můžeme nazvat jako kroky přípravné, protože předchází samotné aplikaci protilátek. Jak již bylo zmíněno, navázání protilátek na antigen je samotnou podstatou imunolokalizačních metod, mezi které metoda whole mount patří. Štěpením buněčné stěny a permeabilizací membrán byl umožněn vstup protilátek do vnitřních struktur buňky. Promývání po aplikaci primární protilátky musí být provedeno pečlivě, aby nedošlo k nespecifickému navázání sekundární protilátky a získání falešně pozitivního signálu. Volba sekundární protilátky konjugované s fluoroforem závisí především na excitačním a emisním spektru mikroskopu, který máme k dispozici (Sauer *et al.*, 2006). Primární protilátka navázaná v předchozím kroku na cílový antigen se stává antigenem pro sekundární protilátku. Ta nese

několik molekul fluoroforu, poskytujících zesílený fluorescenční signál pro lokalizaci daného proteinu.

## **5.2 Studium rostlin pomocí mikroskopických technik**

Rostlinné buňky a jejich struktury jsou velmi malé objekty, které nejsou viditelné pouhým okem. Proto jsou k jejich studiu využívány různé mikroskopické techniky umožňující pozorovat konkrétní struktury při různém zvětšení a ve spojení s imunofluorescencí mikroskopie poskytuje spolehlivý nástroj pro zviditelnění velmi malých objektů. Buněčné struktury a proteiny mohou být studovány pomocí následujících mikroskopických technik, které byly využity také v této studii:

- **Binokulární mikroskop Leica M165FC**

Jedná se variantu optického mikroskopu (tzv. stereoskopický mikroskop), který je určen pro pozorování vzorku při malém zvětšení. Světlo ze zdroje (např. led lampa) neprochází skrz vzorek, ale odráží se od povrchu objektu a vstupuje do objektivu. Přístroj používá dva oddělené optické trasy se dvěma objektivy a okuláry a zajišťuje tak mírně odlišné úhly pohledu pro levé a pravé oko.

- **Konfokální skenovací laserová mikroskopie (CLSM)**

Principem konfokální mikroskopie je vytváření optických řezů, kdy laserový paprsek ze zdroje prochází vzorkem a skenuje objekt bod po bodu tak, že zaměří paprsek na určitou rovinu preparátu pro sekvenční skenování bodů. Detekcí emitovaných fotonů z fluoroforů pak získáme informace o hledané struktuře. Energie laserového paprsku excituje zaměřenou oblast, zatímco emitované světlo prochází přes jedinou štěrbinu filtrující rozptýlené paprsky. Omezením konfokálního mikroskopu je rychlost snímání obrazu. Jediný laserový paprsek je limitován extrémně přesným řízením galvanometrických zrcadel, které se používají k rastrovacímu skenování paprsku procházejícího napříč vzorkem. Zároveň je omezen počet fotonů emitovaných vzorkem během prodlevy při snímání pixelů. Konfokální mikroskopy skenují vzorek rychlostí 1 mikrosekundy na pixel a v závislosti na rozměrech se rychlost přenosu dat pohybuje od jedné poloviny až po dvě sekundy na snímek. Proto je většina konfokálních laserových mikroskopů nepoužitelná pro studium dynamických procesů v živých buňkách, které se odehrávají v rámci milisekund (Davidovits a Egger, 1969, 1971).

- **Konfokální skenovací laserový mikroskop Spinning disc**

Jak již bylo zmíněno (viz výše), omezením konfokální laserové mikroskopie je pomalá rychlost snímání vzorku. Některá omezení konfokální skenovací mikroskopie mohou být překonána zobrazováním vzorku pomocí násobných excitačních paprsků, které působí paralelně. Toho může

být dosaženo při průchodu světla přes tzv. Nipkow disc, který obsahuje tisíce štěrbin uspořádaných ve spirále a umožňuje celkové osvětlení vzorku ve stejném čase (Petráň *et al.*, 1968).

- **Mikroskopie s diferenčním interferenčním kontrastem**

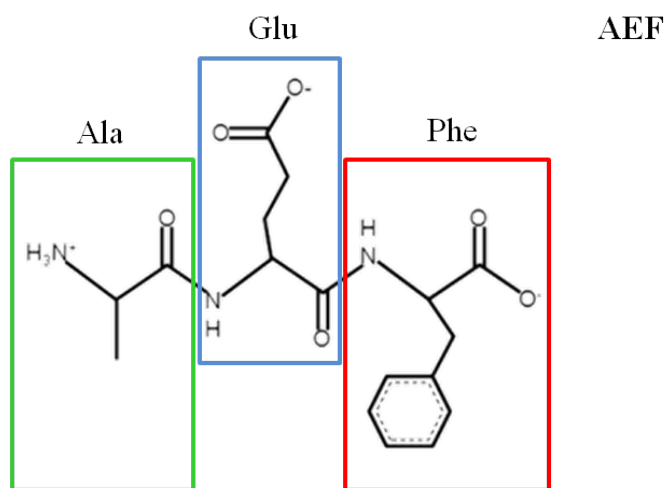
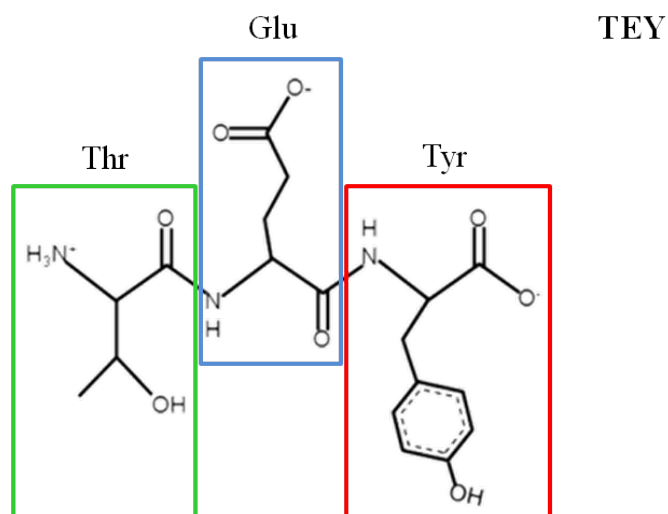
Embrya fixovaných vzorků byla studována pomocí mikroskopie s diferenčním interferenčním kontrastem (tzv. DIC mikroskopie; Allen *et al.*, 1969). Optický systém této mikroskopické techniky umožňuje zvýšení kontrastu nebarvených vzorků bez negativního halo efektu, který vzniká okolo objektů. Principem DIC mikroskopie je rozdělení vstupního paprsku polarizovaného světla ze zdroje do dvou oddělených paprsků. Vzdálenost mezi dvěma paprsky je vždy menší, než rozlišovací schopnost objektivu, aby se zabránilo výskytu dvojitého obrazu. Rozdělené paprsky prochází vzorkem a mění směr dráhy v závislosti na měnící se tloušťce vzorku a lomu světla. Po průchodu vzorkem paprsky nejsou stejně dlouhé, a proto je v soustavě zařazen další polarizátor, který paprsky usměrní. Světlo pak pokračuje směrem k okuláru, kde jej můžeme pozorovat jako rozdíly v barvě a intenzitě. DIC mikroskopie způsobuje, že na jedné straně se objekt jeví jako jasný, zatímco na druhé straně se zdá tmavší. Tento stínový efekt poskytuje pseudo trojrozměrný vzhled vzorku.

## 6 Použité genotypy rostliny *Arabidopsis* pro studium úlohy MPK6

V rámci experimentů byla použita modelová rostlina huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.), ekotyp Columbia (Col-0) a dva typy mutantních rostlin: *mpk6-4* a *MPK6AEF*. Ekotyp Columbia (varianta Col-0) je nejpoužívanější divoký typ (WT) *Arabidopsis thaliana* pro experimenty a *Arabidopsis*. Také byl použit jako WT pro sekvenování genomu *Arabidopsis*. Ekotyp Col-0 byl selektován Dr. Georgem P. Rédeiem díky tomu, že rostlina vykazovala mimořádnou fertilitu a dobře reagovala na fotoperiodu. Navíc tento ekotyp obsahoval nejnižší lichý počet chromozomových párů, pozorovaných do té doby u krytosemenných rostlin (Laibach, 1965).

Mutantní rostlina *mpk6-4* byla vytvořena inzercí T-DNA ve třetím exonu funkčního genu MPK6 u rostlin *Arabidopsis*, ekotypu Col-0. V důsledku přerušení funkční oblasti vložením inzertu nemůže docházet k transkripci mRNA a tvorbě produktu genu MPK6. U tohoto mutantu byly navíc inaktivovány obě kopie genu, proto je označován jako „knock-out“. Druhou mutantní rostlinou použitou při experimentech byla *MPK6AEF*, která byla vytvořena vnesením konstruktů *MPK6AEF* do mutantních rostlin *mpk6-4*. Cílenou mutagenezí byl motiv původních aminokyselin treoninu, kyseliny glutamové a tyrosinu (TEY) nahrazen za alanin, kyselinu glutamovou a fenylalanin (AEF). Mutace způsobuje defekt v aktivačním místě map-kinázy 6, která nemůže být aktivována fosforylací příslušných aminokyselin. Tento mutant je dominantně negativní (Bush a Krysan, 2007). Pro lokalizaci MPK6 v živých buňkách (tzv. *live imaging*) byly použity stabilně transformované rostliny *Arabidopsis thaliana*, exprimující fúzní protein MPK6-GFP (vytvořil Ivan Luptovčíak; Smékalová *et al.*, 2014b). Exprese byla řízena nativním promotorem genu MPK6 (proMPK6 :: MPK6-GFP) a tento transformant byl vytvořen na pozadí mutantu *mpk6-2* (Müller *et al.*, 2010), postrádajícího endogenní expresi MPK6 (Bush a Krysan, 2007).





**Obr. 12** Schéma znázorňuje uspořádání TEY motivu aminokyselin v aktivačním místě smyčky MPK6 proteinu, v porovnání s neaktivní variantou motivu AEF. Zelený obdélník poukazuje na rozdíly ve struktuře Thr a Ala, modře je označen Glu (beze změny u obou motivů) a červený obdélník srovnává strukturu Tyr a Phe. Strukturální podobnosti mezi aminokyselinami Thr/Ala a Tyr/Phe dokazují, že motiv AEF byl navržen tak, aby minimálně rušil terciární strukturu MPK6. Struktura peptidu byla navržena pomocí online programu PepDraw (<http://www.tulane.edu/~biochem/WW/PepDraw/>).

## 7 Cíle práce

Předložená diplomová práce byla zaměřena na studium regulačních mechanismů subcelulární lokalizace a funkce jedné z hlavních MAP kináz *Arabidopsis thaliana*, MPK6. Předchozí studie prokázaly, že MPK6 je lokalizována převážně v buněčném jádře (Ahlfors *et al.*, 2004; Umbrasaite *et al.*, 2010). Pomocí imunofluorescenčního značení a kvantitativní fluorescenční mikroskopie ve spojení s biochemickou analýzou, bylo zjištěno, že MPK6 může asociovat s mikrotubulárními strukturami, jako je například PPB a fragmoplast (Smékalová *et al.*, 2014b), endocytotickými váčky, s plazmatickou membránou, nebo s Golgiho aparátem (Müller *et al.*, 2010). MPK6 mutantní navíc vykazují různé defekty vegetativního růstu, které vznikají v důsledku porušení orientace roviny buněčného dělení (Müller *et al.*, 2010; Smékalová *et al.*, 2014b).

S ohledem na výše uvedené informace úlohy MPK6 ve vývoji *Arabidopsis*, člena signální kaskády YODA, byly položeny dvě zásadní otázky: zda je jaderná lokalizace MPK6 podmíněna duální fosforylací této kinázy, a zda souvisí lokalizace MPK6 na fragmoplastu s duální fosforylací MPK6? Cílem této studie bylo zpracovat literární rešerši na téma úlohy signálních kaskád mitogenem aktivovaných protein kináz při vývoji kořene *Arabidopsis thaliana*, a experimentálně ověřit subcelulární lokalizaci a funkci jedné z hlavních kináz MAPK signalizace, MPK6. Pro experimenty byly použity dva typy mutantních rostlin *Arabidopsis* s defektem v genu pro MAP kinázu MPK6 (knock-out mutant *mpk6-4* a dominantně negativní mutant *MPK6AEF*) a odpovídající kontrolní rostlina (Col-0). Experimentální práce byla rozčleněna do několika etap, které byly věnovány následujícím cílům:

1. Charakterizace celkového fenotypu semenáčků a dospělých rostlin zmíněných genotypů rostlin *Arabidopsis* pomocí stereomikroskopie a makroskopického hodnocení vzrůstu rostlin.
2. Studium embryogeneze zmíněných genotypů rostlin pomocí mikroskopie s diferencčním interferenčním kontrastem.
3. Detailní srovnání mutantů a kontrolní rostliny na vnitrobuněčné úrovni:
  - a) Studium organizace cytoskeletu a utváření buněčné přepážky v průběhu dělení buněk kořene pomocí imunoznačení tubulinu a fluorescenční mikroskopie.
  - b) Studium subcelulární lokalizace MPK6 v buňkách kořene fixovaných rostlin pomocí imunofluorescenčního značení a konfokálního skenovacího mikroskopu Spinning disc.
  - c) Studium subcelulární lokalizace MPK6 v buňkách kořene nativních vzorků pomocí MPK6-GFP markeru a konfokálního mikroskopu Spinning disc.
4. Studium lokalizace MPK6 po inhibici nukleocytoplazmatického transportu a po inhibici aktivace MAPK v buňkách kořene nativních a fixovaných vzorků.

## 8 Materiál a metody

### 8.1 Rostlinný materiál

- *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, ekotyp Columbia (Col-0)

Mutantní rostliny s poruchou v kódování genu MPK6:

- *Arabidopsis thaliana* - mutant *mpk6-4* na pozadí ekotypu Col-0
- *Arabidopsis thaliana* - mutant *MPK6AEF* na pozadí mutantu *mpk6-4*

### 8.2 Pozorování fenotypu semenáčků a dospělých rostlin

Kultivace rostlin probíhala ve sterilních *in vitro* podmínkách v růstové komoře. Semínka byla vyseta na čtvercové Petriho misky s tuhým MS médiem (Murashige-skoog) o poloviční koncentraci látek (1/2 MS), bez vitaminů. Pro pozorování fenotypu dospělých rostlin byly semenáčky po kultivaci na 1/2 MS médiu přeneseny do květináčů se zeminou a kultivovány v růstové komoře.

#### 8.2.1 Příprava semen

Před výsevem semen na kultivační médium byla provedena jejich povrchová sterilizace. Sterilizační roztok byl připraven zředěním zásobního 10% roztoku chlornanu sodného (NaClO) na 1% roztok, do kterého byla přidána 1 kapka detergentu Tween 20.

Do mikrozkušavek o objemu 1,5 ml bylo naváženo přibližně 2 mg semínek, což odpovídá množství asi 100 ks semínek. Poté byl do každé mikrozkušavky přidán 1 ml sterilizačního roztoku a v tomto roztoku byla na třepačce semínka 10 min inkubována. Další manipulace se semínky probíhala ve sterilním prostředí laminárního boxu při použití sterilních nástrojů a roztoků. Pomocí automatické pipety bylo nejprve ze zkušavek odstraněno co největší množství sterilizačního roztoku, poté byl přidán 1 ml 70% etanolu a po krátkém protřepání byl ze zkušavek etanol odstraněn. Následně byla semínka čtyřikrát propláchnuta destilovanou vodou a při posledním promytí byla voda ve zkušavce se semínky ponechána. Během oplachování vodou bylo opět nutné zkušavky důkladně protřepat, aby na povrchu semínek nezůstal etanol nebo sterilizační roztok, který by zabránil jejich klíčení.

### **8.2.2 Příprava kultivačního média a výsev semen**

Semenáčky *Arabidopsis* byly kultivovány ve sterilních *in vitro* podmínkách na ½ MS médiu. Vysterilizované médium bylo ve sterilním prostředí laminárního boxu naléváno na čtvercové Petriho misky (120×120 mm). Poté bylo pomocí automatické pipety (100 µl) vyseto na každou misku přibližně 100 semínek. Pro snadnější vysévání semínek na agarové plotny byl sterilně ustřižen konec plastové špičky. Všechny nástroje použité při výsevu semínek byly sterilní, případně byly vysterilizovány desinfekčním roztokem Spitaderm či 70% etanolem. Uzavřené misky byly zalepeny parafilmem a umístěny v horizontální poloze do lednice (4 °C, tma) do druhého dne, aby došlo k synchronizaci klíčení. Misky s rostlinami byly přeneseny do kultivační komory (fytotron), kde byly umístěny vertikálně a kultivovány příslušný počet dní (23 °C, 16h světlo/8h tma).

### **8.3 Příprava embryí**

Z rostlin pěstovaných v květináčích bylo posbíráno přibližně 50 šešulí, které byly umístěny do zkumavky s 10 ml fixačního roztoku (viz Seznam použitých roztoků) po dobu 24. Pro izolaci embryí bylo připraveno Hoyerovo fixační médium. Na podložním skle byla v kapce média vypreparována jednotlivá embrya, překryta krycím sklem a okraje krycího sklíčka byly přetřeny bezbarvým lakem, aby se zabránilo odpařování vody.

### **8.4 Pozorování struktury kořene nativních vzorků**

Pro pozorování struktury kořene živých vzorků bylo použito značení s FM4-64. Zředěním zásobního roztoku byl připraven pracovní roztok o koncentraci 4 µmol/l (zásobní roztok se uchovává při -20 °C v alobalu, aby nedošlo k jeho degradaci světlem). Rostliny kultivované 5 dní na Petriho miskách s pevným ½ MS médiem byly inkubovány 10 min v mikrozskumavkách s pracovním roztokem FM4-64, poté byly přeneseny na podložní sklo do kapky pracovního roztoku a přikryty krycím sklem (24×32 mm), připevněným izolepou k podložnímu sklu.

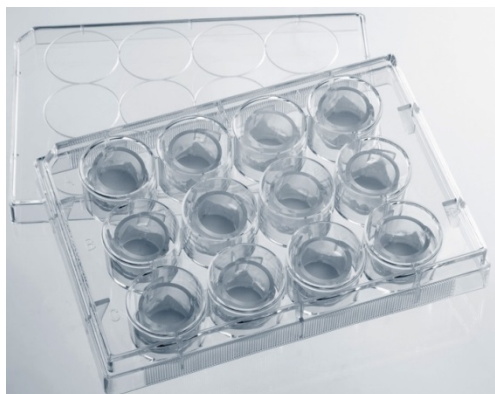
### **8.5 Metoda whole mount**

Tato metoda je založena na principu imunofluorescence a vyžaduje speciální postup přípravy vzorků. Pro tuto studii byl použit protokol dle Sauer a kol. (2006), který byl v naší laboratoři upraven. Byly zaměněny některé přípravné kroky, použity jiné chemikálie a také byla pozměněna doba inkubace s protilátkami (viz níže).

## 1) Fixace

Roztok PFA byl připraven rozpuštěním 16 g práškového paraformaldehydu ve 150 ml ultra čisté miliQ vody za stálého míchání na magnetické míchačce a mírného zahřívání (asi 30 min). Do horkého roztoku mléčné barvy byla pomocí pinzety ponořena 1 tableta KOH, pH bylo upraveno na hodnotu přibližně 10 a barva roztoku přešla z mléčné na čirou. Následně bylo přidáno 4 – 10 ml glycerolu, roztok byl doplněn na objem 200 ml a uchován při pokojové teplotě. Roztok PFA je toxický, proto je nutné vždy pracovat v digestoři a s ochrannými pomůckami.

Pro samotný proces fixace byl připraven fixační roztok (viz Seznam použitých roztoků) a pomocí pasteuovy pipety byl podle potřeby rozdělen do jamek dvanácti jamkové plastové destičky pro buněčné kultury (Obr. 13). Rostliny staré 5 dní, kultivované na Petriho miskách s ½ MS médiem, byly přeneseny do plastových košíků (tzv. inzerty s membránou), které byly umístěny v jamkách kultivační destičky s fixačním roztokem po dobu 1 hod. Inzerty a kultivační destičky byly před zahájením fixace opláchnuty v miliQ vodě, aby se snížilo množství nečistot ve vzorku. Kvůli toxicitě PFA a GA bylo nutné pracovat v digestoři. Pomocí pasteuovy pipety byl z jamek destiček odstraněn fixační roztok a místo něj byl přidán 10× zředěný promývací pufr stabilizující mikrotubuly (MTSB). Rostliny byly s pufrem promývány 3×10 min. Pomocí pasteuovy pipety byly roztoky vždy odstraňovány a přidávány do prostoru mezi stěnou jamky a plastového košíku, aby se zabránilo poškození rostlin.



**Obr. 13** Dvanácti jamková destička pro buněčné kultury

## 2) Enzymatické štěpení buněčné stěny

Po promývacím kroku bylo odstraněno co největší množství pufru MTSB, ihned poté byl přidán roztok enzymů (viz Seznam použitých roztoků) a rostliny byly inkubovány 40 min při pokojové teplotě. S enzymatickým roztokem bylo nutné pracovat velice rychle, aby byly zajištěny rovnoměrné podmínky štěpení buněčné stěny. Roztok enzymů byl po inkubaci s rostlinami co

nejrychleji odstraněn, vrácen zpět do zkumavky a uchován při -20 °C; ihned po jeho odstranění byl nahrazen promývacími pufrů. Rostliny byly nejprve promývány MTSB pufrů 2×10 min a poté fosfátovým pufrů (PBS) 3×10 min. Pufr PBS nahrazuje MTSB proto, aby se zabránilo reakci MTSB s Na[BH<sub>4</sub>] v následujícím kroku (redukce). Při práci s větším množstvím vzorků byly pomocí pinzety přeneseny plastové košíky do jamek s připraveným pufrů. Tento způsob byl použit také po redukci a reakci s protilátkami (viz níže).

### **3) Redukce**

Přímo do plastových košíků s rostlinami, ponořených v PBS pufru (přibližně 3 ml pufru v jamce), bylo pomocí kovové mikrolžičky přidáno malé množství Na[BH<sub>4</sub>]. Množství této látky odpovídalo zhruba jedné zarovnané mikrolžičce pro jeden vzorek. Po uplynutí 30 min byly košíky přeneseny do jamek s PBS pufrů (bez Na[BH<sub>4</sub>]) a poté byly 4× promyty PBS.

### **4) Permeabilizace**

Pro permeabilizaci byl použit roztok s přídavkem dimetylsulfoxidu (DMSO). Po 30 min inkubaci s permeabilizačním roztokem (viz Seznam použitých roztoků) byl tento roztok odstraněn pomocí pasturovy pipety a vzorky byly 5× promyty pufrů PBS.

### **5) Blokování**

Po odstranění PBS z předchozího promývacího kroku byl aplikován blokovací roztok po dobu 1 hod.

### **6) Inkubace rostlin s primární protilátkou**

Roztok primární protilátky byl připraven zředěním protilátek v 3% BSA s PBS. Jako primární protilátky byly zvoleny: monoklonální potkaní protilátka anti- $\alpha$ -tubulin a polyklonální králičí protilátka anti-MPK6. Plastové košíky s rostlinami byly před ponořením do roztoku protilátek lehce osušeny na filtračním papíře a pomocí pinzety přeneseny do nové kultivační destičky o menší velikosti jamek (24 jamková destička) s 800  $\mu$ l roztoku protilátek v každé jamce. Kultivační destička byla přikryta víčkem a inkubace s primární protilátkou probíhala 24 hod při pokojové teplotě. Poté byly plastové košíky přeneseny zpět do větších jamek s PBS pufrů a promyty 9×10 min. Primární protilátka byla po inkubaci vrácena zpět do zkumavky (v ledu) a uchována při -20 °C.

### **7) Inkubace rostlin se sekundární protilátkou a promývání**

Pro zvýšení čistoty vzorků bylo před aplikací sekundární protilátky provedeno blokování pomocí 3% blokačního roztoku BSA, stejně jako před aplikací primární protilátky. Inkubace s blokačním

roztokem trvala přibližně 1 hod, poté byly plastové košíky lehce osušeny na filtračním papíře a přeneseny do jamek s roztokem sekundární protilátky. Roztok byl vytvořen zředěním sekundární protilátky 3% BSA v PBS v poměru 1:1000, inkubace s rostlinami probíhala 3 hod při teplotě 37 °C, nebo může probíhat při 4 °C po dobu 24 hod. Jako sekundární protilátky byly zvoleny: Alexa Fluor 488 anti-potkaní IgG a Alexa Fluor 546 anti-králičí IgG. Po inkubaci byla protilátka odstraněna (sekundární protilátka se neuchovává) a vzorky byly promyty 6×10 min v pufru PBS.

### **8) Inkubace s DAPI a promývání**

Pro barvení jader byla použita barva DAPI, která snadno prochází membránou a váže se na DNA. Pracovní roztok DAPI byl připraven ředěním 1:1000 s pufrem PBS a rostliny byly inkubovány 15 min při pokojové teplotě. Poté byly vzorky 1 - 2× promyty PBS.

### **9) Příprava preparátů pro imunolokalizaci**

Dvě až tři rostliny byly opatrně přeneseny na podložní sklo do kapky zalévacího média (viz Seznam použitých roztoků) a překryty krycím sklíčkem, ze dvou stran zafixováno lakem na nehty. Takto připravené vzorky byly uchovávány v boxech na sklíčka (např. Heathrow Scientific) při -20 °C a poté pozorovány pomocí konfokálního laserového mikroskopu Spinning disc.

Zalévací médium brání tvorbě kyslíkových radikálů a tím snižování fluorescenčního signálu, proto tvoří nezbytnou součást preparátů pro whole mount. Médium bylo připraveno rozpuštěním parafenylendiaminu (P-fenylendiamin) v DMSO. Práškový P-fenylendiamin byl velmi opatrně promíchán s DMSO, aby se co nejvíce zabránilo kontaktu prášku se vzduchem a nedošlo k jeho oxidaci. Poté byl přidán glycerol a pufr Tris o alkalickém pH 8,8, při kterém je fluorofor nejvíce aktivní. Roztok byl opatrně promíchán skleněnou tyčinkou, zkumavka byla obalena do alobalu (ochrana před fotodestrukcí) a uchována při -20 °C. Prášek (nebo roztok) P-fenylendiaminu musí mít světle růžovou barvu, která postupem času tmavne a jehož degradace může být urychlena na světle. Při použití degradovaného nebo starého média dochází při imunolokalizaci k rychlému zhášení fluorescence, což má za následek velmi nízký nebo nulový fluorescenční signál.

## **8.6 GFP lokalizace**

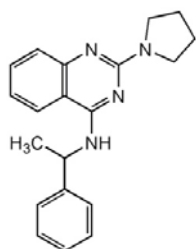
Pro lokalizaci MPK6 v živých rostlinách byly použity stabilně transformované rostliny *Arabidopsis thaliana*, exprimující fúzní protein MPK6-GFP (připravil a laskavě poskytl Ivan Luptovčíak; Smékalová *et al.*, 2014). Rostliny ekotypu Col-0, kultivované 5 dní na ½ MS médiu, byly inkubovány 4 hod v roztoku DMSO. Dále byly inkubovány 4 hod s roztokem inhibitoru (importazol v DMSO, viz níže).

## 8.7 Aplikace inhibitorů

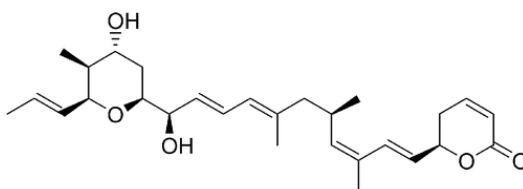
Inhibitory byly aplikovány na rostliny před fixací pro whole mount. Rostliny byly inkubovány v pracovním roztoku příslušného inhibitoru po dobu 4 h.

- **Importazol** je chemická sloučenina (2,4-diaminoquinazolin), která slouží jako inhibitor importinu- $\beta$ . Inhibice spočívá v soutěžení o vazbu RanGTPázy mezi importazolem a importinem- $\beta$  (Söderholm *et al.*, 2011). V předložené experimentální práci byl použit pracovní roztok importazolu o koncentraci 50  $\mu\text{mol/l}$  v tekutém  $\frac{1}{2}$  MS médiu, který byl připraven zředěním 10 mM zásobního roztoku importazolu rozpuštěného v DMSO.
- **Ratjadon C** je kovalentní, nereverzibilní inhibitor proteinů typu CRM1/exportin1, zajišťujících jaderný export. Blokuje navázání CRM1/exportinu1 na NES (tzv. jaderný exportní signál: Nuclear export signal) u proteinu určeného k transportu ven z jádra a také brání navázání RanGTPázy (Köster *et al.*, 2003) Z hlediska chemické struktury se jedná o buněčně propustný polyketid (Bhatt *et al.*, 2001). Pracovní roztok ratjadonu C byl připraven zředěním zásobního roztoku o koncentraci 1  $\mu\text{M}$  tekutým  $\frac{1}{2}$  MS médiem na koncentraci 5 nM.
- **PD98059** je inhibitorem MEK1/MEK2 MAP2 kináz, který s těmito kinázami soutěží (kompetuje) o navázání ATP (Dudley *et al.*, 1995). Proto nepřímo inhibuje funkci MAPK tím, že brání jejich dvojité fosforylaci a aktivaci. V této studii byl použit 50  $\mu\text{M}$  pracovní roztok PD98059 v tekutém  $\frac{1}{2}$  MS médiu, který byl vytvořen zředěním zásobního 10 mM roztoku inhibitoru PD98059, rozpuštěného v DMSO.

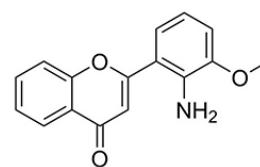
Inhibitory importazol a PD98059 jsou k dostání v podobě hydrofobního prášku. Jednotlivé částice proto musí být nejprve rozptýleny v DMSO a poté mohou být smíchány s hydrofilním roztokem tekutého  $\frac{1}{2}$  MS média. Naopak inhibitor ratjadon C má hydrofilní charakter, proto je přímo smíchán s tekutým médiem.



importazol



ratjadon



PD98059

**Obr. 14** Chemická struktura inhibitorů.



**Tab. 1** Charakteristika použitých fluoroforů

Látka	Barva	Excitační/emisní spektrum [nm]	Detekce
Alexa Fluor 488	zelená	max ~ 488/494-552	mikrotubuly
Alexa Fluor 546	červená	max ~ 561/566-680	MPK6
DAPI	modrá	max ~ 405/410-495	jádro
FM4-64	červená	max ~ 515/640	plazmatická membrána

## 8.8 Biochemická analýza buněčných extraktů

Pro získání proteinů ze vzorku se používá postup zahrnující homogenizaci, inhibici degradačních enzymů, odstranění balastních látek a příprava proteinů pro příslušnou analýzu. Nejprve byly proteiny našeho zájmu izolovány z rostlinného pletiva homogenizací, poté byly separovány elektroforézou v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE), následně byly přeneseny na blotovací membránu a identifikovány značenou protilátkou.

### 1) Izolace bílkovin

Semenáčky *Arabidopsis* (Col-0, *mpk6-4* a *MPK6AEF*) byly zamrazeny v kapalném dusíku (-196 °C) a poté rozdrceny na jemný prášek v předem ochlazené třecí misce. Zamražený prášek může být ihned zpracován, nebo dlouhodobě skladován při -80 °C. V předem zvážené 2 ml mikrozkuhavce byl zmrazený prášek zvážen a poté homogenizován se dvěma objemy RIPA pufru doplněného o 1 mM dithiothreitol (DTT), inhibitory proteáz (Complete <sup>TM</sup>, Roche) a inhibitory fosfatáz (PhosStop <sup>TM</sup>, Roche, tj. 100 mg prášku smíchaného s 200 µl extrakčního pufru) 30 min na ledu. Výsledný homogenát byl centrifugován 10 minut (20000×g, 2 °C), aby se odstranil nerozpustný materiál (zbytky buněčných stěn) a velké organely (např. jádra). Supernatant byl odebrán a smíchán s 4× Laemmliho vzorkovým pufrem s přidavkem 5% β-merkapt ethanolu. Směs byla zahřáta na 70 °C po dobu 5 min. Po zchlazení na pokojovou teplotu mohou být vzorky rovnou použity k SDS-PAGE analýze následované WB, anebo mohou být skladovány při -20 °C pro pozdější využití.

### 2) SDS-PAGE

Separční (dělicí) mini gely (10×10 mm) pro polyakrylamidovou gelovou elektroforézu byly připraveny podle tabulky (viz Seznam použitých roztoků) na požadovanou koncentraci akrylamidu/bis-akrylamidu pomocí komerčního setu (Bio-Rad). V následujícím kroku byl zpolymerovaný separační (dělicí) gel převrstven 4% zaostřovacím (tzv. stacking) gelem a na gely byly nanášeny vzorky vždy po 10 µl. Jeden pás na gelu byl vyhrazen pro ladder markerů o známé molekulové hmotnosti (kDa). Připravené gely byly umístěny do aparatury pro elektroforézu,

naplněné pufrem (podle instrukcí výrobce: Bio-Rad). Na přístroji bylo nastaveno konstantní napětí 190 V. Separace proteinů na gelu probíhala do té doby, než se přední část vzorků obarvených bromfenolovou modří dostala na druhý konec gelu.

### **3) Přenos proteinů na membránu**

Proteiny oddělené v gelu byly pro imunoblotovou analýzu převedeny na membránu (PVDF), jejíž povrch byl nejprve aktivován ponořením do 100% metanolu a následně do přenosového pufru na 10 min. Pro elektroforetický přenos proteinů z gelu na membránu byla sestavena sendvičová soustava. Složky pro sestavení sendvičové soustavy jsou obsaženy v komerčně dostupné kazetě (Bio-Rad), která je uspořádána v tomto pořadí: filtrační podložka (houba), silnější savý papír, gel s našimi vzorky, kousek PVDF membrány (odpovídá zhruba velikosti gelu), další tlustý savý papír a druhou filtrační podložku. Před sestavením „sendviče“ byly všechny složky stabilizovány přibližně 10 min v přenosovém pufru za stálého míchání na kývací platformě a po sestavení byla soustava upevněna do speciálního držáku. Sestavená kazeta byla umístěna do nádoby (stejně jako pro elektroforézu) naplněné přenosovým pufrem. Víko nádrže bylo připojeno ke zdroji a na přístroji bylo nastaveno konstantní napětí 14 V, přenos probíhal přes noc v chladničce (4 °C).

### **4) Imunolokalizace proteinů**

Po přenosu proteinů z gelu na membránu byla membrána obarvena Ponceau S a následně odbarvena v milliQ vodě, až zůstaly obarvené pouze proteinové pásy. Poté byla ponořena do pufru TBST. Proteiny na membráně byly v dalším kroku blokovány pomocí 3% odtučněného mléka (odtučněné sušené mléko) a 3% BSA 1 hod, dále byly inkubovány s primární protilátkou přes noc při 4 °C a po inkubaci byla membrána důkladně promyta pufrem TBST 6×10 min. Jako primární protilátka byla použita králičí anti-MPK6 a králičí anti-pERK pro detekci aktivované, tedy dvojitě fosforylované MPK6. Inkubace se sekundární protilátkou probíhala 1 hod při pokojové teplotě. Jako sekundární protilátky byly použity HRP-konjugované anti-králičí IgG pro pERK (a MPK6), a HRP-konjugované anti-potkaní IgG pro tubulin, zředěné v blokujícím pufru. Po aplikaci sekundárních protilátek byla membrána promyta TBST 6×10 min a inkubována s chemiluminiscenčním činidlem dle návodu výrobce (Bio-Rad). Luminiscenční signál byl detekován pomocí dokumentačního přístroje (Bio-Rad) a zpracován v programu Image Lab software téže firmy.

## **8.9 Programy pro zpracování výsledků**

Zpracování mikroskopických snímků - export a úprava obrázků pomocí programů:

- LAS V 4.0 (Leica) pro binokulární mikroskop
- ZEN Blue 2012 (Zeiss) pro Spinning disc a epifluorescenční mikroskop

- Zen Black 2012 (Zeiss) pro konfokální laserový mikroskop (CLSM)
- ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>)
- Image Lab software (Bio-Rad)
- Microsoft Powerpoint 2007

### **8.10 Přístrojové vybavení**

- Analytické váhy (XA 110/2X, RADWAG)
- Automatické pipety (10 µl – 10 ml, Eppendorf)
- Digestoř laboratorní (M 1200, MERCI)
- Fotoaparát (Nikon 7000, makroobjektiv Sigma 50 mm, 2.8)
- Chlazená centrifuga (Beckman)
- Inkubátor (Biotrade)
- Konfokální mikroskop (LSM 710, Axio Imager Z2, ZEISS, operační program ZEN Black 2012)
- Kultivační komora (fytotron, Weiss Gallenkamp)
- Laboratorní chladnička (ERB 34633W, Electrolux)
- Laboratorní předvážky (S1502, BEL Engineering)
- Laminární box biohazard (Faster, FERRARA)
- Magnetická míchačka (MSH-420, BOECO)
- Mikroskop epifluorescenční s operačním programem ZEN Blue 2012 (Axio Imager M2, ZEISS)
- Mikroskop konfokální laserový skenovací s operačním programem ZEN Blue 2012 (Spinning disc, Axio Observer Z1, ZEISS)
- Mikrovlnná trouba (MGE21, HITACHI)
- Mrazicí box (Liebherr)
- pH metr stolní (PC 2700, Eutech Instruments)
- Stereomikroskop (binokulární mikroskop, Leica M165FC, operační program LAS V 4.0, Leica)
- Třepačka (Labnet)

### 8.11 Seznam použitých roztoků

Většina chemikálií použitých v experimentální části pochází z firmy Sigma-Aldrich, pokud není uvedeno jinak.

<b>Sterilizační roztok</b> 1% hypochlorid sodný, 0,05% Tween 20 10 ml            10% hypochlorid sodný 90 ml            destilovaná voda (dH <sub>2</sub> O) Doplněno dH <sub>2</sub> O na 100 ml s přídavkem kapky Tween 20
<b>Pevné ½ MS médium bez vitaminů</b> 2,15 g/l Murashige-Skoog médium (Duchefa) 10 g/l            sacharóza 8 g/l            phytigel Doplněno na 1 l dH <sub>2</sub> O, úprava pH 5,8 (KOH), sterilizováno autoklávováním <b>Tekuté ½ MS médium bez vitaminů</b> 2,15 g/l Murashige-Skoog médium (Duchefa) 10 g/l            sacharóza Doplněno na 1 l dH <sub>2</sub> O, pH 5,8, sterilizováno autoklávováním
<b>Fixační roztok pro konzervaci šesulí</b> Ředění 1:1 5 ml            96% etanol 5 ml            99,7% kyselina octová
<b>Hoyerovo fixační médium</b> 8 g            chloral hydrát 3 ml            glycerol 1 ml            ultra čistá voda (miliQ)
<b>Roztok FM4-64 pro značení nativních vzorků</b> Ředění 1:400 1 µl            zásobní roztok FM4-64 (Life Technologies), 1,6 mmol/l 399 µl          ½ MS tekutého média bez vitaminů Pracovní roztok c = 4 µmol/l
<b>Inhibitory</b> <b>Importazol, PD PD98059</b> <b>Zásobní roztok</b> 10 mmol/l roztok importazolu (nebo PD98059) ve 100% DMSO <b>Pracovní roztok</b> 50 µmol/l roztok importazolu (nebo PD98059), 0,5% v/v DMSO

<p><b>Ratjadon</b></p> <p><b>Zásobní roztok</b></p> <p>1 <math>\mu\text{mol/l}</math></p> <p><b>Pracovní roztok</b></p> <p>5 nmol/l v tekutém ½ MS</p>
<p><b>Roztok pro ošetření MPK6-GFP rostlin inhibitorem</b></p> <p>50 <math>\mu\text{mol/l}</math> roztok importazolu, 0,5% v/v DMSO</p>

<b>Roztoky pro whole mount</b>
<p><b>Roztok PFA pro fixaci</b></p> <p>16 g            paraformaldehyd</p> <p>150 ml        ultra čistá voda (miliQ)</p> <p>Doplněno na 200 ml miliQ vodou za stálého míchání a mírného zahřívání (30 min), úprava pH na hodnotu 10 (1 tableta KOH)</p>
<p><b>Roztok pro fixaci</b></p> <p>5,85 ml dH<sub>2</sub>O</p> <p>10 ml            1×MTSB</p> <p>3,75 ml PFA</p> <p>400 <math>\mu\text{l}</math>        glutaraldehyd (skladování při -4 °C)</p> <p>Celkem 20 ml fixačního roztoku pro 6 jamek 12 jamkové kultivační destičky (3 ml roztoku pro každou jamku)</p>
<p><b>1× MTSB</b></p> <p>3,775 g PIPES</p> <p>0,3075 g        MgSO<sub>4</sub> × 7 H<sub>2</sub>O</p> <p>0,475 g        roztok EGTA</p> <p>Doplněno na objem 250 ml miliQ H<sub>2</sub>O, pH 6,8</p> <p>0,025 g/250 ml azid sodný</p>
<p><b>Roztok směsi enzymů</b></p> <p>100 mg miceláza (1%)</p> <p>200 mg celuláza (2%)</p> <p>100 mg        macerozym (tj. pektináza, 1%)</p> <p>10 mg        pektolyáza (0,1%)</p> <p>10 ml        ½ MTSB pufr</p> <p>Inkubace 40 min při teplotě 40 °C</p>

<b>½ MTSB pufr pro rozpuštění enzymů</b>	
100 ml	MTSB (1×)
100 ml	miliQ voda
<b>PBS</b>	
<b>Zásobní roztok (10× PBS)</b>	
8 g	NaCl (0,14 M)
0,2 g	KCl (2,7 mM)
1,15 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O (6,5 mM)
0,2 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1,5 mM)
Doplněno na objem 1 l miliQ H <sub>2</sub> O, pH 7,3 (0,1 M KOH)	
<b>Pracovní roztok (1× PBS)</b>	
100 ml	PBS (10×)
900 ml	miliQ voda
<b>Roztok pro redukci</b>	
20 ml	PBS (1×)
Zarovnaná mikrolžička Na[BH <sub>4</sub> ] pro každý vzorek, celkem přibližně 20 mg Na[BH <sub>4</sub> ] pro 6 vzorků	
<b>Roztok pro permeabilizaci</b>	
10 ml	PBS (10×)
10 ml	DMSO (10% v/v)
2 ml	Nonidet P-40 (2% v/v)
78 ml	miliQ voda
<b>Roztok pro blokování</b>	
3% v/v BSA v PBS	
1,5 g	BSA
50 ml	PBS (1×)
Před použitím uložit na pár minut do mrazáku (-20 °C) pro lepší rozpuštění BSA	
<b>Roztok s primární protilátkou</b>	
15 ml	3% blokovací pufr (BSA+PBS)
15 µl	monoklonální potkaní protilátka anti-α-tubulinu (1:500)
20 µl	polyklonální králičí protilátka anti-MPK6 (1:750)
800 µl roztoku protilátky pro 1 vzorek (jamku). Uchování protilátek při -20 °C	
<b>Roztok se sekundární protilátkou</b>	
10 ml	3% blokovací pufr (BSA+PBS)
10 µl	sekundární protilátka: Alexa Fluor 488 anti-potkaní IgG (1:1000)
10 µl	sekundární protilátka Alexa Fluor 546 anti-králičí IgG (1:1000)

<b>DAPI</b>	
<b>Zásobní roztok</b>	
10 mmol/l v DMSO	
<b>Pracovní roztok</b>	
Ředění 1:1000, 3,5 mg/ml	
30 ml	PBS
30 µl	DAPI
<b>Zalévací médium pro preparáty</b>	
100 mg parafenylendiamin	
30 µl	DMSO
1 ml	Tris (1,5 M, pH 8,8)
9 ml	glycerol
Uchovávat ve tmě při -20 °C	

<b>SDS-PAGE</b>	
<b>10% dělicí gel</b>	<b>zaostrující gel</b>
1,25 ml 40% akrylamid/bis-akrylamid	250 µl akrylamid/bis-akrylamid
1,25 ml Tris (1,5 M, pH 8,8)	0,63 ml Tris (pH 6,8)
2,425 ml miliQ voda	25 µl SDS
50 µl 10% SDS	1,59 ml miliQ voda
25 µl 10% persíran amonný	12,5 µl persíran amonný
6 µl TEMED	3 µl TEMED
Polymerace gelu přibližně 10 min	Polymerace gelu 15 – 20 min
<b>SDS elektroodový pufr (10×)</b>	<b>přenosový (transfer) pufr</b>
30 g Tris	30 g Tris
144 g glycin	144 g glycin
10 g SDS	Doplněno na 1 l miliQ vodou
Doplněno na 1 l miliQ vodou	
<b>SDS elektroodový pufr (1×)</b>	
100 ml přenosový pufr (10×)	
900 ml miliQ voda	

<b>Pufry a roztoky pro izolaci proteinů, SDS-PAGE a Western blotting</b>	
<b>RIPA pufr:</b> 10 mM Tris-Cl, pH 7,5, 150 mM chlorid draselný, 1 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 1% v/v Triton X-100, 0,1% w/v deoxycholát sodný, 0,1% w/v SDS (doplněn 1 mM DTT, Complete™ a PhosStop™ před extrakcí proteinu)	
<b>4× Laemmliho vzorkový pufr:</b> 240 mM Tris-Cl pH 6,8, 40% v/v glycerol, 8% w/v SDS, 0,4% w/v bromfenolová modř (doplněno 5% v/v β-merkaptoetanolem). Pro finální úpravu: smíchání 3 objemů vzorku s 1 dílem výše uvedeného pufru	
<b>zásobní roztok TBS (10×)</b>	<b>pracovní roztok TBST (1×)</b>
0,5 M Tris-Cl, pH 8,8	100 ml TBS (10×)
1,5 M Tris NaCl, pH 6,8	900 ml miliQ voda
	0,05% Tween 20



## 9 Výsledky

### 9.1 Průběh experimentů

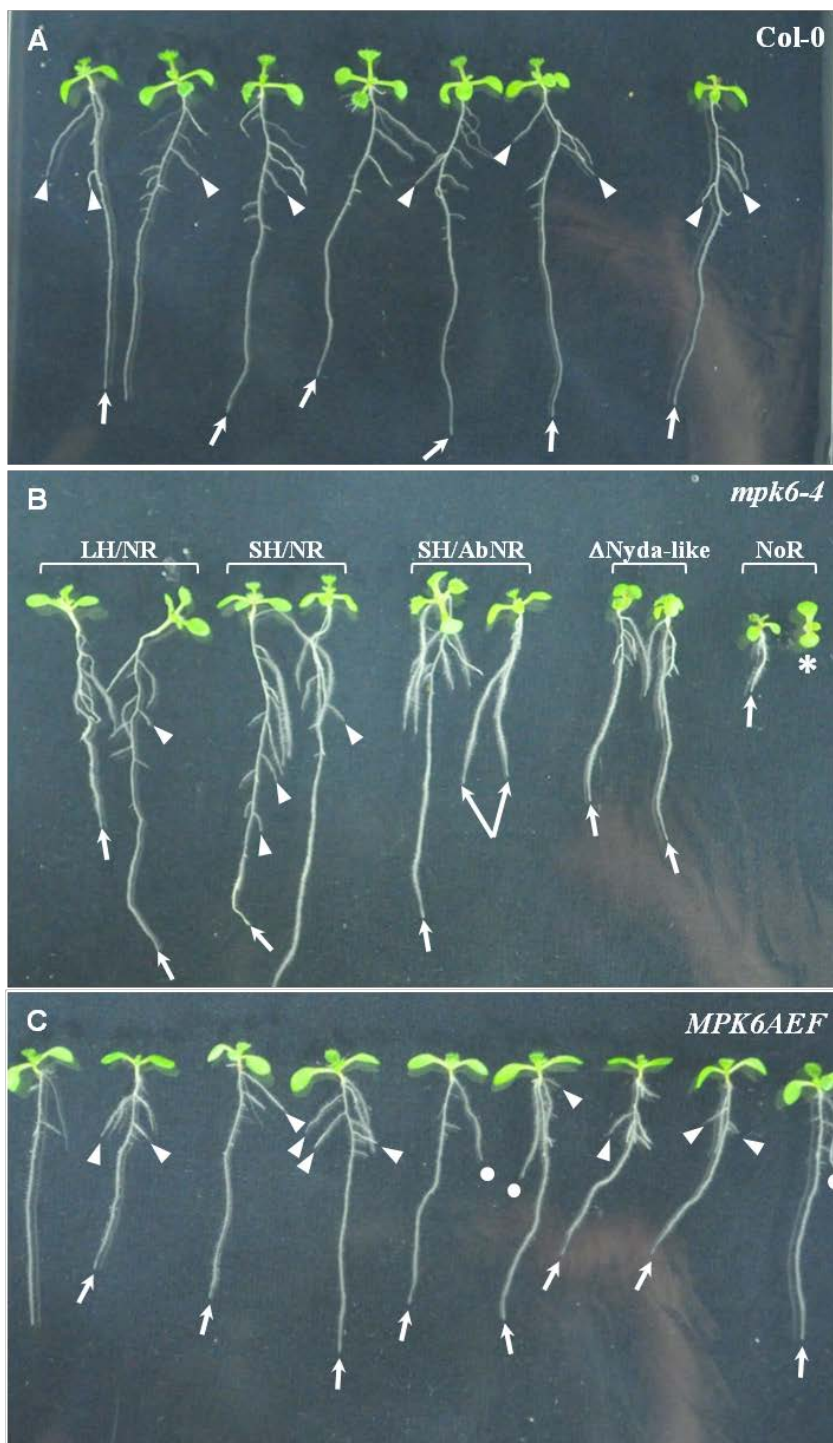
Experimentální část předložené diplomové práce byla rozdělena do několika bloků. V první etapě bylo provedeno hodnocení fenotypu mutantních rostlin *Arabidopsis thaliana: mpk6-4* a *MPK6-AEF* v porovnání s odpovídající kontrolní rostlinou Col-0 (dále WT: wild type). Rostliny byly kultivovány v podmínkách *in vitro* na Petriho miskách, později také v květináčích se zeminou. Po uplynutí doby nutné pro jejich kultivaci byla provedena fotodokumentace a celkové hodnocení fenotypu. Druhá část experimentů byla zaměřena na studium embryonálního vývoje výše zmíněných mutantních rostlin *Arabidopsis* v porovnání s WT. Embrya různých stádií byla izolována z rostlin pěstovaných v květináčích, následně byla fixována a pozorována pomocí mikroskopie s diferenčním interferenčním kontrastem.

Třetí část experimentů zahrnovala studium struktury kořene na úrovni buněk pomocí imunolokalizační metody whole mount a mikroskopie. Byla pozorována orientace roviny dělení buněk kořene, uspořádání cytoskeletu a lokalizace MAP kináz MPK6. Pro studium organizace buněk kořenového meristému bylo použito barvení nativních vzorků pomocí FM4-64 ve spojení s konfokální skenovací mikroskopií (CLSM). Fixované vzorky byly značeny protilátkami konjugovanými s fluorofory a pozorovány konfokálním laserovým mikroskopem Spinning disc. U fixovaných preparátů byla pozorována organizace buněk kořene se zaměřením na lokalizaci MPK6 a dále byly pozorovány změny v lokalizaci MPK6 při aplikaci inhibitorů. V živých buňkách byla MPK6 lokalizována pomocí zeleného fluorescenčního proteinu GFP. Poslední fází experimentální práce bylo prokázat přítomnost proteinu MPK6 u zmíněných mutantních rostlin metodou SDS-PAGE následovanou imunodetekcí cílového proteinu analýzou Western blot.

### 9.2 Pozorování fenotypu mutantů *mpk6-4*, *MPK6AEF* a WT Col-0

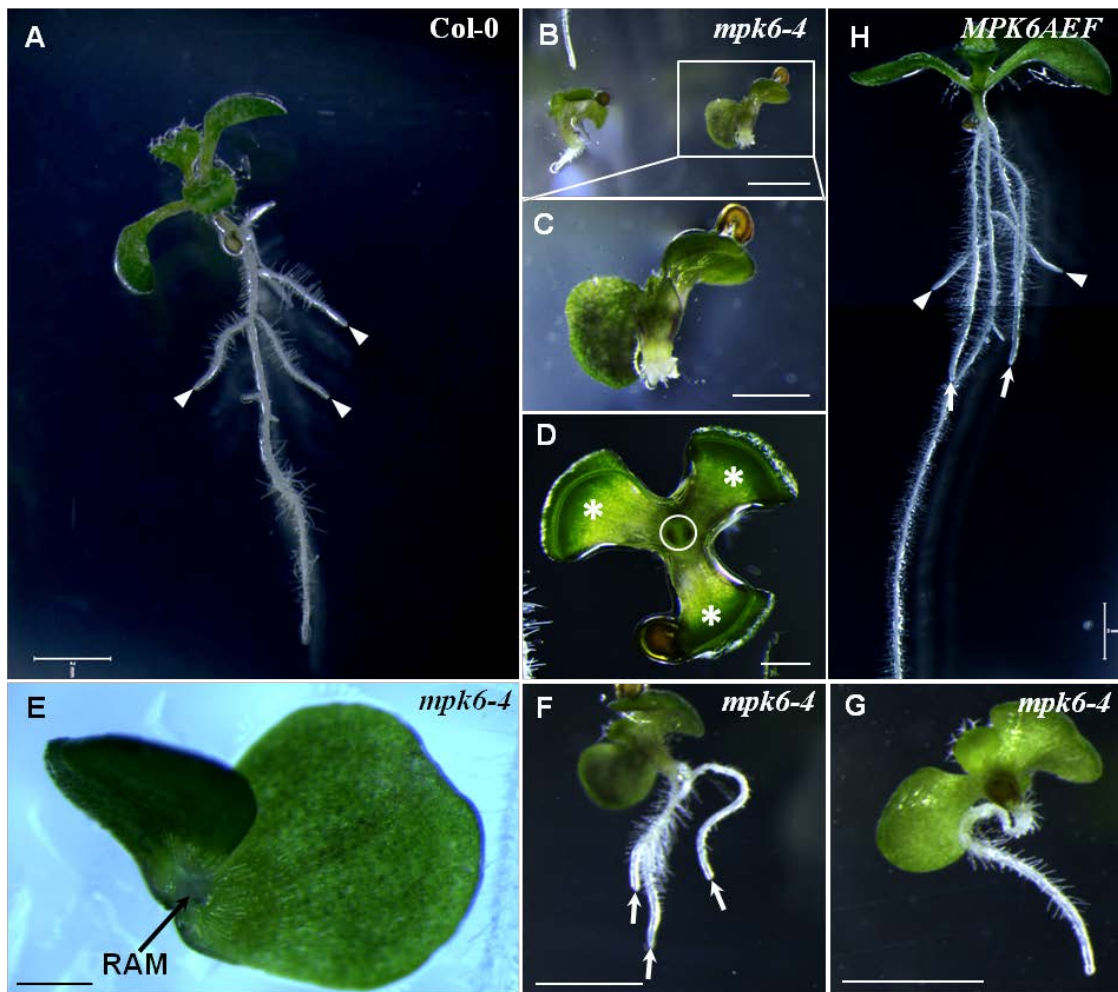
#### 9.2.1 Pozorování fenotypu semenáčků

Pro pozorování fenotypu mladých rostlin *Arabidopsis* byly použity rostliny genotypů Col-0, *mpk6-4* a *MPK6-AEF*. Po uplynutí doby kultivace byl pozorován fenotyp semenáčků se zaměřením na studium morfologie kořenů. Pro fotografickou dokumentaci byl použit binokulární mikroskop Leica a fotoaparát Nikon 7000.



**Obr. 15** Přehled fenotypu 5 dní starých semenáčků *Arabidopsis thaliana* genotypů Col-0 (kontrolní rostlina), *mpk6-4* (knock-out mutant) a *MPK6AEF* (dominantně negativní mutant). **(A)** Rostliny Col-0 ukazují typickou tvorbu růžice, normální vývoj primárního kořene (šipky), včetně tvorby postranních kořenů (hroty šipek). **(B)** Diskriminace pěti různých fenotypů mutantů *mpk6-4* (v závorkách) s variabilním fenotypem primárních kořenů (šipky) a bočních kořenů (hroty šipek). Dvojitá šipka ukazuje na mutantní semenáček se dvěma primárními kořeny a hvězdička na semenáček bez kořene. Zkratky uvedené nad závorkami označují hlavní rysy mutantních rostlin: LH = long hypocotyl (prodloužený hypocotyl), SH = short hypocotyl

(krátký hypocotyl), NR = normal root (normální kořeny), AbNR = abnormal root (abnormální kořeny), like Nyda (fenotyp podobný fenotypu mutantu  $\Delta$ Nyda), NoR = no root (bez kořene). **(C)** Přehled rostlin *MPK6AEF* ukazuje téměř normální fenotyp primárních kořenů (šipky) a laterálních kořenů (hroty šipek). Bílé puntíky označují mutanty se dvěma primárními kořeny.



**Obr. 16** Detaily fenotypu 5 dní starých semenáčků *Arabidopsis thaliana* Col-0 (kontrolní rostlina), mutantů *mpk6-4* a *MPK6AEF*. (A) Col-0 rostlina s typickou růžicí tvořenou dvěma dělohami a dvěma růžicemi listů, a rostoucí primární kořen s postranními kořeny (hroty šipek). (B-G) Detailní příklady těžkých defektů ve fenotypu u mutantu *mpk6-4* s krátkým kořenem (B vlevo), abortovaným kořenem (B vpravo a C) a extrémní příklady rostlin s absolutně nulovou tvorbou kořenů, se třemi děložními lístky (hvězdičky) a bez viditelného RAM (D), nebo se dvěma nepravidelnými děložními lístky s patrným RAM (E). (F) ukazuje semenáčky se třemi primárními kořeny (šipky), (G) ukazuje viditelný vznik kořene, jehož růst byl zastaven. Kruh vymezuje oblast, kde by se měl kořen obvykle objevit. (H) *MPK6AEF* semenáčky s normálním vývojem kořenů. Měřítko: 2 mm (A, B, G, H); 1 mm (C, F); 0,5 mm (D, E).

### 9.2.2 Pozorování fenotypu dospělých rostlin

Kromě pozorování fenotypu semenáčků bylo provedeno také hodnocení vzrůstu dospělých rostlin. Semenáčky rostlin všech tří genotypů byly nejprve kultivovány 10 dní na Petriho miskách s tuhým ½ MS médiem, poté byly kultivovány v květináčích se zeminou 32 dní v růstové komoře. Po uplynutí 11 a 32 dní kultivace byla provedena fotodokumentace a hodnocení nadzemní části rostliny.



**Obr. 17** Rozdíly v růstu 11 dní starých semenáčků *Arabidopsis thaliana* Col-0 (WT) a mutantů *mpk6-4* a *MPK6AEF*. Fenotyp mutantní rostliny *mpk6-4* ukazuje v porovnání s WT redukovaný růst, avšak tento defekt v růstu je nějakým způsobem potlačen u mutantu *MPK6AEF*.



**Obr. 18** Rozdíly v růstu 32 dní starých rostlin *Arabidopsis thaliana* Col-0 (WT) a mutantů *mpk6-4* a *MPK6AEF*. Výrazně zakrslý mutant *mpk6-4* i přes svůj defekt v růstu vytváří reprodukční struktury a je fertilní. U mutantu *MPK6AEF* je defekt v růstu nějakým způsobem potlačen.

Tyto výsledky jednoznačně ukazují, že fenotyp mutantní rostliny *mpk6-4* vykazuje v různé míře variabilní odchylky od vegetativního vývoje kořene a děloh kontrolní rostliny Col-0, zatímco

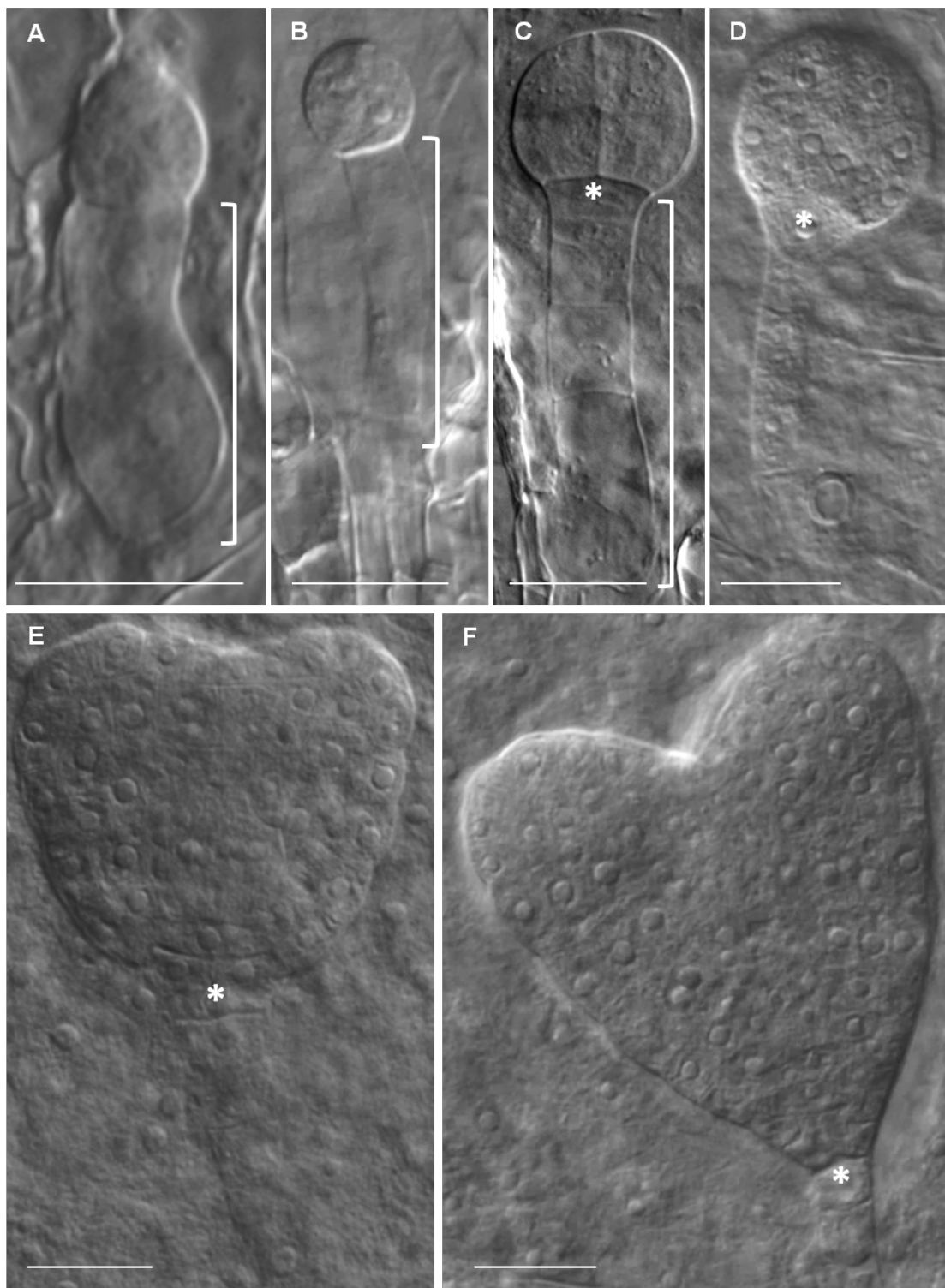


porucha růstu u mutantu *MPK6AEF* je nějakým způsobem potlačena, takže vykazuje v určité míře podobnost s WT.

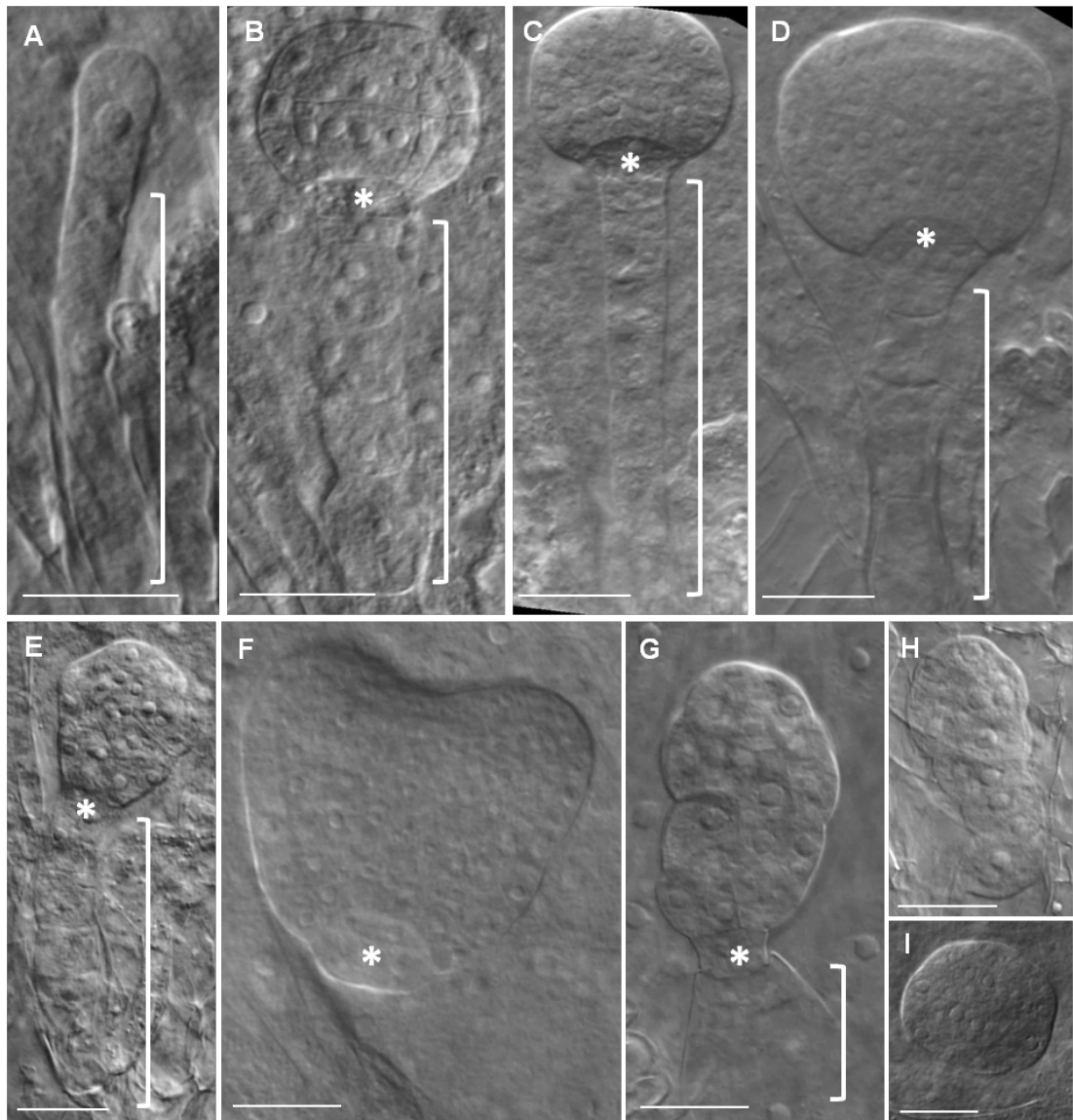
### 9.3 Embryogeneze u mutantů *mpk6-4*, *MPK6AEF* a WT Col-0

Studium embryogeneze *Arabidopsis* bylo provedeno na embryích mutantů *mpk6-4*, *MPK6AEF* a kontrolní rostliny Col-0. Z rostlin pěstovaných v květináčích (viz Materiál a metody, 8.2) bylo posbíráno přibližně 50 šesulí pro každý genotyp a ty byly selektovány tak, aby měly různou velikost a obsahovaly embrya odlišných stadií. Připravené preparáty byly pozorovány pomocí DIC mikroskopie, využívající diferenční interferenční kontrast, tzv. Normanského kontrast.

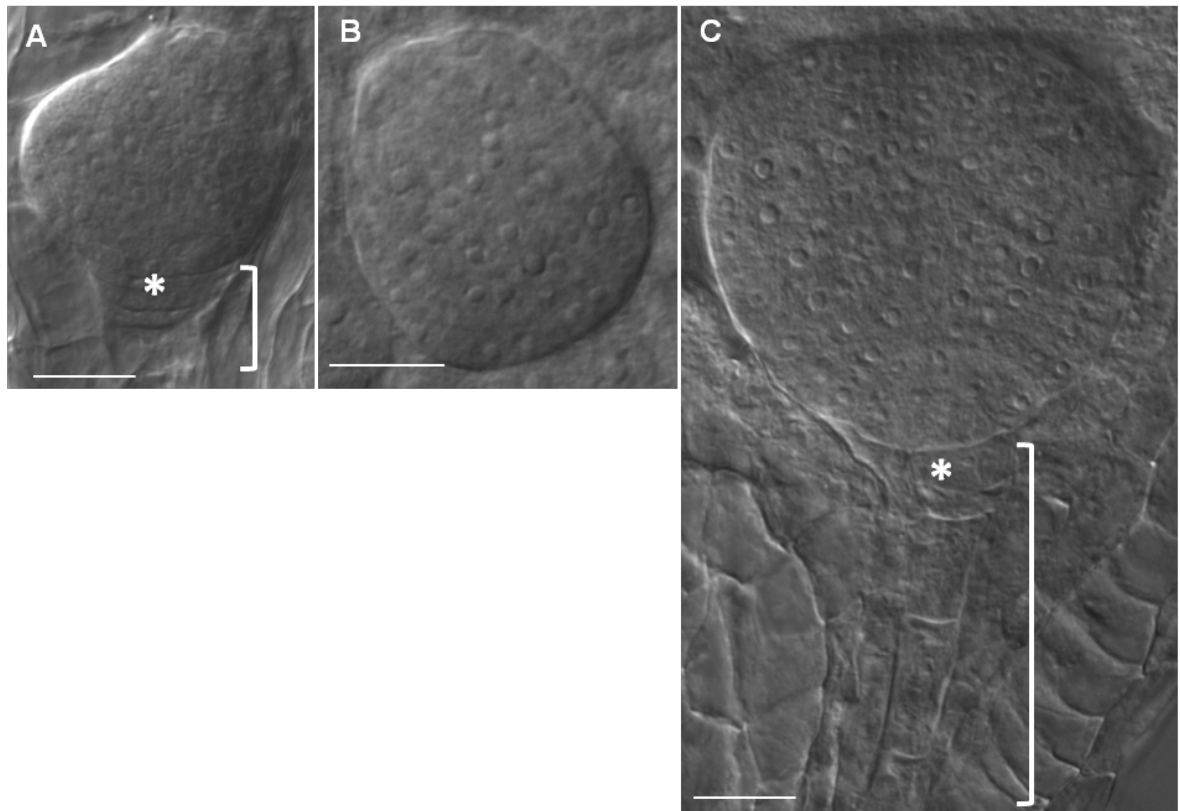
V průběhu embryogeneze ekotypu Col-0 byly pozorovány téměř všechny stadia vývoje embrya (Obr. 19), jak již bylo publikováno dříve (např. Cederholm *et al.*, 2012). Naopak průběh embryogeneze mutantu *mpk6-4* byla značně narušena, a to jak na úrovni embrya, tak na úrovni suspenzoru (Obr. 20). Tyto abnormality jsou proměnné a jejich rozsah se pohybuje od mírného poškození, až po těžké defekty. Jak již vyplývá z fenotypové analýzy, zdá se, že ne-aktivovatelná varianta MPK6 mutantu *MPK6AEF*, který byl vytvořen vnesením konstruktů do mutantů *mpk6-4* (viz kap. 6) vykazuje částečnou záchranu fenotypu *mpk6-4* (tzv. rescue phenotype; Obr. 21). Na základě pozorování stadií embryogeneze výše zmíněných mutantů *Arabidopsis* a WT jednoznačně vyplývá, že vývoj embrya i suspenzoru mutantu *mpk6-4* je ovlivněn regulací orientace roviny buněčného dělení, která v tomto procesu hraje klíčovou roli.



**Obr. 19** Vybraná stadia embryogeneze *Arabidopsis thaliana*, ekotypu Col-0. Zviditelnění embryí bylo umožněno použitím DIC optiky po odstranění obalu vajíček. **(A)** Stadium dvou buněk, **(B)** stadium oktantu, **(C)** stadium 16 buněk, **(D)** rané globulární stadium, **(E)** přechodné (tranzitní) stadium a **(F)** srdcovité stadium s počáteční diferenciací kotyledonů. Závorka ukazuje na buňky suspensoru, hvězdička označuje hypofýzu. Měřítko představuje 20  $\mu\text{m}$ .



**Obr. 20** Vybraná stadia embryogeneze mutantní rostliny *Arabidopsis thaliana*, *mpk6-4*. Zviditelnění embryí bylo umožněno použitím DIC optiky po odstranění obalu vajíček. **(A)** Stadium jedné buňky, **(B)** globulární stadium s mohutnými buňkami suspensoru, **(C)** globulární stadium další varianty mutanta s prodlouženými buňkami suspensoru, **(D)** pozdní globulární stadium, **(E, G)** deformovaná apikální i bazální část embrya v globulárním stadiu, **(F)** rané srdcovité stadium bez suspensoru, **(H)** deformované rané globulární stadium, **(I)** pozdní globulární stadium bez suspensoru. Závorka ukazuje na buňky suspensoru, hvězdička označuje hypofýzu. Měřítka představuje 20  $\mu\text{m}$ .



**Obr. 21** Vývoj embrya mutantní rostliny *Arabidopsis thaliana*, *MPK6AEF*. Zviditelnění embryí bylo umožněno použitím DIC optiky po odstranění obalu vajíček. V této studii se nám nepodařilo získat časná stadia embryogeneze, avšak pozdní stadia (**A**, **B** - přechodné, **C** - srdcovité) a celkový vývoj embrya, včetně suspensoru, ukazuje mnohem menší narušení embryogeneze, než je tomu u *mpk6-4*. Závorka ukazuje na buňky suspensoru, hvězdička označuje hypofýzu. Měřítka představuje 20  $\mu\text{m}$ .

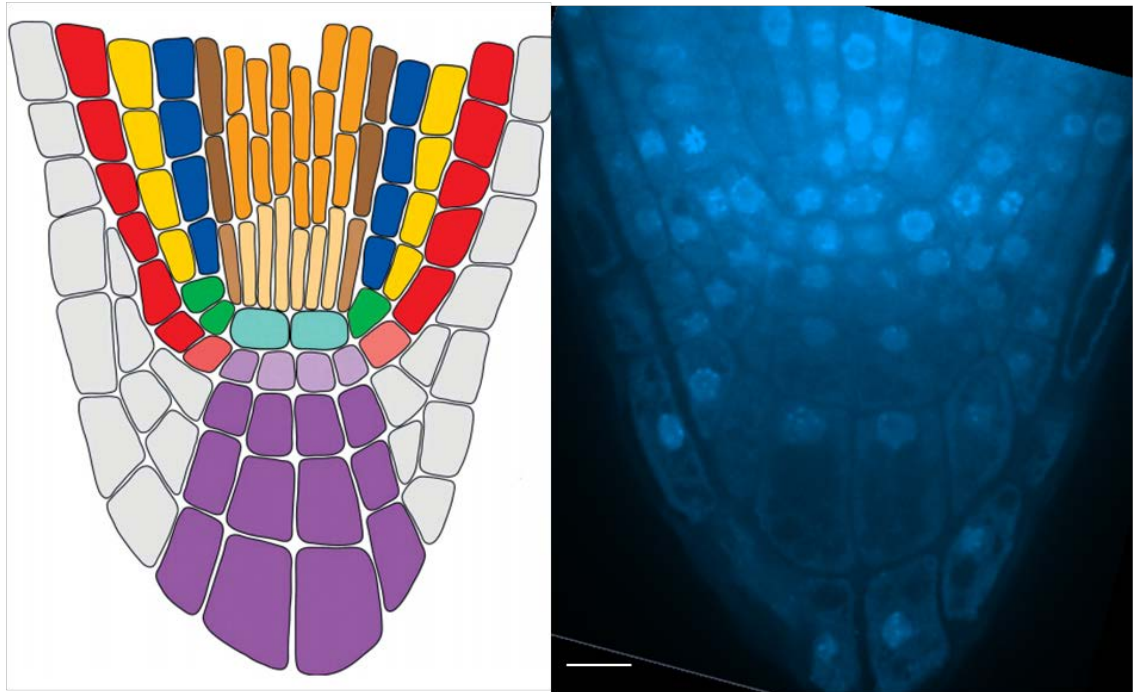
#### 9.4 Pozorování struktury kořene nativních vzorků

Pro pozorování struktury kořene a orientace roviny dělení buněk u nativních vzorků bylo použito značení s FM4-64. Z rostlin kultivovaných 5 dní na Petriho miskách s pevným  $\frac{1}{2}$  MS byly od každého genotypu vybrány 3 rostliny a po inkubaci s roztokem FM4-64 byly vytvořeny mikroskopické preparáty živých vzorků. Rostliny byly pozorovány konfokálním laserovým skenovacím mikroskopem a obrazy zpracovány pomocí ZEN black programu.

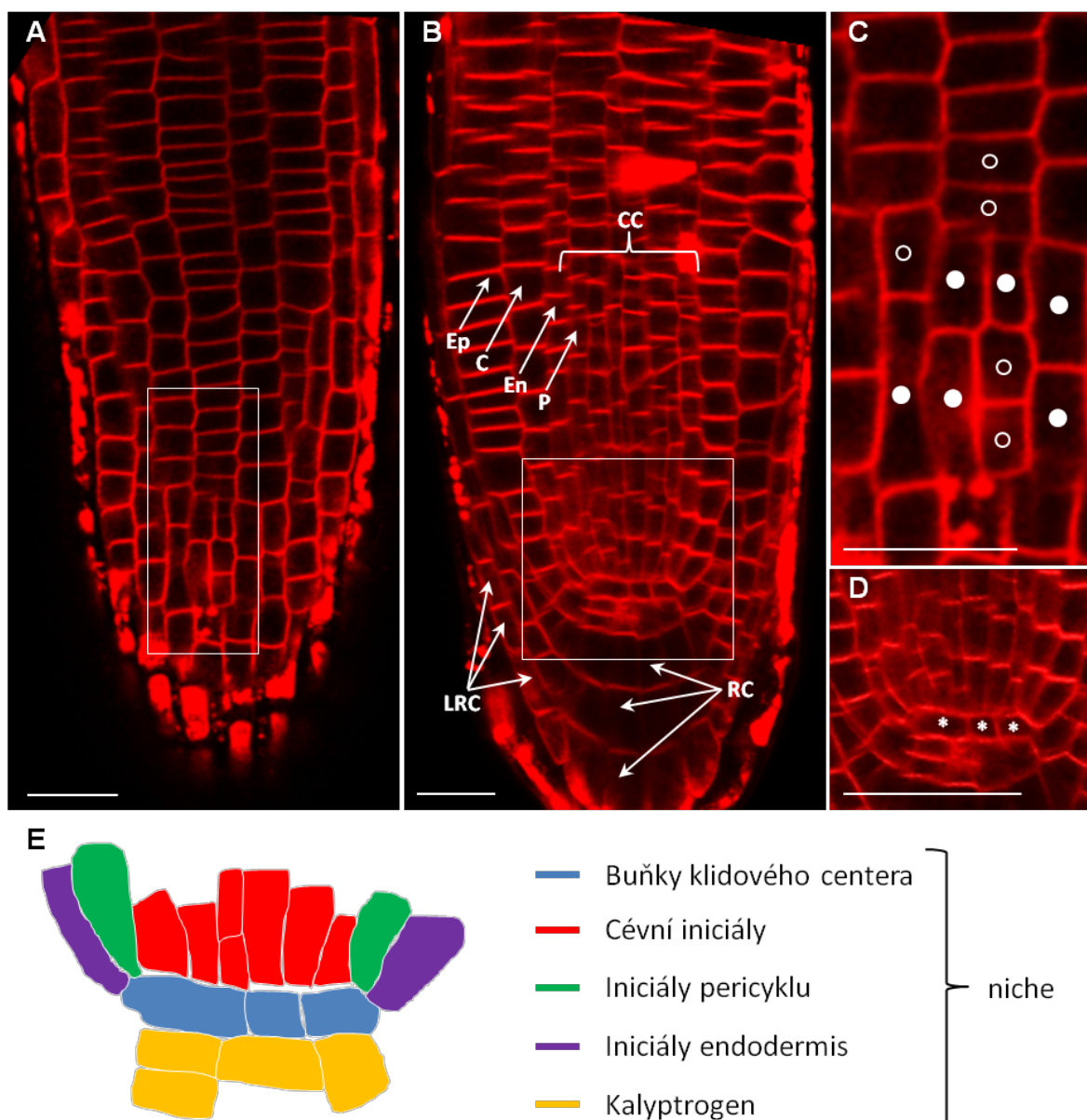
Pravidelné uspořádání buněk kořene kontrolní rostliny Col-0 (Obr. 23) odpovídá modelu kořenového meristému uvedeného v literatuře (Obr. 22; Stahl a Simon, 2005). V kontrastu s WT je organizace buněk primárního kořene mutanta *mpk6-4* výrazně narušena v celé hloubce kořene (Obr. 24). Naopak buňky primárního kořene u mutanta *MPK6AEF* jsou v porovnání s WT přibližně normálně uspořádány, a to na všech úrovních kořene, což naznačuje, že defektní fenotyp u mutanta *mpk6-4* je částečně nebo zcela zachráněn expresí varianty *MPK6AEF* (Obr. 26). Výsledky pozorování naznačují, že postembryonální vývoj kořene a orientace roviny buněčného dělení je



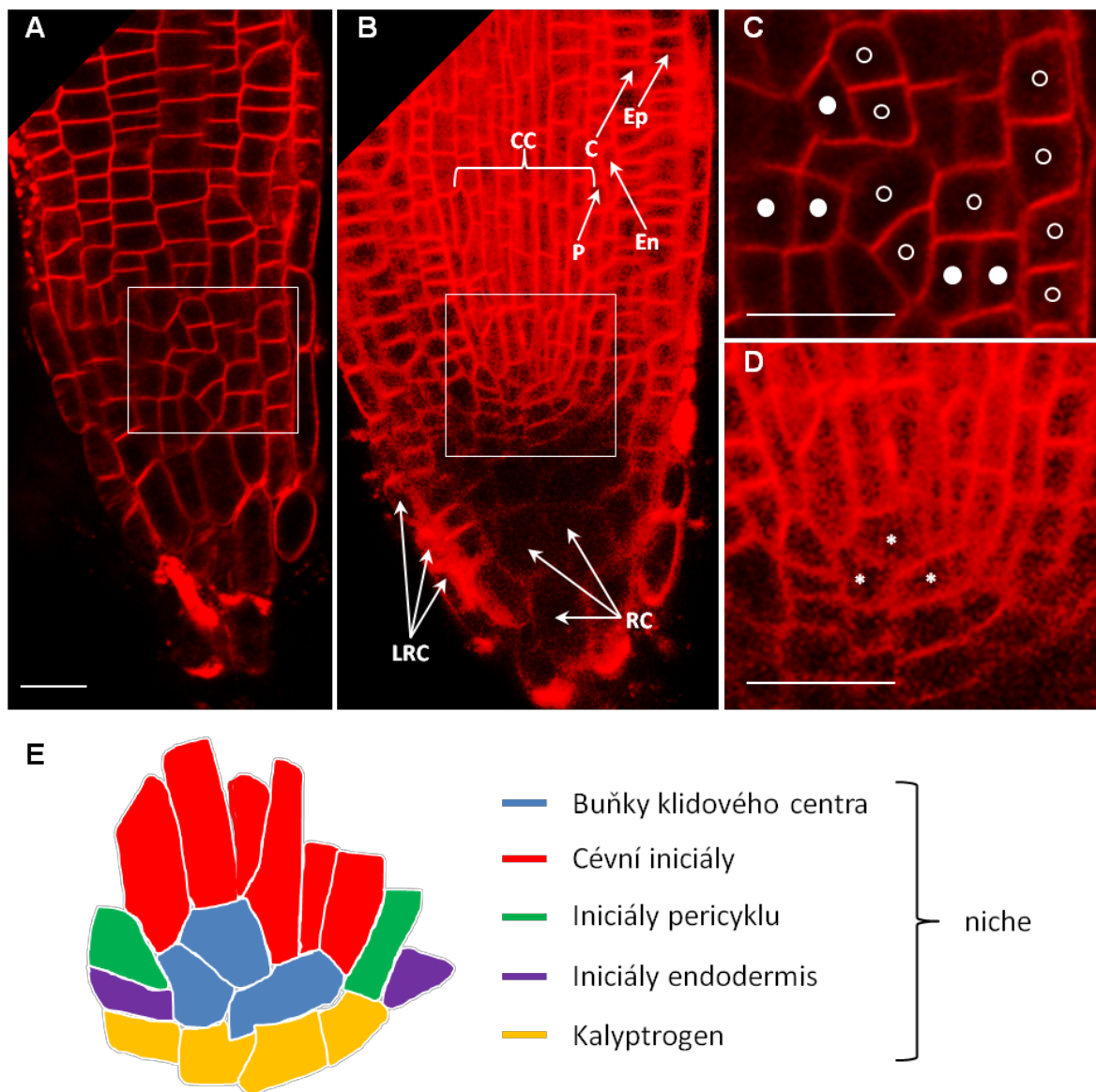
důležitá pro zachování vzoru kořenového meristému, a že tento proces závisí na expresi intaktní molekuly MPK6, bez ohledu na její aktivitu.



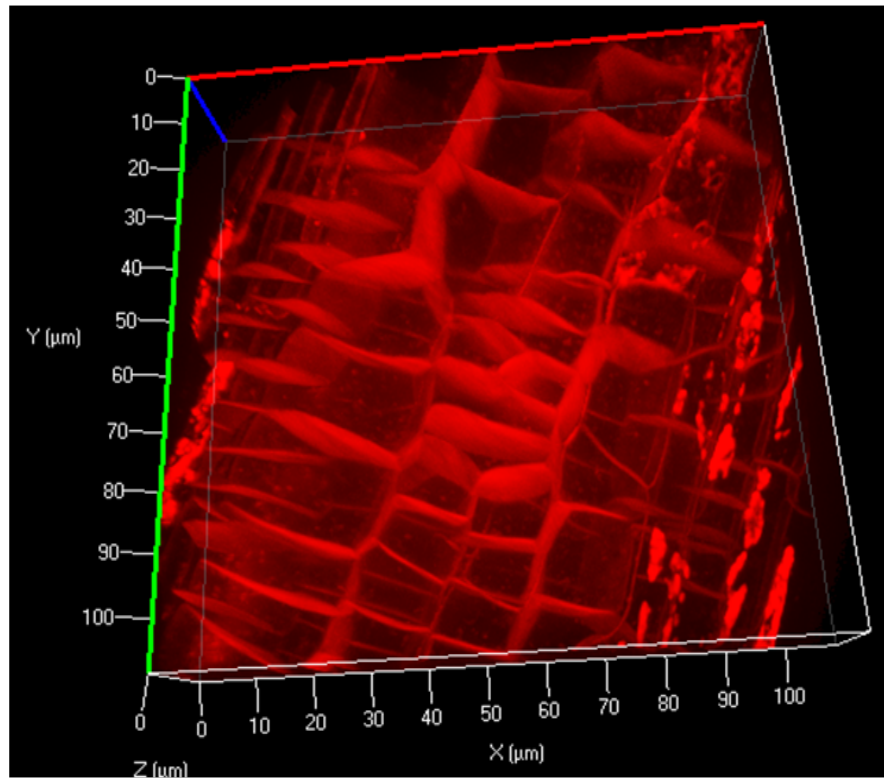
**Obr. 22** Architektura tkáně kořene *Arabidopsis thaliana* (Stahl a Simon, 2005). Snímek kořenového meristému Col-0, barvení jader DAPI. Měřítko 10  $\mu\text{m}$ .



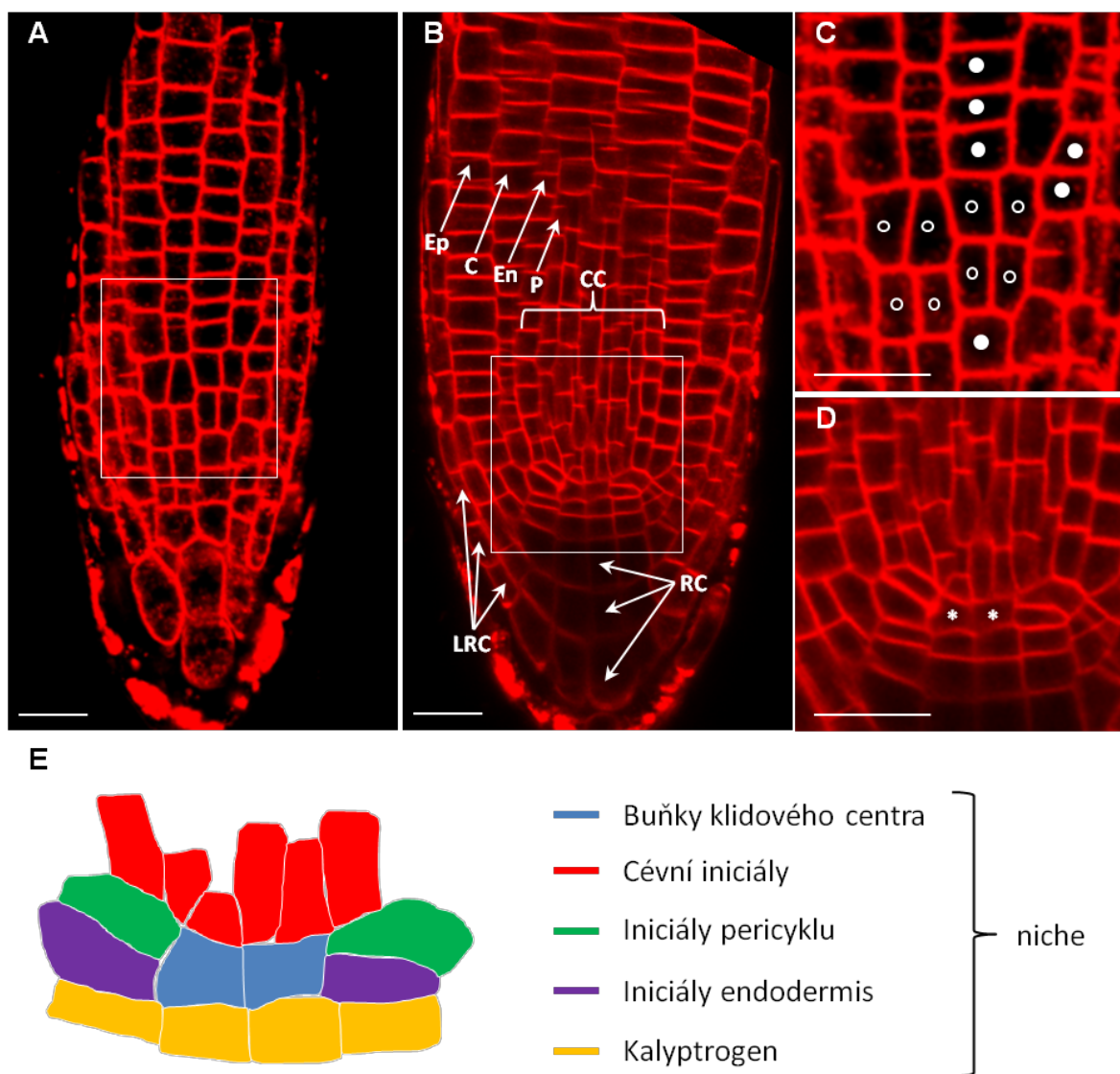
**Obr. 23** Organizace buněk primárního kořene 5 dní starých semenáčků kontrolní rostliny (WT) *Arabidopsis thaliana* Col-0. Vizualizace buněčných membrán pomocí CLSM po obarvení vzorku s FM4-64. **(A)** Přehled uspořádání epidermálních buněk kořene ukazuje jejich správně uspořádání. **(B)** Ohraničená část CLSM snímku zachycuje organizaci téměř všech vrstev buněk kořene WT (EP - epidermis, C - kortex, En - endodermis, P - pericykl, LRC - boční kořenová čepička, RC - kořenová čepička, CC - střední válec). **(C)** Zvětšení ohraničené oblasti v **(A)** ukazuje posloupnost periklinálních (tj. formativních; plné kruhy) a antiklinálních (tj. proliferačních; prázdné kruhy) rovin dělení. **(D)** Zvětšení ohraničené oblasti v **(B)** podrobně zobrazuje kmenové buňky, obklopující buňky klidového centra (hvězdičky). **(E)** Grafické znázornění oblasti iniciál a buněk klidového centra, které jsou barevně odlišeny. Měřítka u všech snímků odpovídá délce 20  $\mu\text{m}$ .



**Obr. 24** Organizace buněk primárního kořene 5 dní starých semenáčků mutanta *Arabidopsis thaliana*, *mpk6-4*. Vizualizace buněčných membrán pomocí CLSM po obarvení vzorku s FM4-64. **(A)** Přehled uspořádání buněk kořene ukazuje v porovnání s WT výrazné porušení v orientaci roviny dělení buněk. **(B)** Ohraničená část CLSM snímku zachycuje organizaci téměř všech vrstev buněk obsažených u kořene WT (EP - epidermis, C - kortex, En - endodermis, P - pericykl, LRC - boční kořenová čepička, RC - kořenová čepička, CC - střední válec). **(C)** Zvětšení ohraničené oblasti v **(A)** ukazuje posloupnost periklinálních (tj. formativních; plné kruhy) a antiklinálních (tj. proliferačních; prázdné kruhy) rovin dělení. **(D)** Zvětšení ohraničené oblasti v **(B)** podrobně zobrazuje kmenové buňky, obklopující buňky klidového centra (hvězdičky). **(E)** Grafické znázornění oblasti iniciál a buněk klidového centra, které jsou barevně odlišeny. Měřítko u všech snímků odpovídá délce 20  $\mu\text{m}$ .



**Obr. 25** 3D pohled na organizaci buněk primárního kořene 5 dní starých semenáčků mutanta *Arabidopsis thaliana*, *mpk6-4*. Vizualizace buněčných membrán pomocí CLSM po obarvení vzorku s FM4-64.



**Obr. 26** Organizace buněk primárního kořene 5 dní starých semenáčků mutanta *Arabidopsis thaliana*, *MPK6AEF*. Vizualizace buněčných membrán pomocí CLSM po obarvení vzorku s FM4-64. **(A)** Přehled uspořádání epidermálních buněk kořene připomíná správné uspořádání buněk, stejně jako u WT. **(B)** Ohraničená část CLSM snímku zachycuje organizaci téměř všech vrstev buněk obsažených u kořene WT (EP - epidermis, C - kortex, En - endodermis, P - pericykl, LRC - boční kořenová čepička, RC - kořenová čepička, CC - střední válec). **(C)** Zvětšení ohraničené oblasti v **(A)** ukazuje posloupnost periklinálních (tj. formativních; plné kruhy) a antiklinálních (tj. proliferačních; prázdné kruhy) rovin dělení. **(D)** Zvětšení ohraničené oblasti v **(B)** podrobně zobrazuje kmenové buňky, obklopující buňky klidového centra (hvězdičky). **(E)** Grafické znázornění oblasti iniciál a buněk klidového centra, které jsou barevně odlišeny. Měřítko u všech snímků odpovídá délce 20  $\mu\text{m}$ .



## **9.5 Pozorování struktury kořene fixovaných vzorků**

Značná část experimentální práce byla věnována pozorování a studiu struktury buněk kořene, orientace cytoskeletu a lokalizace MPK6 pomocí metody whole mount (viz kap. 5.1.1). Fixované preparáty rostlin byly pozorovány pomocí konfokálního mikroskopu Spinning disc, s cílem lokalizovat proteiny značené protilátkami. Mikroskopické snímky byly zpracovány pomocí ZEN black programu.

### **9.5.1 Organizace cytoskeletu v průběhu buněčného dělení u WT a mutantů MPK6**

Cytoskelet rostlinné buňky představuje dynamickou strukturu, která se účastní několika klíčových procesů v průběhu existence rostlinné buňky, například kortikální mikrotubuly jsou zodpovědné za růst a diferenciaci buněk, mitotické vřetenko za segregaci chromozomů a struktura fragmoplastu je nezbytná pro oddělení nově utvořených dceřiných buněk.

#### **Mikrotubuly v interfázi**

Kortikální mikrotubuly jsou uspořádány paralelně a umožňují tak růst buněk do délky. Porovnáním snímků mutantů a kontrolní rostliny se ukázalo, že organizace kortikálních mikrotubulů není mutací narušena (Obr. 27).

#### **Preprofázní svazek mikrotubulů**

PPB se tvoří v kortikální oblasti buňky bezprostředně před zahájením mitózy a hraje klíčovou roli při orientaci roviny buněčného dělení. Kruh kortikálních mikrotubulů začíná jako široký pás obklopující jádro a postupně se zužuje, až zmizí na začátku mitózy. Stadia utváření PPB u WT Col-0 v dělicích se buňkách demonstruje umístění PPB v kortikální oblasti a jeho typický tvar prstence (Obr. 28).

#### **Mitotické vřetenko**

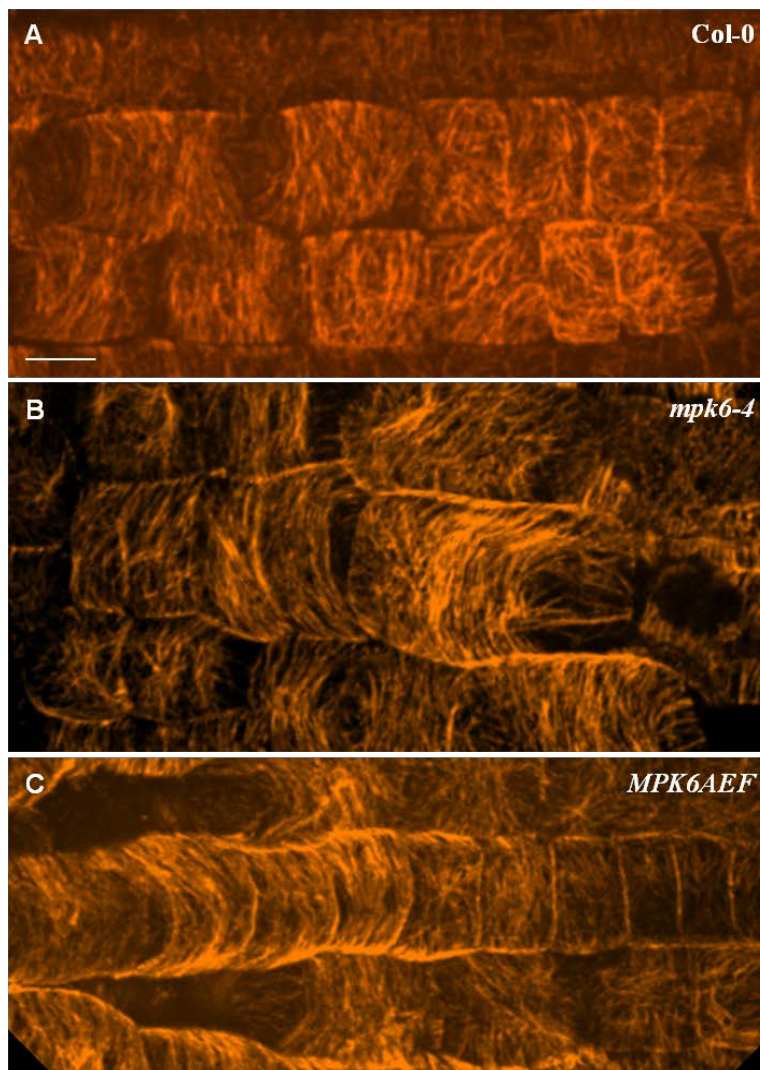
Mitotické vřetenko je buněčná struktura tvořená mikrotubuly, která umožňuje přesné rozdělení chromozomů během mitózy. V průběhu celého procesu mitózy mitotické vřetenko prochází dramatickou reorganizací, jak je znázorněno u WT na obrázku 29.

#### **Fragmoplast**

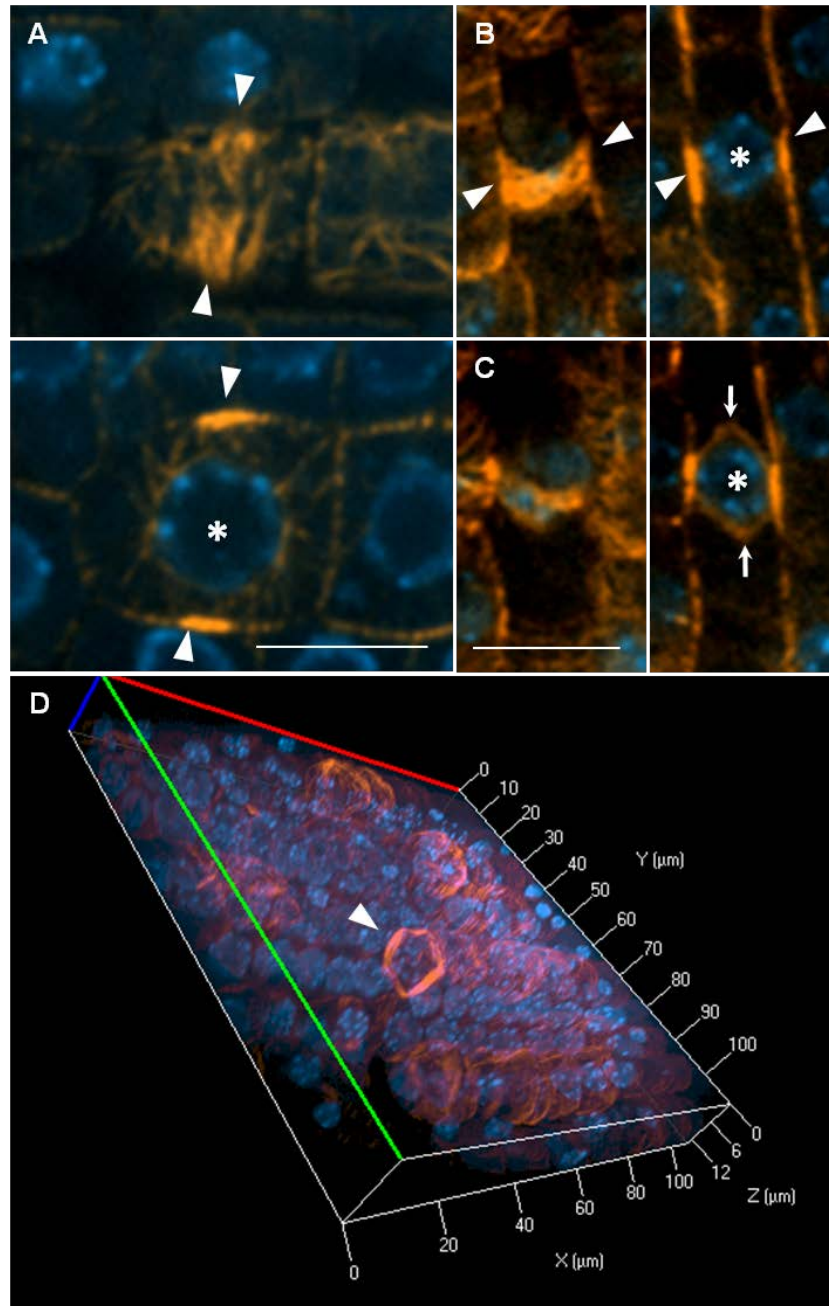
Fragmoplast je stejně jako PPB a mitotické vřetenko tvořen mikrotubuly a jeho funkcí je oddělit separované sesterské chromatidy do dvou buněk. Pomocí mikrotubulů je do místa vzniku nové buněčné stěny dopravován materiál a postupně vzniká buněčná přepážka, která je prekurzorem buněčné stěny. Fragmoplast (a buněčná přepážka) se tvoří směrem od středu buňky k jejímu

obvodu, poté se rozpadá, a znovu je obnovena struktura kortikálních mikrotubulů v interfázi. Tvorba fragmoplastu u kontrolní rostliny Col-0 je zachycena na obrázku 30.

Snímky organizace mitotických a cytokinetických struktur mikrotubulů u mutantu *mpk6-4* ukazují, že formování PPB, mitotického vřeténka a fragmoplastu se od WT příliš neliší (Obr. 31). Stejně tak v případě mutantu *MPK6AEF* snímky ukazují, že exprese ne-aktivovatelné varianty MPK6 nemá vliv na organizaci těchto struktur během buněčného dělení (Obr. 32).

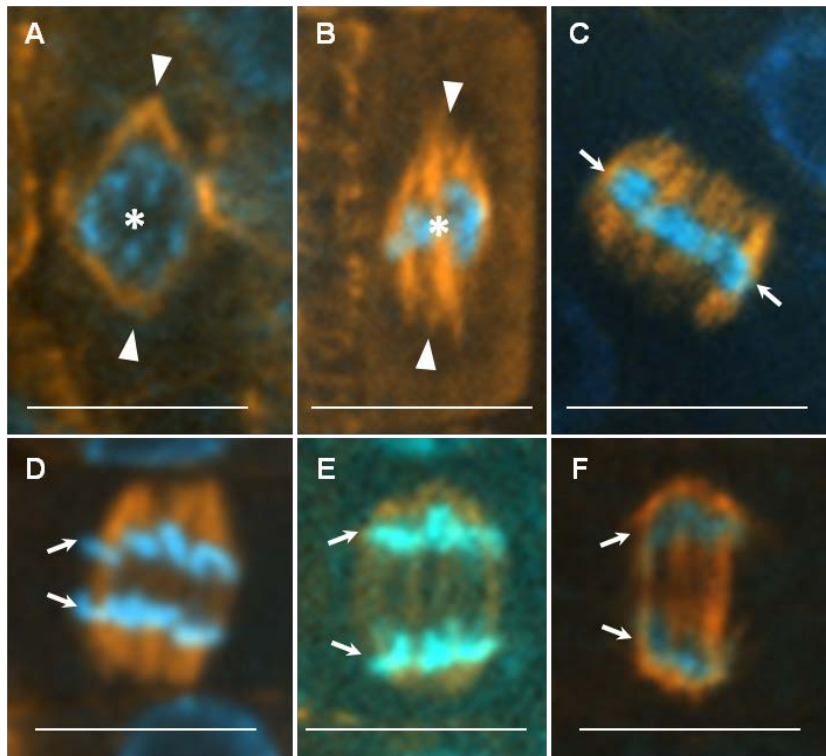


**Obr. 27** Uspořádání kortikálních mikrotubulů v interfázi epidermálních buněk kořene *Arabidopsis thaliana* Col-0 (A), *mpk6-4* (B) a (C) *MPK6AEF*. Měřítko 10  $\mu\text{m}$ .



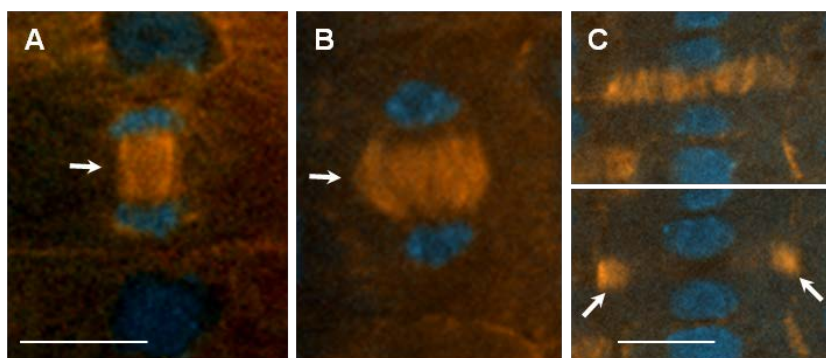
**Obr. 28** Stadia formování PPB (hroty šipek) u dělících se epidermálních buněk kořene *Arabidopsis thaliana*, ekotypu Col-0. **(A)** Raný PPB na povrchu (nahore) a ve střední rovině (dole) buňky. **(B)** Pozdější stadium kondenzovaného PPB na povrchu (vlevo) a ve střední rovině (vpravo) buňky. **(C)** PPB na začátku profáze. Na povrchu (vlevo) se PPB začíná ztenčovat, zatímco ve střední rovině (vpravo) se začíná tvořit bipolární mitotické vřeténko (šipky). **(D)** 3D pohled na kořenový meristéum znázorňuje prstencový tvar PPB a jeho umístění v kortikální oblasti buňky. Měřítko 10  $\mu\text{m}$ .





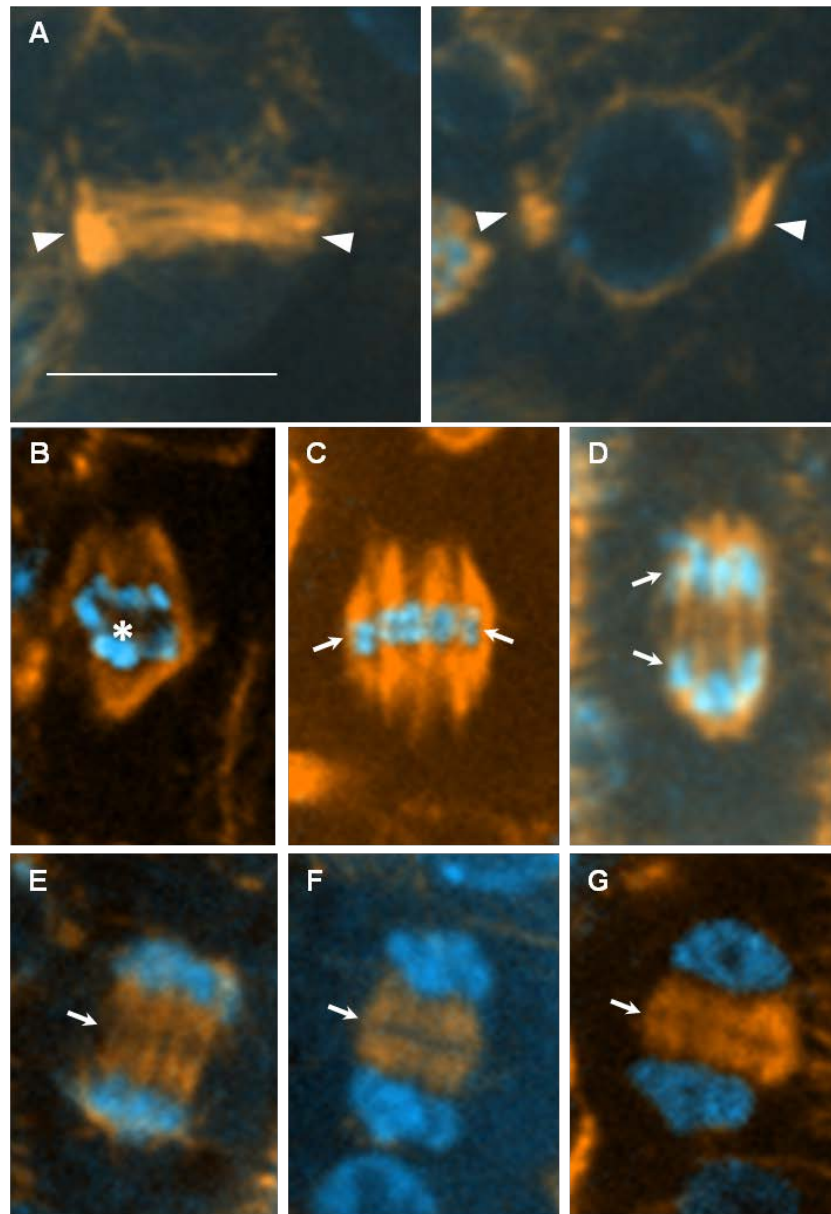
**Obr. 29** Stadia formování mitotického vřeténka (hroty šipek) u dělicích se buněk kořene *Arabidopsis thaliana*, ekotypu Col-0. **(A)** Bipolární mitotické vřeténko na počátku profáze obklopuje jádro (hvězdička). **(B)** Připojení mitotického vřeténka k chromozomům (šipky) v prometafázi. **(C)** Metafázní vřeténko s kinetochorovými vlákny a chromozomy, které jsou seřazeny v ekvatoriální rovině buňky. **(D)** Mitotické vřeténko v rané anafázi táhne sesterské

chromatidy k opačným pólům buňky. **(E)** Mitotické vřeténko v pozdní anafázi se zkracuje a sesterské chromatidy se přibližují k pólům buňky. **(F)** Telofázní vřeténko je uspořádáno do systému mikrotubulů na pólech, kde částečně obklopuje chromatidy (tzv. polar cap), a ve strukturu interzonálního systému mikrotubulů mezi sesterskými chromatidy. Měřítko 10  $\mu\text{m}$ .

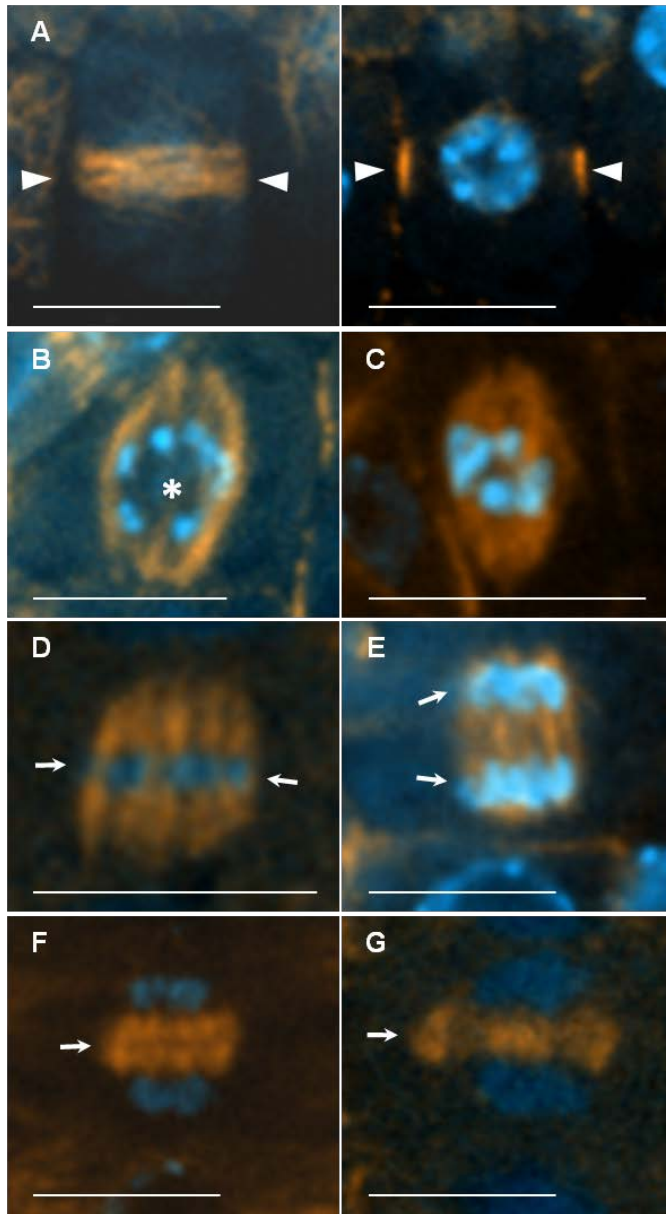


**Obr. 30** Stadia formování fragmoplastu při cytokinezi (šipky) u dělicích se buněk kořene *Arabidopsis thaliana*, ekotypu Col-0. **(A)** Pozdní telofáze: mitotické vřeténko postupně přechází ve strukturu fragmoplastu mezi dvěma skupinami sesterských chromatid. **(B)** Raný fragmoplast tvoří dvě skupiny antiparalelních mikrotubulů mezi dceřinými jádry. **(C)** Pozdní fragmoplast. Měřítko 10  $\mu\text{m}$ .

ma skupinami sesterských chromatid. **(B)** Raný fragmoplast tvoří dvě skupiny antiparalelních mikrotubulů mezi dceřinými jádry. **(C)** Pozdní fragmoplast. Měřítko 10  $\mu\text{m}$ .



**Obr. 31** Různé fáze mitózy u dělících se buněk kořene mutantní rostliny *Arabidopsis thaliana*, *mpk6-4*. **(A)** Raný PPB (hroty šipek) na povrchu (vlevo) a ve střední rovině (vpravo) buňky. **(B)** Mitotické vřeténko v profázi se váže na kondenzované chromozomy (hvězdička). **(C)** Mitotické vřeténko v metafázi s chromozomy uspořádanými v ekvatoriální rovině buňky (šipky). **(D)** Mitotické vřeténko v anafázi odděluje skupiny sesterských chromatid (šipky). **(E)** Telofázní vřeténko. **(F, G)** Fragmoplast. Měřítka 10  $\mu\text{m}$ .

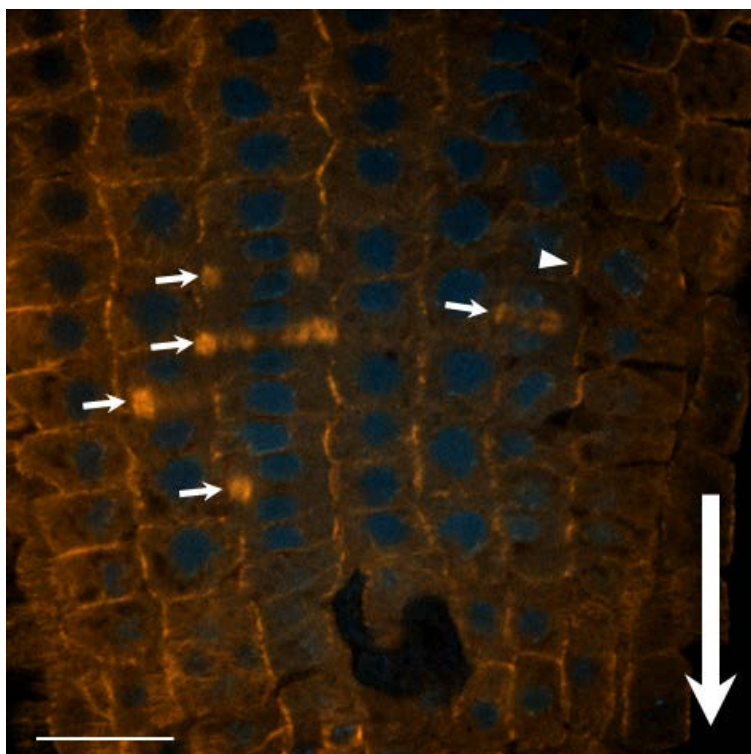


**Obr. 32** Různé stupně mitózy u dělicích se buněk kořene mutantní rostliny *Arabidopsis thaliana*, *MPK6AEF*. **(A)** Raný PPB (hroty šipek) na povrchu (vlevo) a ve střední rovině (vpravo) buňky. **(B)** Mitotické vřeténko v profázi okolo jádra (hvězdička) před rozpadem jaderné obálky. **(C)** Mitotické vřeténko v profázi se po rozpadu jaderné obálky váže ke kondenzovaným chromozomům (šipky). **(D)** Mitotické vřeténko v metafázi organizuje uspořádání chromozomů v ekvatoriální rovině buňky. **(E)** Anafázní vřeténko táhne skupiny sesterských chromatid směrem k pólům buňky. **(F)** Raný fragmoplast. **(G)** Pozdní fragmoplast (šipky označují místo vzniku buněčné přepážky). Měřítko 10  $\mu\text{m}$ .

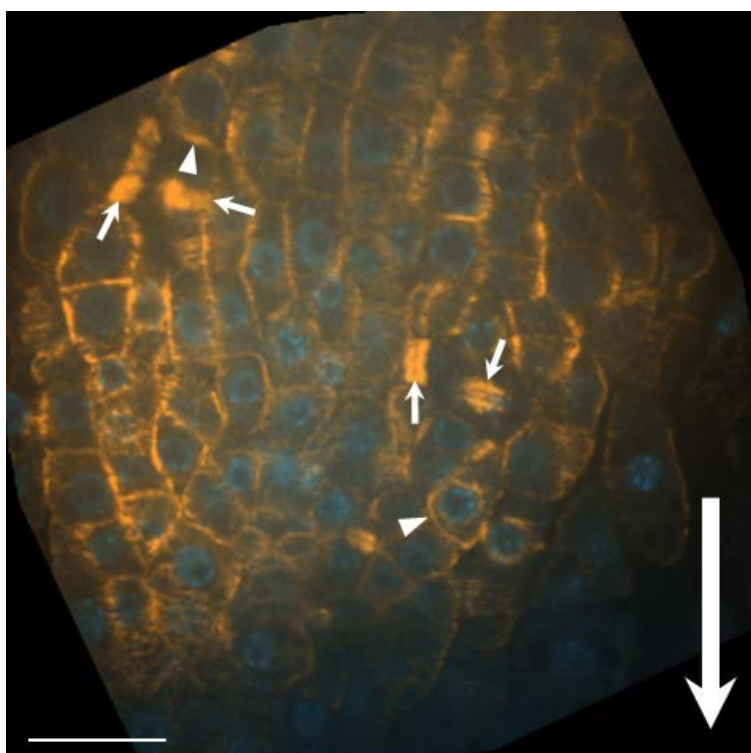
### 9.5.2 Organizace cytoskeletu ve vztahu k orientaci roviny dělení buněk

Defekty v orientaci roviny dělení, pozorované u mutantní rostliny *mpk6-4*, pravděpodobně souvisí s defekty v uspořádání PPB a fragmoplastu. Z tohoto důvodu bylo provedeno mikroskopické pozorování celého kořene (zejména v oblasti RAM), abychom zjistili, jak jsou tyto struktury orientovány v prostoru. U kontrolní rostliny Col-0 byla většina rovin buněčného dělení orientována kolmo k hlavní ose kořene, naproti tomu buňky kořenového meristému mutantu *mpk6-4* obsahují, ve vztahu k hlavní ose kořene, několik šikmo orientovaných PPB a fragmoplastů (Obr. 34). V případě *MPK6AEF* jsou fragmoplasty uspořádány kolmo k hlavní ose kořene, stejně jako je tomu u WT, což naznačuje obnovení správné orientace těchto mikrotubulárních struktur (Obr. 35).

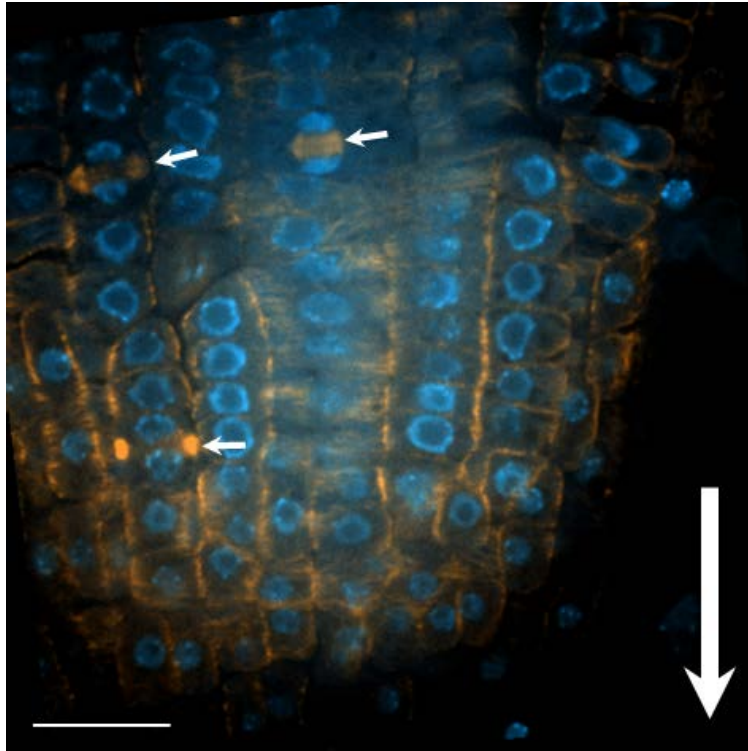




**Obr. 33** Kolmo orientovaný fragmoplast (šípky) a PPB (hrot šípky) buněk primárního kořene Col-0, ve vztahu k hlavní ose kořenového meristému (šípka vpravo dole). Měřítko 20  $\mu$ m.



**Obr. 34** Abnormální orientace fragmoplastu (šípky) a PPB (hroty šipek) buněk primárního kořene *mpk6-4*, vzhledem k hlavní ose kořenového meristému (šípka vpravo dole). Měřítko 20  $\mu$ m.



**Obr. 35** Kolmo orientovaný fragmoplast (šipky) buněk primárního kořene *MPK6AEF* vykazuje ve vztahu k hlavní ose kořenového meristému (šipka vpravo dole) podobnost s WT. Měřítka 20  $\mu\text{m}$ .

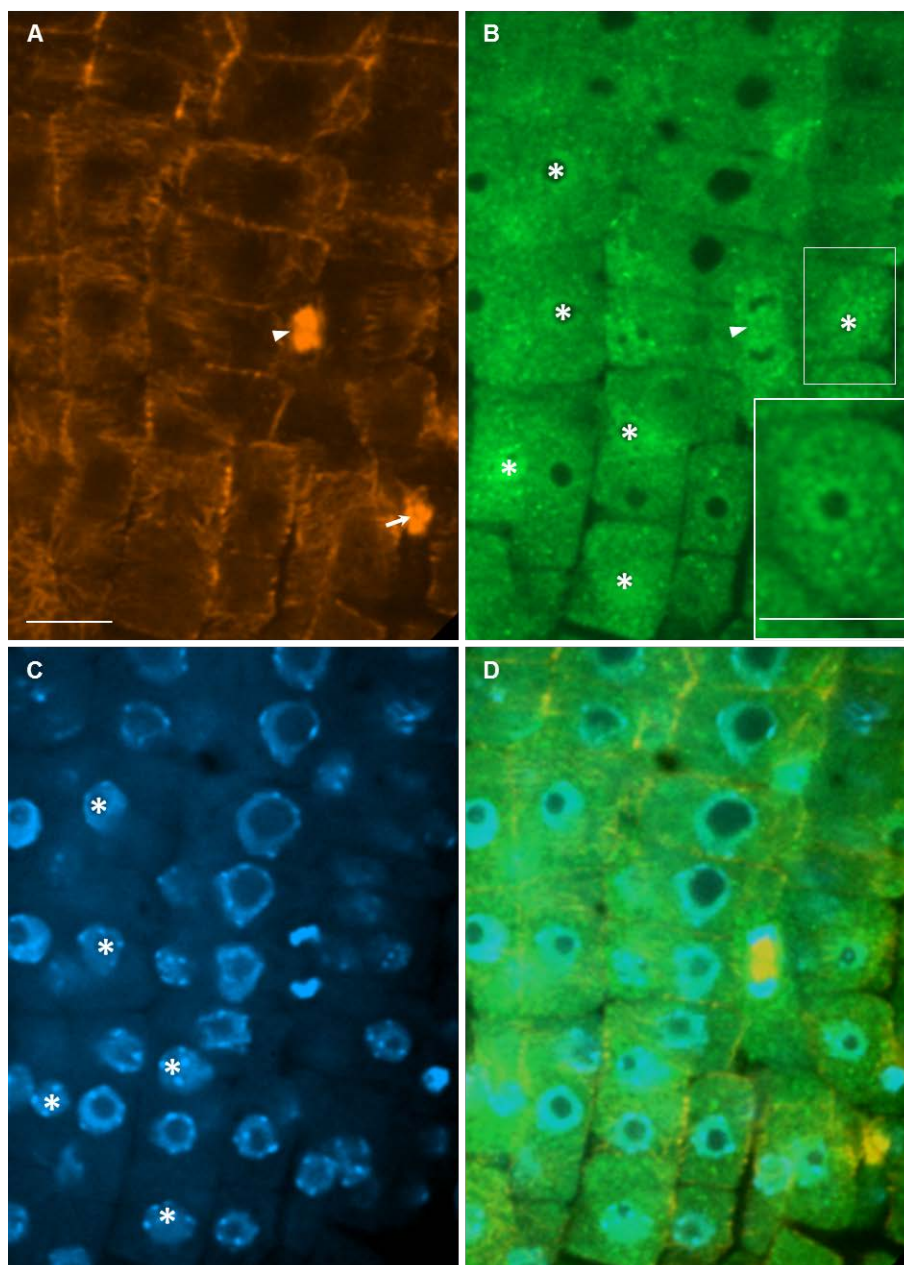
### 9.5.3 Lokalizace MPK6 metodou whole mount

Použitím imunolokalizační metody whole mount byla studována subcelulární lokalizace kinázy MPK6 u mutantů *mpk6-4* a *MPK6AEF* v porovnání s Col-0. Na základě publikovaných poznatků (Šamajová *et al.*, 2013) a předchozích experimentálních studií bylo zjištěno, že MAP kinázy (a rovněž kináza MPK6) jsou lokalizované převážně v jádře, ale také asociují s mikrotubuly (Müller *et al.*, 2010; Smékalová *et al.*, 2014b). V tomto experimentu byla studována lokalizace MPK6 v buňkách kořene *Arabidopsis* před a po aplikaci inhibitorů. Byly použity inhibitory jaderného transportu - importazol a ratjadon C, a inhibitor aktivace MAPK - PD98059.

#### a) Lokalizace MPK6 bez aplikace inhibitorů

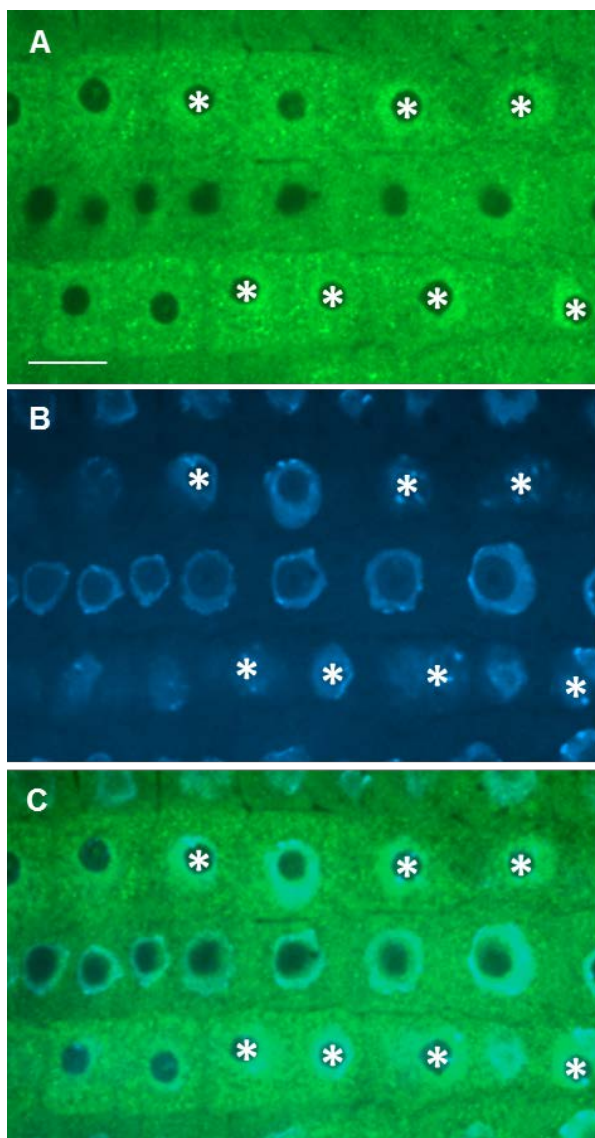
Jak již bylo zmíněno dříve, MPK6 je lokalizována převážně v jádře meristematických buněk kořene Col-0, avšak snímky tohoto experimentu ukazují cytoplazmatickou lokalizaci MPK6, například při asociaci se strukturami mikrotubulů během mitózy (s mitotickým vřeténkem, Obr 36). U nedělících se buněk v prodlužovací zóně kořene Col-0 byl jaderný signál ještě nápadnější (Obr. 37). Mutant *mpk6-4* neprodukuje MPK6 transkript, a proto se předpokládá, že nebude exprimovat tento protein. Lokalizace MPK6 v tomto případě sloužila jako negativní kontrola (Obr. 38). Mutant

*MPK6AEF* exprimuje ne-aktivovatelnou formu MPK6, a proto tento experiment může poskytnout poznatky o tom, jak aktivace MPK6 ovlivňuje lokalizaci této kinázy (Obr. 39).



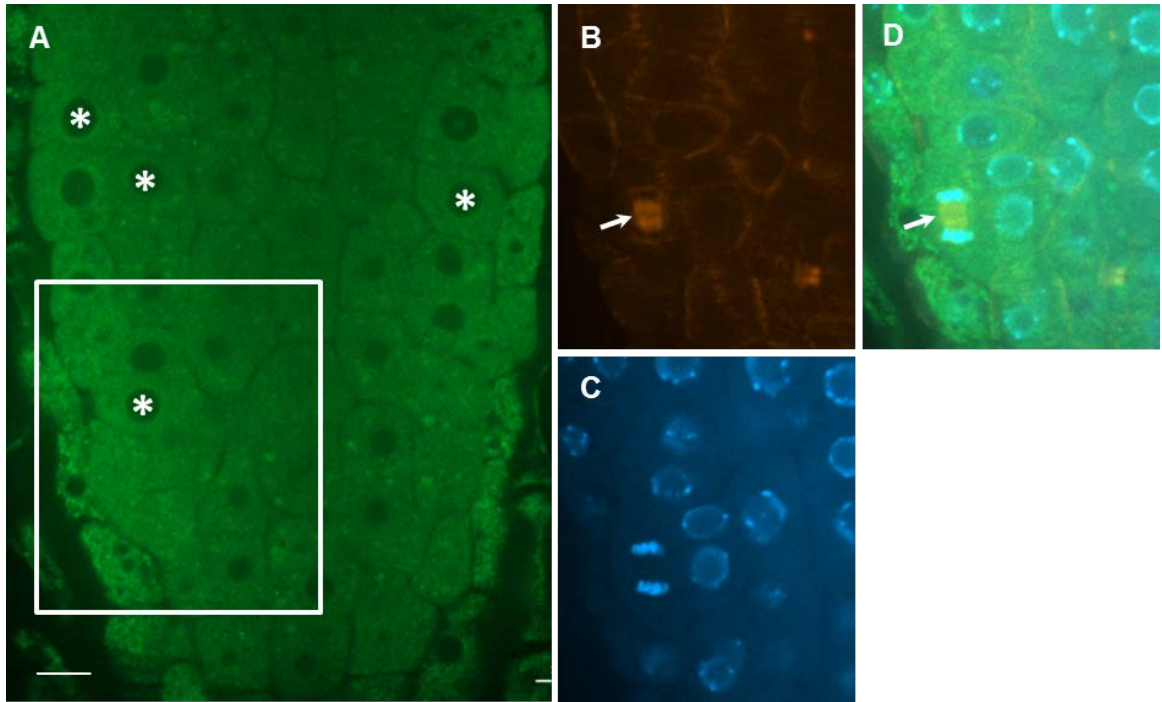
**Obr 36.** Imunolokalizace MPK6 v cytoplasmě a jádře buněk kořene *Arabidopsis thaliana* Col-0. **(A)** Lokalizace tubulinu ukazuje jeden telofázní systém (hrot šipky) a jeden pozůstatek fragmoplastu (šipka). **(B)** Lokalizace MPK6 v podobě jasně zelených skvrn v cytoplasmě, na fragmoplastu (hrot šipky) a v jádře (hvězdička). **(C)** Barvení jader (DNA) pomocí DAPI koresponduje s lokalizací anti-MPK6 protilátky (hvězdičky). **(D)** Fluorescence všech (A-C) kanálů najednou. Měřítko 10  $\mu\text{m}$ .



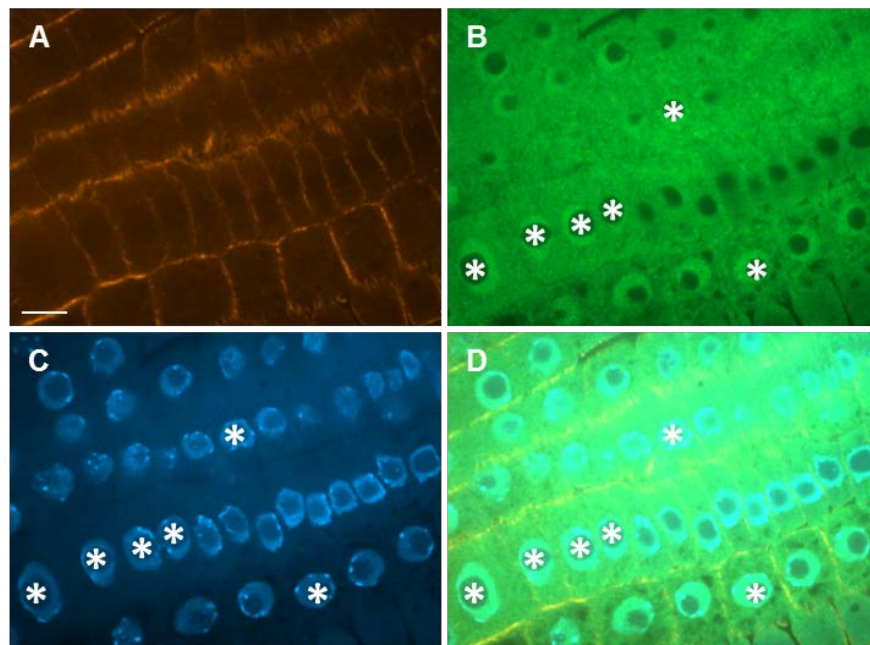


**Obr. 37** Subcelulární lokalizace MPK6 v buňkách dělivé zóny kořene Col-0. **(A)** Výrazný signál MPK6 (jasně zelené skvrny) v cytoplasmě, ale především v jádře (hvězdičky). **(B)** Barvení jader (DNA) pomocí DAPI koresponduje s lokalizací anti-MPK6 protilátky (hvězdičky). **(C)** Fluorescence **A-B** kanálů najednou. Měřítka 10  $\mu\text{m}$ .





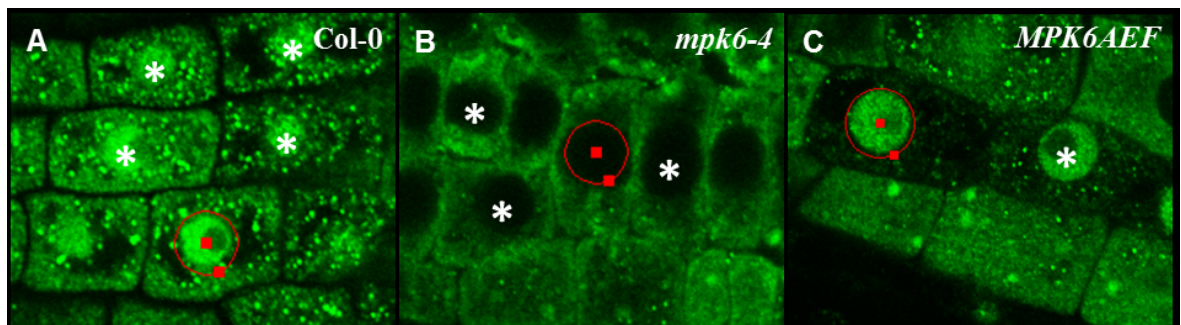
**Obr. 38** Lokalizace MPK6 v kořenovém meristému mutanta *mpk6-4*. (A) Lokalizace MPK6 v epidermálních buňkách kořenového meristému *mpk6-4*. (B) Lokalizace mikrotubulů v ohraničené oblasti snímku A ukazuje raný fragmoplast. (C) Barvení jader pomocí DAPI, snímek stejné oblasti. (D) Fluorescence všech A-C kanálů najednou. Měřítko 10  $\mu\text{m}$ .



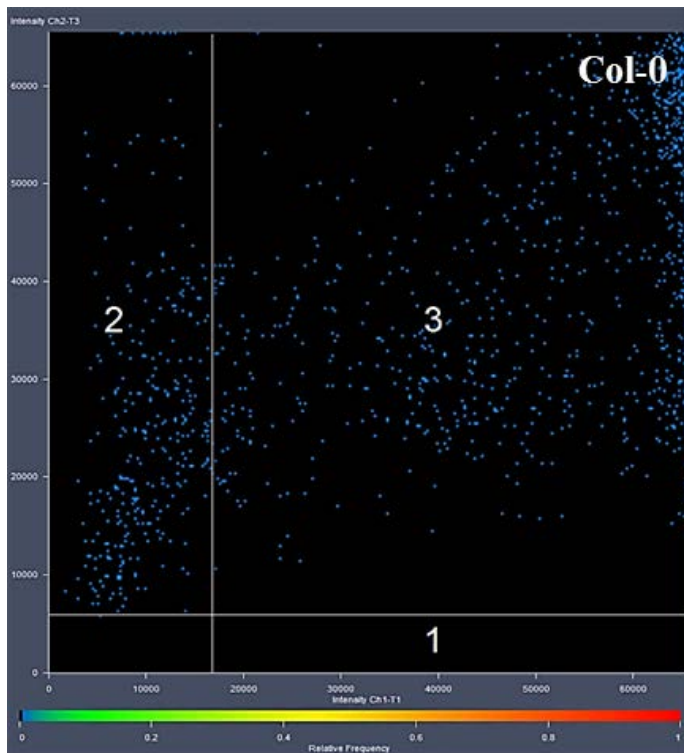
**Obr. 39** Jaderná lokalizace MPK6 v buňkách kořenovém meristému mutanta *MPK6AEF*. (A) Lokalizace mikrotubulů. (B) Lokalizace MPK6 ukazuje výrazný jaderný signál (hvězdičky). (C) Barvení jader pomocí DAPI, snímek stejné oblasti. (D) Fluorescence všech A-C kanálů najednou. Měřítko 10  $\mu\text{m}$ .

## b) Kolokalizační analýza a kvantifikace jaderné MPK6 u WT a mutantů MPK6

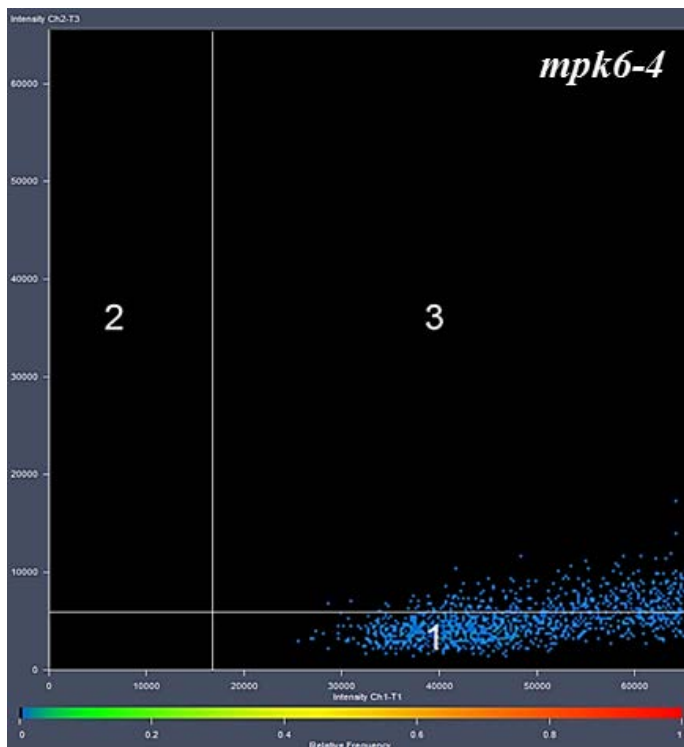
Rozdíly v kvantifikaci a lokalizaci jaderné MPK6 u Col-0, *mpk6-4* a *MPK6AEF* byly stanoveny na základě Pearsonovy kolokalizační analýzy mezi DAPI a anti-MPK6 barvením jader (např. Obr. 37C), s použitím vhodného plugin softwaru Zeiss Zen Black 2012, který automaticky vypočte shodu emitované fluorescence mezi dvěma různými kanály. Vstupní údaje jsou také automaticky přepočítány pomocí Costesova algoritmu (Costes *et al.*, 2004), který eliminuje šum nespecifické fluorescence obrazů. Výstupem je informace o prostorové kolokalizaci dvou různých fluoroforů, v závislosti na hodnotě Pearsonova koeficientu linearitity (R2). Tento koeficient nabývá hodnot od 0 do 1, kdy 0 představuje úplnou absenci kolokalizace a 1 absolutní shodu dvou fluoroforů v určité oblasti. Data jsou vynesena do bodového grafu. Na obrázku 41 je zachycena výrazná kolokalizace mezi DAPI a MPK6 u kontrolní rostliny Col-0. U mutantu *mpk6-4* bodový diagram podle očekávání ukazuje nepřítomnost kolokalizace mezi MPK6 a DAPI (Obr. 42), naopak v případě mutantu *MPK6AEF* kolokalizace narůstá (Obr. 43).



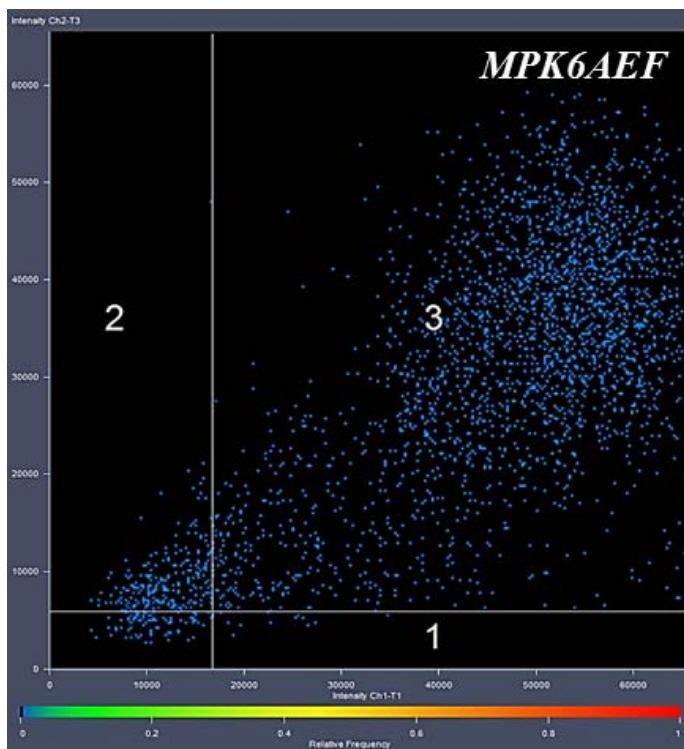
**Obr. 40** Rozdíly v lokalizaci MPK6 mezi Col-0, *mpk6-4* a *MPK6AEF* buněk kořene, vizualizace pomocí CLSM mikroskopie. (A) Výrazná nukleární (hvězdička) a cytoplazmatická (jasně zelené skvrny) lokalizace MPK6 v buňkách Col-0. (B) Buňky mutantu *mpk6-4* bez lokalizace MPK6, nejvíce patrná absence MPK6 v jádrech (hvězdička). Zdánlivý signál v cytoplazmě je pravděpodobně způsoben zesílením fotonásobiče na vyšší hodnotu, který byl použit pro vytvoření snímku, nebo nespecifickou vazbou sekundární protilátky. (C) Velmi silný jaderný signál (hvězdička) imunolokalizace proteinů MPK6 v buňkách mutantu *MPK6AEF*. Měřítko 10  $\mu\text{m}$ .



**Obr. 41** Typický bodový diagram ukazuje kolokalizaci DAPI a MPK6 barvení v jádře buněk kořenového meristému Col-0. Ohraničenou oblast jádra (v červeném kruhu: Obr. 40A) charakterizují hodnoty bodového grafu v poli 1, 2 a 3. Pole 1 a 2 jsou prahové hodnoty, které označují nepřítomnost kolokalizace dvou kanálů podle Costes *et al.*, 2004. Kolokalizace se vyskytuje v poli 3, kde modré skvrny označují pixely, vyjadřující shodu zeleného a modrého kanálu.



**Obr. 42** Bodový diagram ukazuje kolokalizaci DAPI a MPK6 barvení v jádře buněk kořenového meristému *mpk6-4*. Ohraničenou oblast jádra (v červeném kruhu: Obr. 40B) charakterizují hodnoty bodového grafu v poli 1, 2 a 3. Pole 1 a 2 jsou prahové hodnoty, které označují nepřítomnost kolokalizace dvou kanálů podle Costes *et al.* (2004). Slabá kolokalizace v oblasti 3 pravděpodobně odpovídá šumu kamery nebo nespecifickou vazbou sekundární protilátky.



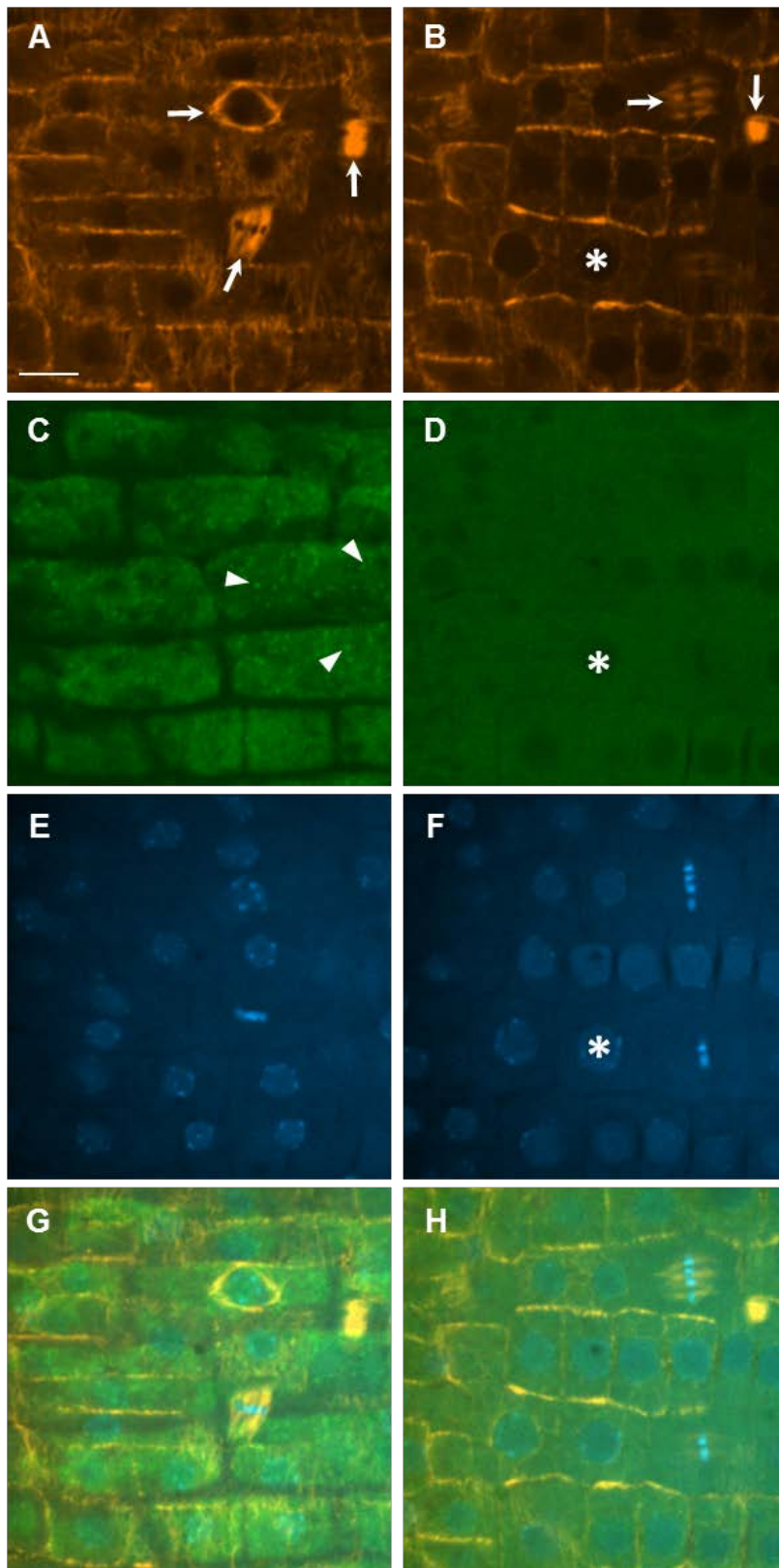
**Obr. 43** Bodový diagram ukazuje kolokalizaci DAPI a MPK6 barvení v jádře buněk kořenového meristému *MPK6AEF*. Ohraničenou oblast jádra (v červeném kruhu: Obr. 40C) charakterizují hodnoty bodového grafu v poli 1, 2 a 3. Pole 1 a 2 jsou prahové hodnoty, které označují nepřítomnost kolokalizace dvou kanálů podle Costes *et al.* (2004). Z tohoto snímku je zřejmé, že existuje vysoká frekvence kolokalizace v jádře *MPK6AEF*.

### c) Účinky inhibitorů jaderného transportu a aktivace MAPK na lokalizaci MPK6

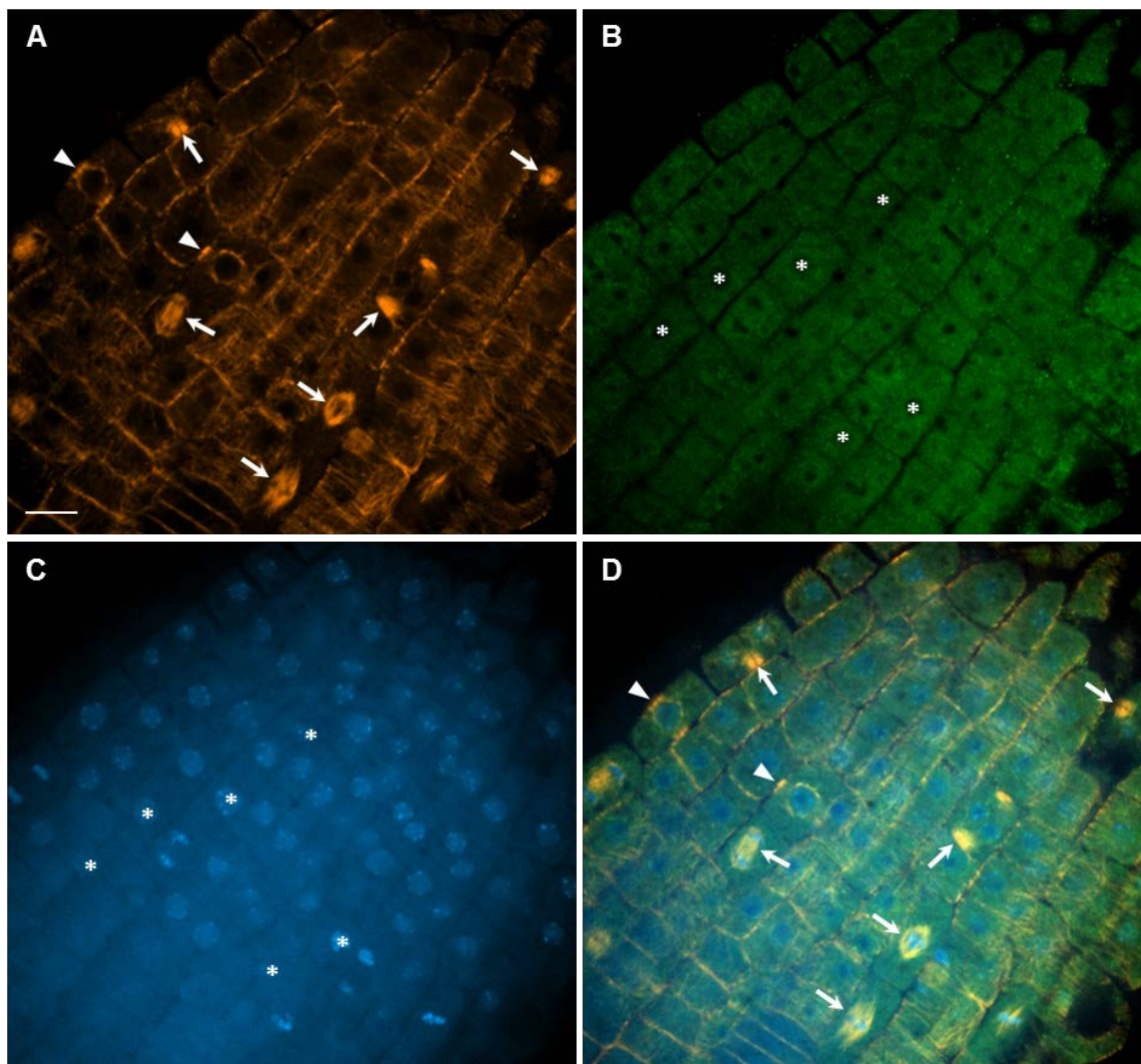
- **Importazol**

Importazol inhibuje jaderný transport receptoru importin- $\beta$  a zabraňuje tak nukleární import proteinů obsahujících NLS sekvenci (Söderholm *et al.*, 2011). Uvažuje se, že *Arabidopsis* kináza MPK6 je transportována do jádra prostřednictvím importin- $\beta$ -RanGTPasové kaskády (Šamajová *et al.*, 2013). Pro ověření hypotézy, zda jaderný lokalizační závisí na aktivním transportu MPK6, byly semenáčky Col-0 a *MPK6AEF* ošetřeny importazolem (viz Materiál a metody), a lokalizace MPK6 byla studována pomocí imunofluorescence. V případě Col-0 importazol zcela inhiboval jaderný transport, proto nebyla MPK6 lokalizována v jádře (Obr. 46). Naopak snímky Col-0 ukazují výrazný signál MPK6 v cytoplazmě, kdy se tato kináza shlukuje do jasných bodů (Obr. 44). Mutant *MPK6AEF* vykazuje absenci MPK6 v jádře, takže je patrné, že importazol zabraňuje vstupu MPK6 do jádra (Obr. 45). U tohoto mutantu byla rovněž provedena kvantitativní analýza pomocí Pearsonova kolokalizačního testu, která odhalila evidentní absenci kolokalizace MPK6 v jádře (Obr. 47).

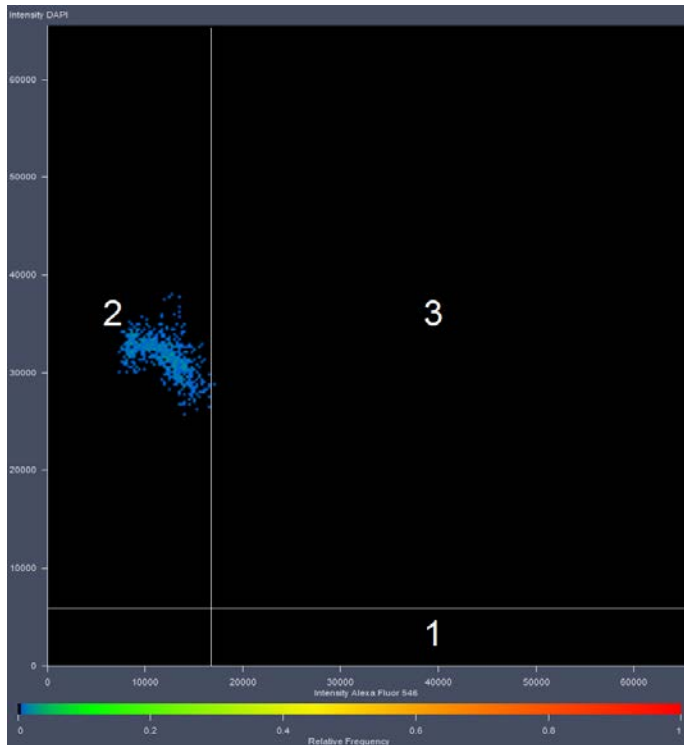




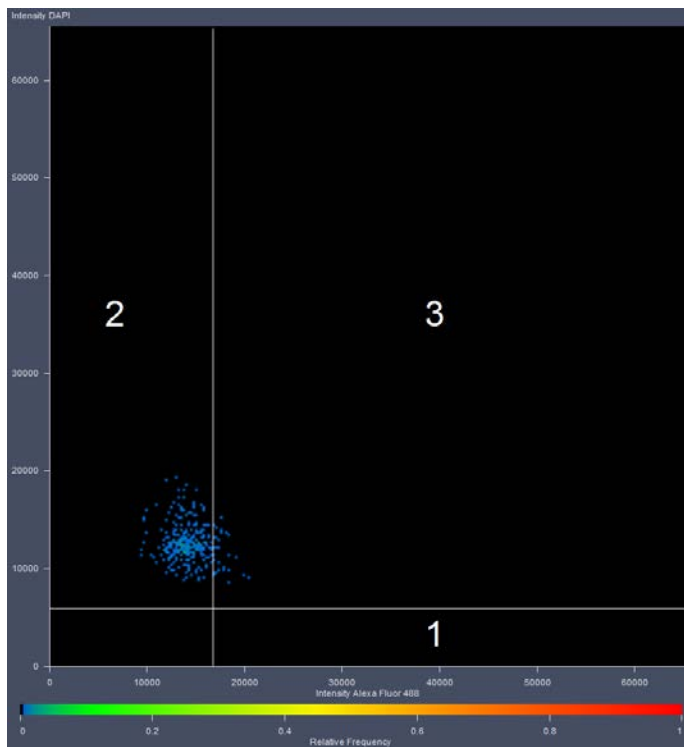
**Obr. 44** Účinky importazolu na subcelulární lokalizaci MPK6 v meristematických buňkách kořene *Arabidopsis Col-0*. (**A, B**) Lokalizace tubulinu ve dvou různých oblastech meristému. (**C, D**) Lokalizace MPK6 odpovídající stejným oblastem snímku **A** a **B**. Na obrázku **D** je patrná úplná absence signálu (hvězdička), zatímco v (**C**) cytoplazmě se MPK6 shlukuje do viditelných bodů (hroty šipek). Fluorescence všech **A-F** kanálů najednou. Měřítko 10  $\mu\text{m}$ .



**Obr. 45** Účinky importazolu na lokalizaci MPK6 u mutanta *MPK6AEF*. **(A)** Imunolokalizace tubulinu ukazuje PPB (hroty šipek), mitotické vřeténko a fragmoplast (šipky). **(B)** Lokalizace MPK6 chybí v jádře (hvězdičky). **(C)** Barvení jader pomocí DAPI. **(D)** Fluorescence všech A-C kanálů najednou. Měřítko 10 µm.



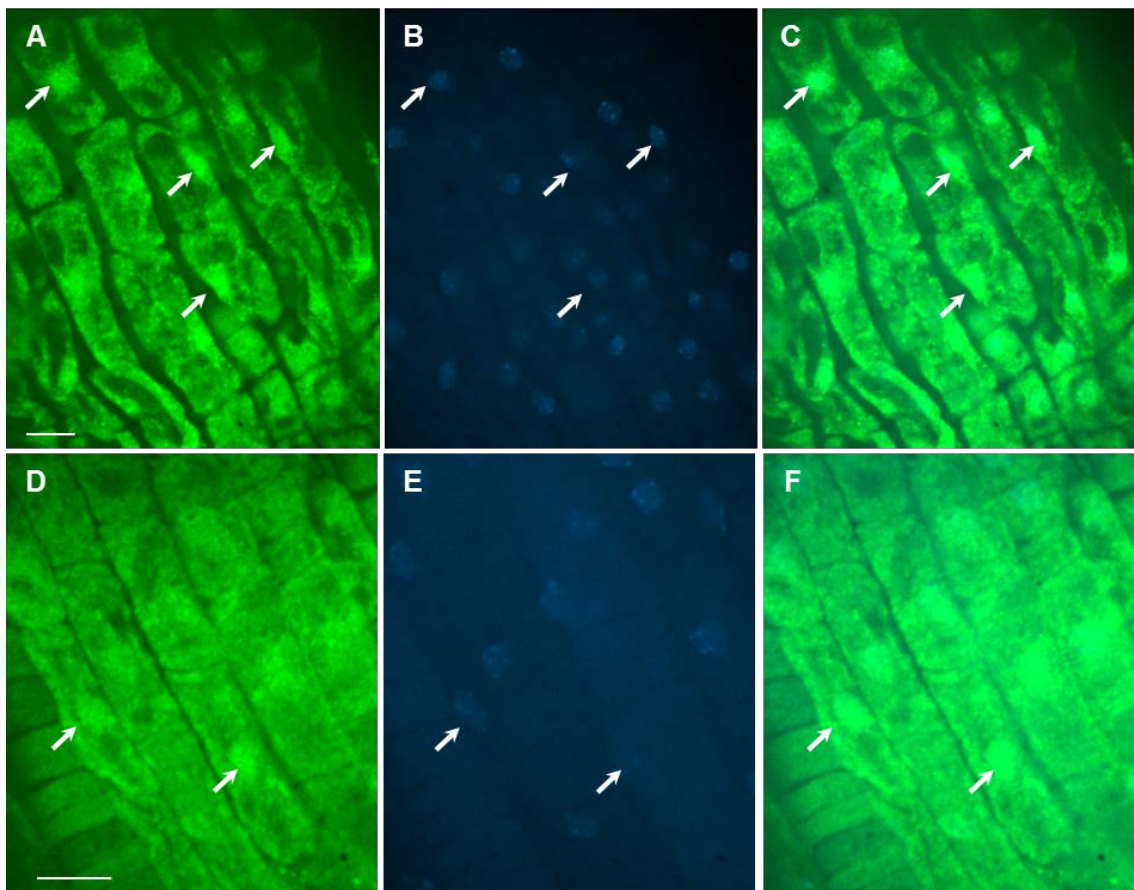
**Obr. 46** Kolokalizační analýza MPK6 a DAPI v jádrech kořenových buněk Col-0 po aplikaci inhibitoru (importazol). Signál je lokalizován v poli 2, kde se nachází prahové hodnoty vyjadřující absenci kolokalizace.



**Obr. 47** Kolokalizační analýza MPK6 a DAPI v jádrech kořenových buněk *MPK6AEF* po aplikaci inhibitoru (importazol). Signál je lokalizován v poli 2, kde se nachází prahové hodnoty vyjadřující absenci kolokalizace.

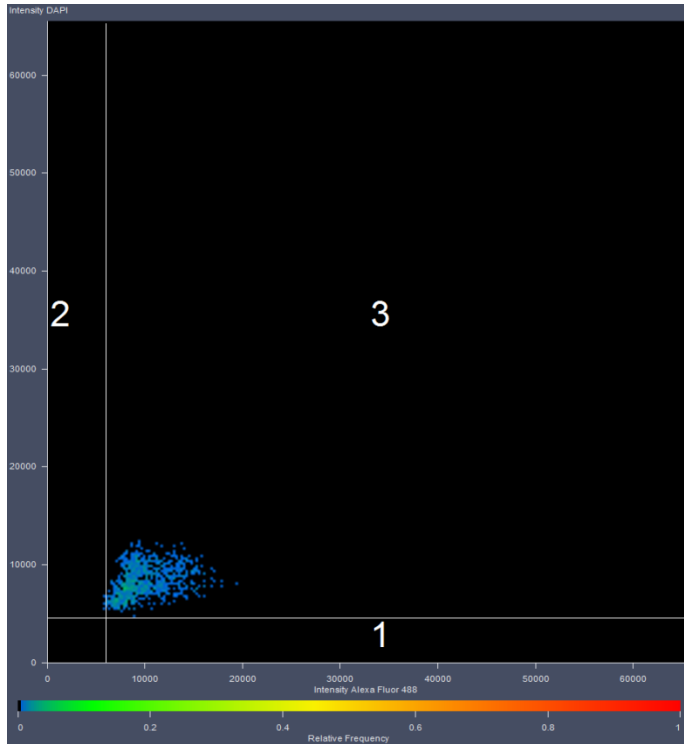
- **Ratjadon C**

Na rozdíl od importazolu, ratjadon C inhibuje jaderný export proteinů, obsahujících signální sekvenci NES, prostřednictvím exportin RanGTPázové dráhy (Meissner *et al.*, 2004). Jak již bylo uvedeno dříve v případě kinázy SIMK (z rostliny *Medicago sativa*), ortologu MPK6, aktivace SIMK může indukovat její přemístění z jadra do cytoplazmy (Samaj *et al.*, 2002). Uvažuje se, že MPK6 využívá stejný mechanismus transportu, a proto byla zkoumána lokalizace MPK6 v buňkách rostlin *Arabidopsis thaliana* Col-0 a *MPK6AEF* po aplikaci inhibitoru ratjadonu C. Snímky buněk kořenového meristému WT i mutanta ukazují cytoplazmatickou lokalizaci MPK6. Jaderný lokalizační signál je patrný u obou genotypů, avšak výraznější je na snímcích WT, než u mutanta *MPK6AEF* (Obr. 48). Rozdíly v obsahu jaderné MPK6 nejsou jednoznačné, a proto byla provedena kvantitativní analýza pomocí Pearsonovy korelace (Obr. 49, 50).

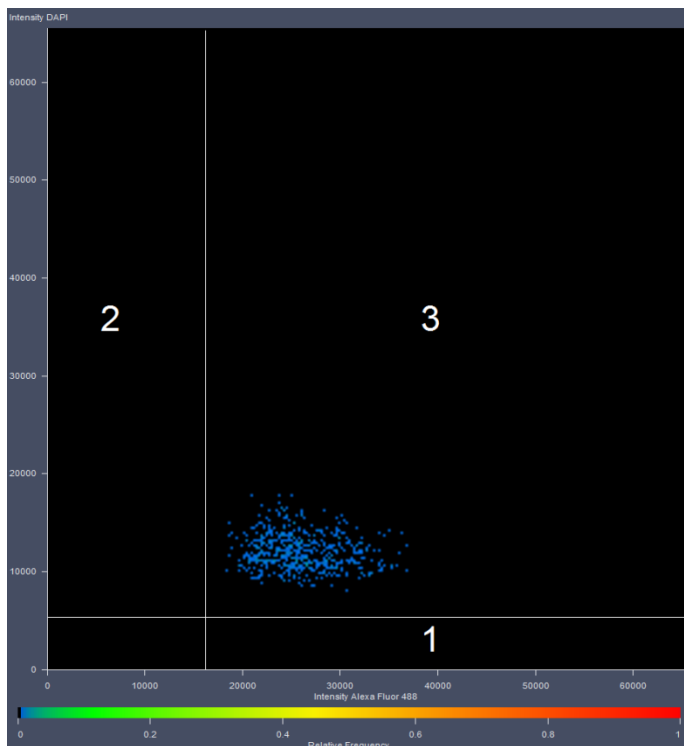


**Obr. 48** Účinky ratjadonu C na jadernou lokalizaci MPK6 kořenových buněk (A-C) Col-0 a (D-F) *MPK6AEF*. (A, D) Lokalizace MPK6, (B, E) jádra obarvená DAPI a (C, F) fluorescence obou kanálů najednou. U Col-0 je MPK6 lokalizována v jádrech (šipky), ale cytoplazmatický signál je rovněž patrný. Přestože je jaderná lokalizace MPK6 u *MPK6AEF* viditelná (šipky), signál není tak výrazný jako u WT. Měřítka 10  $\mu\text{m}$ .





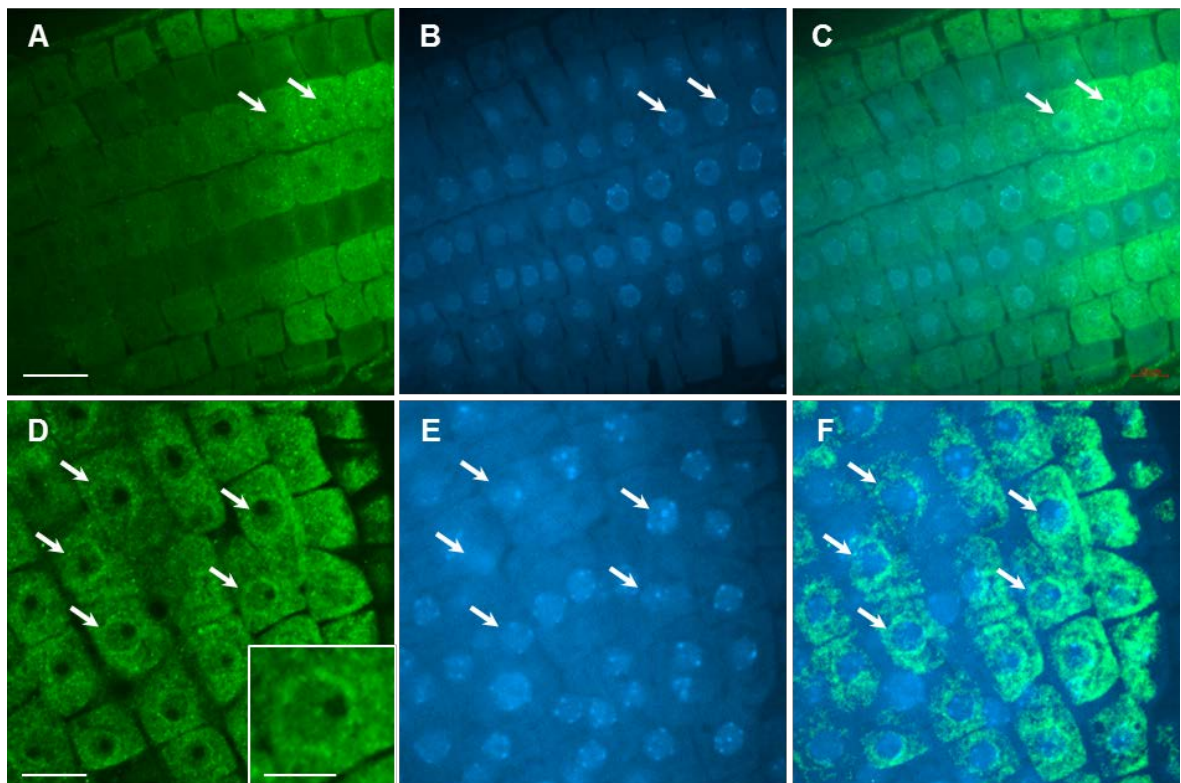
**Obr. 49** Kolokalizační analýza MPK6 a DAPI v jádrech kořenových buněk Col-0, po aplikaci inhibitoru (ratjadon C). Signál je lokalizován v poli 3 a ukazuje výraznou kolokalizaci.



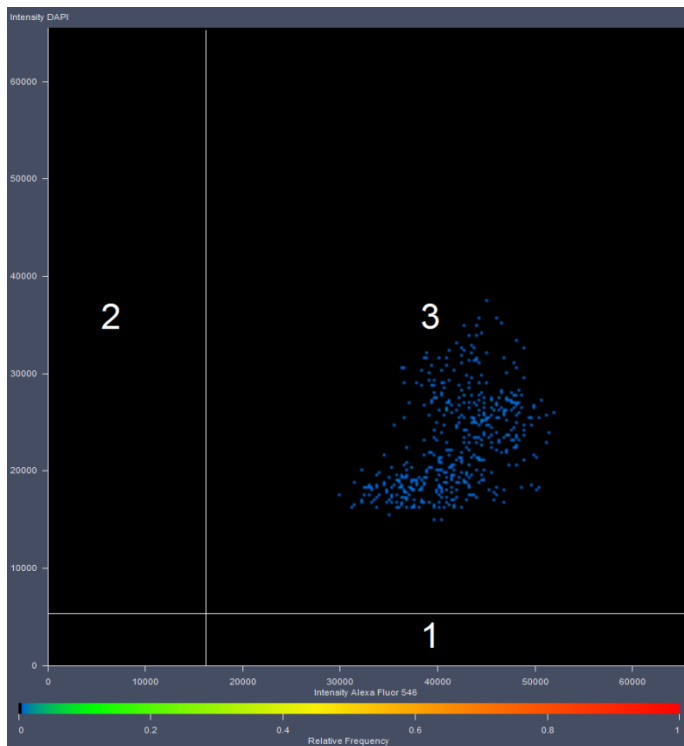
**Obr. 50** Kolokalizační analýza MPK6 a DAPI v jádrech kořenových buněk *MPK6AEF*, po aplikaci inhibitoru (ratjadon C). Signál je lokalizován v poli 3 a ukazuje výraznou kolokalizaci.

- **PD98059**

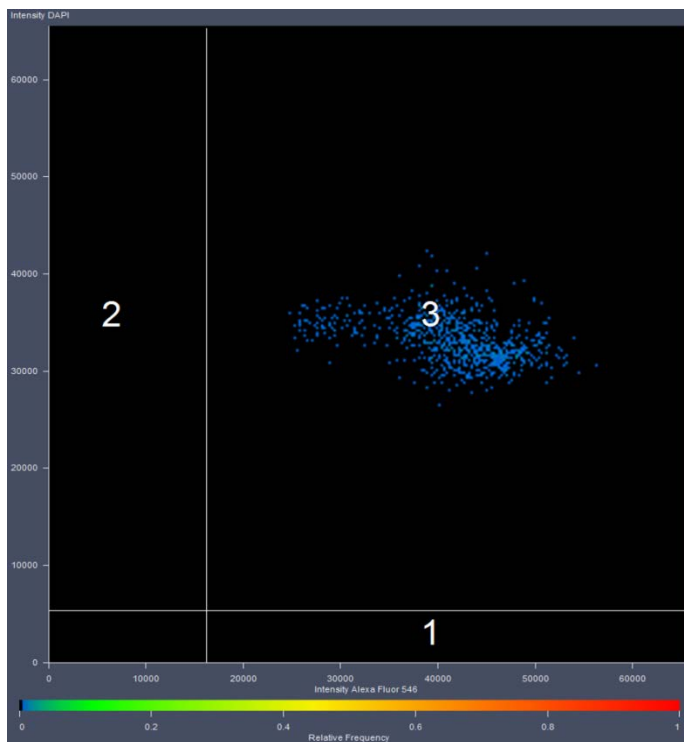
Inhibitor PD98059 a další inhibitory této kategorie inhibují MAP2 kinázy a zabraňují tak dvojitě fosforylaci a aktivaci MAPK (Alessi *et al.*, 1995). Jaderný import MAPK, ve vztahu k jejich aktivaci, nebyl doposud u rostlin studován. V případě mutanta *MPK6AEF* nelze MPK6 aktivovat, a proto jsme se v této práci zabývali studiem lokalizace MPK6 v buňkách kořene Col-0 a *MPK6AEF*. U obou genotypů není patrné, zda má PD98059 vliv na jadernou lokalizaci MPK6 (Obr. 51), což odpovídá tvrzení, že lokalizace MPK6 v jádře pravděpodobně přetrvává (Šamajová *et al.*, 2013). Rozdíly v obsahu jaderné MPK6 u Col-0 a *MPK6AEF* byly stanoveny pomocí kvantitativní analýzy Pearsonovou korelací. U obou genotypů byla potvrzena přítomnost jaderné MPK6 před a po aplikaci inhibitoru MAPK aktivace (Obr. 52, 53).



**Obr. 51** Účinky PD98059 na jadernou lokalizaci MPK6 kořenových buněk (A-C) Col-0 a (D-F) *MPK6AEF*. (A, D) Lokalizace MPK6, (B, E) jádra obarvená DAPI a (C, F) fluorescence obou kanálů najednou. U Col-0 je MPK6 lokalizována v jádrech (šipky), přestože je signál velmi slabý. U mutanta *MPK6AEF* je po ošetření inhibitorem MPK6 lokalizována na okraji jádra (šipky). Měřítko 10  $\mu\text{m}$ .



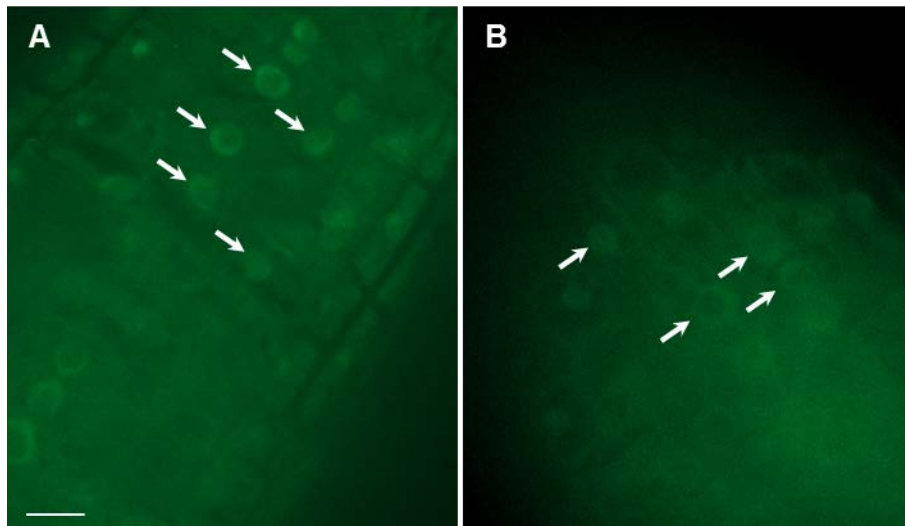
**Obr. 52** Kolokalizační analýza MPK6 a DAPI v jádrech kořenových buněk Col-0 po aplikaci inhibitoru (PD98059). Signál je lokalizován v poli 3 a ukazuje výraznou kolokalizaci.



**Obr. 53** Kolokalizační analýza MPK6 a DAPI v jádrech kořenových buněk *MPK6AEF* po aplikaci inhibitoru (PD98059). Signál je lokalizován v poli 3 a ukazuje výraznou kolokalizaci.

#### 9.5.4 GFP lokalizace MPK6

Přítomnost kinázy MPK6 bylo potřeba stanovit také u nativních vzorků. Toho bylo docíleno použitím stabilně transformované rostliny *Arabidopsis thaliana*, která exprimuje fúzní protein MPK6-GFP (připravil a laskavě poskytl Ivan Luptovčiak; Smékalová *et al.*, 2014). Pro experiment byly použity semenáčky ekotypu Col-0, exprimující gen MPK6, kultivované 5 dní na ½ MS médiu. Lokalizace MPK6 v živých buňkách byla stanovena nejprve u rostlin umístěných v DMSO, které sloužily jako kontrola, a poté u rostlin ovlivněných inhibitorem importazolem s DMSO. Tyto velmi předběžné výsledky potvrzují nukleární lokalizaci MPK6-GFP u Col-0. Z důvodu nedostatečné citlivosti GFP se ale nepodařilo prokázat cytoplazmatickou lokalizaci MPK6-GFP. Tyto předběžné výsledky ukázaly účinnou inhibici MPK6 jaderného importu po aplikaci inhibitoru importazolu (Obr. 54).

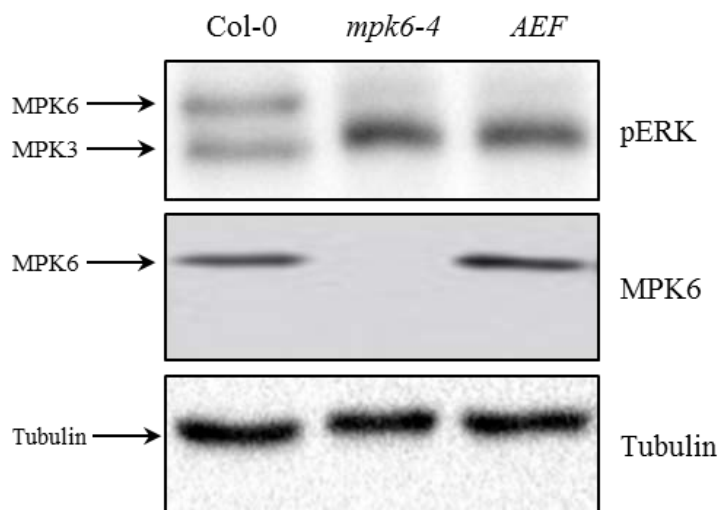


**Obr. 54** Lokalizace MPK6-GFP v kořenech *Arabidopsis Col-0* (A) před a (B) po aplikaci inhibitoru (importazol). Signál v jádrech buněk před aplikací inhibitoru (šipky) je vyšší, než u buněk ošetřených importazolem.

#### 9.6 Imunochemická charakterizace mutantů a WT

V předložené diplomové práci byly studovány dva typy mutantních rostlin s defektem v genu pro MAP kinázu MPK6. Prvním z nich je mutant *mpk6-4*, který neexprimuje MPK6 transkript, a proto se předpokládá, že není schopen tento protein produkovat. U druhé mutantní rostliny *MPK6AEF* sice dochází k expresi MPK6, avšak mutací vzniká ne-aktivovatelná forma MPK6. Pro ověření těchto mutantních rostlin byla provedena Western blot analýza, s cílem detekovat celkové množství fosforylovaných (aktivovaných) a nefosforylovaných (neaktivovaných) MPK6 pomocí polyklonální anti-MPK6 protilátky (anti-pTEpY), a dále bylo studováno, zda MPK6 může být

aktivována dvojitou fosforylací u zmíněných mutantů, pomocí protilátky specificky rozpoznávající dvojitě fosforylovaný TEY motiv MAP kináz, který je obsažen také u MPK6 kinázy (Obr. 55).



**Obr. 55** Detekce přítomnosti aktivované a neaktivované MPK6 ve vzorku rostlin *Arabidopsis thaliana* Col-0, *mpk6-4* a *MPK6AEF*. Horní snímek znázorňuje výsledky imunodetekce aktivovaných MAPK za použití anti-pTEpY protilátky (pERK). V případě Col-0 jsou viditelné dva pruhy, horní odpovídá detekci aktivované MPK6 a chybí u obou mutantů, spodní proužek odpovídá detekci aktivované MPK3. Prostřední snímek imunodetekce aktivované i neaktivované MPK6 ukazuje přítomnost MPK6 u genotypů Col-0 a *MPK6AEF*, chybí u mutantu *mpk6-4*. Spodní snímek odpovídá imunodetekci  $\alpha$ -tubulinu, která byla použita pro kontrolu nanášení vzorku.

## 10 Diskuze

### 10.1 Fenotyp MPK6 mutantů je ovlivněn poruchami v orientaci roviny buněčného dělení

Předchozí studie odhalily zapojení kinázy MPK6 do několika klíčových procesů vývoje rostlin, mezi které patří například regulace orientace roviny dělení buněk. Bylo zjištěno, že MPK6 je součástí signální kaskády YODA-MKK4/5-MPK3/6, zapojené v regulaci embryogeneze *Arabidopsis* (Lukowitz *et al.*, 2004; Bayer *et al.*, 2009), kdy je tato dráha aktivována prostřednictvím membránového kinázového receptoru SSP a je pravděpodobně zapojena v regulaci prodlužování zygoty a tvorbě suspensoru prostřednictvím transkripčního faktoru GRD (Ueda a Laux, 2012; Musielak a Bayer, 2014). Zapojení YODA v embryogenezi je nesmírně důležité pro regulaci buněčného dělení a správný vývoj embrya. U mutantů YODA je vývoj embrya a suspensoru narušen, což vede k abnormálnímu vývoji kořene, děloh a listů celé rostliny (Smékalová *et al.*, 2014b). Tato zjištění také poukazují na zásadní význam signalizace MPK3/MPK6 kináz v procesu asymetrického a symetrického dělení buněk. Stále však zůstává otázkou, jak jsou tyto komponenty MAPK signalizace zapojeny v regulaci orientace roviny buněčného dělení - zda je jejich funkce přímá a dochází k regulaci cytoskeletálních substrátů prostřednictvím aktivace fosforylací, nebo nepřímá a MPK3/6 pouze aktivují transkripční faktory pro regulaci genové exprese cytoskeletálních proteinů. Vodítkem při hledání odpovědi na tyto otázky může být zjištění, že MPK6 je v průběhu buněčného dělení lokalizována na PPB a fragmoplastu (např., Müller *et al.*, 2010) a uvažuje se, že tato lokalizace souvisí s fosforylací MPK3/6 prostřednictvím YODA kaskády. Toto tvrzení vyplývá z výsledků experimentu konstitutivně aktivního mutantu  $\Delta$ Nyda, který podporuje asociaci MPK6 s PPB a fragmoplastem v mnohem větším rozsahu, než u kontrolní rostliny. MPK6 navíc váže a fosforyluje hlavní zesilovací protein MAP65-1 (Smékalová *et al.*, 2014b), který se podílí na organizaci dynamiky fragmoplastu (Sasabe a Machida, 2012). Avšak v té samé studii bylo prokázáno, že regulace aktivity YODA kaskády (a následně kináz MPK3/6) má vliv na transkripční regulátory pro kontrolu orientace roviny dělení (např. TANGLED; Walker *et al.*, 2007), a to znamená, že role MPK6 v regulaci orientace roviny dělení je pravděpodobně univerzální.

V této studii byl charakterizován fenotyp kořene a embryí mutantních rostlin *Arabidopsis thaliana mpk6-4*, postrádající expresi genu MPK6. Tito mutanti vykazují řadu defektů na úrovni embryonálního i postembryonálního vývoje, kdy dochází k tvorbě abnormálního embrya a suspensoru, což má vliv na pozdější vývoj kořene. Některé mutantní rostliny tvořily aberantní kořeny, jiné kořen zcela postrádaly. Na úrovni embryonálního vývoje u mutantu *mpk6-4* bylo formování hypofýzy mutací ovlivněno a vzhledem k tomu, že hypofýza dává základ kořenovému meristému, lze předpokládat narušení vývoje kořene. Detailním pozorováním embryí a většiny buněk kořenového meristému ve všech vrstvách buněk kořene bylo zjištěno, že tyto vady vznikají v důsledku chybného umístění buněčné přepážky, nikoli na základě jiných vad v růstu buněk.

Zda je aktivita MPK6 nezbytná pro regulaci orientace roviny dělení bylo zkoumáno na embryích a semenáčcích mutanta *MPK6AEF*. Výsledky překvapivě ukázaly tzv. zachráněný fenotyp embryí, kořenů a celých semenáčků, který se více méně podobá fenotypu kontrolní rostliny. Na úrovni kořenového meristému se ukázalo, že většina poruch v orientaci roviny buněčného dělení u mutanta *mpk6-4* bylo odstraněno na všech úrovních, od epidermálních buněk, až po niche v apikálním kořenovém meristému. Skutečnost, že semenáčky *MPK6AEF* exprimují ne-aktivovatelnou variantu MPK6 (jak ukazuje příslušná analýza Western blot) naznačuje, že MPK6 může vykonávat další funkci, nezávislou na její aktivaci.

## 10.2 Funkce MPK6 při organizaci cytoskeletu

Jak již bylo zmíněno dříve, orientace roviny buněčného dělení souvisí se správnou organizací cytoskeletu dělící se buňky (Shao a Dong, 2016) a je definována před nástupem mitózy. Rovina dělení vzniká uspořádáním kortikálních mikrotubulů do struktury PPB a přítomností několika proteinových markerů, které jsou umístěny v oblasti PPB po celou dobu mitózy a dlouho poté, co se PPB rozpadá (Buschmann *et al.*, 2015). Tyto proteiny nějakým způsobem přitahují okraje rozšiřujícího se fragmoplastu pro vznik nové buněčné přepážky v témže místě mateřské buňky (Rasmussen *et al.*, 2011, Lipka *et al.*, 2015). Poruchy v orientaci roviny dělení buněk jsou spojeny se ztrátou nebo poruchou tvorby PPB (např. Camilleri *et al.*, 2002), rotací mitotického vřeténka, nebo dezorientace fragmoplastu (Panteris *et al.*, 2011; Murata *et al.*, 2013).

Mikrotubulární cytoskelet se v průběhu dělení reorganizuje do struktury PPB, avšak v interfázi je rozptýlen v kortikální oblasti. Pomocí imunoznačení tubulinu bylo toto uspořádání mikrotubulů pozorováno u všech semenáčků studovaných rostlin (*Col-0*, *mpk6-4* a *MPK6AEF*). Kortikální mikrotubuly v interfázi jsou paralelně uspořádány a v této orientaci se vytváří také PPB, který vykazuje klasickou podobu prstence, zatímco mitotické vřeténko prochází v průběhu dělení značnou transformací. Přehled větší oblasti kořenového meristému však ukázal, že umístění PPB a fragmoplastů se do značné míry liší u *mpk6-4* mutantů. V tomto případě bylo pozorováno šikmé nebo periklinální umístění PPB a fragmoplastu v oblastech, kde obvykle probíhá dělení antiklinální. Naopak u mutanta *MPK6AEF* byla pozorována normální orientace roviny dělení buněk.

## 10.3 Lokalizace MPK6

Transkripční regulace proteinů účastnících se orientace roviny buněčného dělení souvisí s umístěním MPK6 v jádře, což potvrdily také předchozí studie lokalizace MPK6 pomocí GFP (např. Sethi *et al.*, 2014; a také tato studie). Jaderná lokalizace MPK6 může být spojena



s fosforylací a regulací transkripčních faktorů (např. WRKY; Weyhe *et al.*, 2014) a v několika málo případech byly tyto transkripční faktory identifikovány jako substráty pro MPK6 (např. WRKY34; Guan *et al.*, 2014). Mechanismus jaderné lokalizace MPK6 nebyl dosud objasněn a MPK6 je v podstatě považována za jaderný protein, ačkoli značnou část MPK6 můžeme lokalizovat na plazmatické membráně, asociovanou s mikrotubuly a na membránách vezikul (Müller *et al.*, 2010; Smékalová *et al.*, 2014b). MPK6 obsahuje ve své sekvenci NLS a NES motivy (Šamajová *et al.*, 2013), avšak doposud není známo, zda je doprava mezi jádrem a cytoplazmou řízena prostřednictvím importin/RanGTPázové dráhy, a zda je podmíněna aktivací MPK6.

V této práci byla jaderná lokalizace MPK6 určena imunofluorescenční detekcí MPK6 u fixovaných vzorků, a v živých buňkách stabilně exprimujících MPK6-GFP marker. V prvním případě jaderná lokalizace MPK6 nebyla ve všech buňkách konzistentní, což bylo pravděpodobně způsobeno obtížnou prostupností protilátek přes nukleoplazmu. Na druhé straně MPK6-GFP značení ukázalo rozsáhlejší jadernou lokalizaci, avšak v důsledku nižší citlivosti detekce GFP markerů se nepodařilo odpovídajícím způsobem označit výskyt MPK6 v cytoplazmě. U vzorků značených imunofluorescencí byla jaderná MPK6 kvantifikována pomocí kolokalizace s DNA značenou DAPI. Bylo pozorováno, že u mutantu *MPK6AEF* se v porovnání s kontrolou (Col-0) a negativní kontrolou (*mpk6-4*) kolokalizace zvyšuje. Toto zjištění naznačuje, dvě možnosti: lokalizace MPK6 v jádře nemusí být závislá na aktivaci a jaderný export MPK6 spíše souvisí s její aktivací, stejně jako je tomu u homologa *Arabidopsis thaliana* MPK6 rostliny *Medicago sativa* (SIMK), kdy SIMK se vyskytuje převážně v jádře a je exportována z jádra při aktivaci (Samaj *et al.*, 2002; Ovečka *et al.*, 2014).

Pro předběžný přehled mechanismů lokalizace jaderné MPK6 byly použity tři inhibitory: importazol inhibující NLS interakci s importinem- $\beta$  a tím aktivnímu jadernému transportu dovnitř jádra (Söderholm *et al.*, 2011), ratjadon C, ne-reverzibilní inhibitor NES signálu s exportinem 1 pro inhibici aktivnímu jadernému exportu (Köster *et al.*, 2003), a PD98059, který je inhibitorem MAPKK a inhibuje aktivaci MAPK prostřednictvím duální fosforylace (Alessi *et al.*, 1995). V tomto experimentu importazol zrušil jadernou lokalizaci MPK6, jak ukazuje kolokalizační analýza, zatímco ratjadon C znásobil výskyt MPK6 v jádře. Tyto výsledky naznačují, že pohyb MPK6 mezi jádrem a cytoplazmou pomocí aktivních mechanismů jaderného transportu zprostředkovávají importiny a exportiny, jak již bylo dříve uvedeno v případě savčí MAPK (Wainstein a Seger, 2016). Navíc ratjadon C umocňuje zadržování MPK6 v jádře, a to naznačuje, že jaderný export je pravděpodobně aktivní proces a závisí na mechanismech jaderného exportu. V případě kontrolní rostliny a Col-0 a mutantu *MPK6AEF* měly oba inhibitory (importazol i ratjadon C) stejný účinek. Výsledky jaderné lokalizace MPK6 po aplikaci těchto inhibitorů ukazují nepřítomnost MPK6 v jádře, a pokud uvažujeme skutečnost, že Col-0 exprimuje aktivovatelnou formu MPK6 a mutant *MPK6AEF* neaktivovatelnou, můžeme se domnívat, že transport MPK6 mezi jádrem

a cytoplazmou není závislý na aktivaci (fosforylaci) této kinázy. Výsledky aplikace importazolu na rostliny *Arabidopsis* exprimující MPK6-GFP marker, ukázaly viditelně nižší přítomnost MPK6 v jádře, i když tyto výsledky bude potřeba dále ověřit.

## 11 Závěr

Výsledky této studie mohou napomoci odhalení mechanismů regulace subcelulární lokalizace MPK6. V souladu s předchozími poznatky bylo potvrzeno, že MPK6 je lokalizována převážně v jádře. Rovněž byla potvrzena důležitost jaderného transportu a vliv MAPK aktivace na transport MPK6 dovnitř a ven z jádra. Celkové objasnění subcelulárního pohybu MPK6 bude vyžadovat řadu genetických a chemických analýz, v kombinaci s moderními mikroskopickými technikami. Nadcházející výzkum si klade za cíl sledovat kinetiku jaderného transportu MPK6 za různých podmínek pomocí techniky založené na principu obnovení fluorescence po vybělení (tzv. Fluorescence recovery of photobleaching, FRAP). Mimo jiné bude nutné určit vazebné partnery MPK6, které se nějakým způsobem podílí na subcelulární lokalizaci MPK6.

## Seznam literatury

- Ahlfors R, Macioszek V, Rudd J, Brosché M, Schlichting R, Scheel D, Kangasjärvi J. (2004).** Stress hormone-independent activation and nuclear translocation of mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis thaliana* during ozone exposure. *Plant Journal* **40**: 512-522
- Ahmad P, Rasool S, Gul A, Sheikh SA, Akram NA, Ashraf M, Kazi AM, Guzel S. (2016).** Jasmonates: Multifunctional Roles in Stress Tolerance. *Frontiers in Plant Science* **7**: 813
- Ainsztein AM, Purich DL. (1994).** Stimulation of tubulin polymerization by MAP-2. Control by protein kinase C-mediated phosphorylation at specific sites in the microtubule-binding region. *Journal of Biological Chemistry* **269**: 28465-28471
- Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT, Saltiel AR. (1995).** PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *Journal of Biological Chemistry* **270**: 27489-27494
- Alessi DR, Gomez N, Moorhead G, Lewis T, Keyse SM, Cohen P. (1995).** Inactivation of p42 MAP kinase by protein phosphatase 2A and a protein tyrosine phosphatase, but not CL100, in various cell lines. *Current Biology* **5**: 283-295
- Allen RD, David GB, Nomarski G. (1969).** The zeiss-Nomarski differential interference equipment for transmitted-light microscopy. *Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie und mikroskopische Technik* **69**: 193-221
- Altamura MM, Biondi S, Colombo L, Guzzo F. (2007).** Elementi di biologia dello sviluppo delle piante. EdiSES Publishers, Napoli, Italy. ISBN: 9788879594035
- Anderson JC, Bartels S, González Besteiro MA, Shahollari B, Ulm R, Peck SC. (2011).** Arabidopsis MAP Kinase Phosphatase 1 (AtMKP1) negatively regulates MPK6-mediated PAMP responses and resistance against bacteria. *Plant Journal* **67**: 258-268
- Andreasson E, Ellis B. (2009).** Convergence and specificity in the Arabidopsis MAPK nexus. *Trends in Plant Science* **15**: 106-113
- Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu WL, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel FM, Sheen J. (2002).** MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature* **415**: 977-983
- Ayaydin F, Vissi E, Mészáros T, Miskolczi P, Kovács I, Fehér A, Dombrádi V, Erdödi F, Gergely P, Dudits D. (2000).** Inhibition of serine/threonine-specific protein phosphatases causes premature activation of cdc2MsF kinase at G2/M transition and early mitotic microtubule organisation in alfalfa. *Plant Journal* **23**: 85-96
- Banno H, Hirano K, Nakamura, T, Irie K, Nomoto S, Matsumoto K, Machida Y. (1993).** NPK1, a tobacco gene that encodes a protein with a domain homologous to yeast BCK1, STE11, and Byr2 protein kinases. *Molecular & Cellular Biology* **13**: 4745-4752
- Bayer M, Nawy T, Giglione C, Galli M, Meinel T, Lukowitz W. (2009).** Paternal control of embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Science* **323**: 1485-1488

- Beck M, Komis G, Müller J, Menzel D, Samaj J. (2010).** Arabidopsis homologs of nucleus and phragmoplast-localized kinase 2 and 3 and mitogen-activated protein kinase 4 are essential for microtubule organization. *Plant Cell* **22**: 755-771
- Beck M, Komis G, Ziemann A, Menzel D, Samaj J. (2011).** Mitogen-activated protein kinase 4 is involved in the regulation of mitotic and cytokinetic microtubule transitions in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **189**: 1069-1083
- Beevers L. (1982).** Post translational modifications. In: *Nucleic Acids and Proteins in Plants I*. Volume 14/A of the series *Encyclopedia of Plant Physiology* pp 136-168. ISBN: 978-3-642-68239-1
- Bergmann DC, Lukowitz W, Somerville CR. (2004).** Stomatal development and pattern controlled by a MAPKK kinase. *Science* **304**: 1494-1497
- Bush SM, Krysan PJ. (2007).** Mutational evidence that the *Arabidopsis* MAP kinase MPK6 is involved in anther, inflorescence, and embryo development. *Journal of Experimental Botany* **58**: 2181-2191
- Buschmann H, Dols J, Kopischke S, Peña EJ, Andrade-Navarro MA, Heinlein M, Szymanski DB, Zachgo S, Doonan JH, Lloyd CW. (2015).** *Arabidopsis* KCBP interacts with AIR9 but stays in the cortical division zone throughout mitosis via its MyTH4-FERM domain. *Journal of Cell Science* **128**: 2033-2046
- Buschmann H, Chan J, Sanchez-Pulido L, Andrade-Navarro MA, Doonan JH, Lloyd CW. (2006).** Microtubule-associated AIR9 recognizes the cortical division site at preprophase and cell-plate insertion. *Current Biology* **16**: 1938-1943
- Camilleri C, Azimzadeh J, Pastuglia M, Bellini C, Grandjean O, Bouchez D. (2002).** The *Arabidopsis* TONNEAU2 gene encodes a putative novel protein phosphatase 2A regulatory subunit essential for the control of the cortical cytoskeleton. *Plant Cell* **14**: 833-845
- Cederholm HM, Iyer-Pascuzzi AS, Benfey PN. (2012).** Patterning the primary root in *Arabidopsis*. *Wiley Interdisciplinary Reviews in Developmental Biology* **1**: 675-691
- Clowes FAL. (1959).** Apical meristems of rous. *Biological Reviews* **34**: 501–527
- Colasanti J, Cho SO, Wick S, Sundaresan (1993).** V. Localization of the Functional p34cdc2 Homolog of Maize in Root Tip and Stomatal Complex Cells: Association with Predicted Division Sites. *Plant Cell* **5**: 1101-1111
- Colcombet J, Hirt H. (2008).** *Arabidopsis* MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochemical Journal* **413**: 217-226
- Costes SV, Daelemans D, Cho EH, Dobbin Z, Pavlakis G, Lockett S. (2004).** Automatic and quantitative measurement of protein–protein colocalization in live cells. *Biophysical Journal* **86**: 3993-4003
- Craig EA, Stevens MV, Vaillancourt RR, Camenisch TD. (2008).** MAP3Ks as central regulators of cell fate during development. *Developmental Dynamics* **237**: 3102-3114
- Davidovits P, Egger MD. (1969).** "Scanning laser microscope". *Nature* **223**: 831

- Davidovits P, Egger MD. (1971).** "Scanning laser microscope for biological investigations". *Applied Optics* **10**: 1615-1619
- Davis RJ. (1999).** Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase. *Biochemical Society Symposia* **64**: 1-12
- Davis RJ. (1993).** The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Journal of Biological Chemistry* **268**: 14553–14556
- De Smet I, Beeckman T. (2011).** Asymmetric cell division in land plants and algae: the driving force for differentiation. *Nature Reviews of Molecular Cell Biology* **12**: 177-188
- de Zelicourt A, Colcombet J, Hirt H. (2016).** The Role of MAPK Modules and ABA during Abiotic Stress Signaling. *Trends in Plant Science* Aug;21(8):677-85
- DeLong A, Mockaitis K, Christensen S. (2002).** Protein phosphorylation in the delivery of and response to auxin signals. *Plant Molecular Biology* **49**: 285-303
- Dhonukshe P, Gadella TW Jr. (2003).** Alteration of microtubule dynamic instability during preprophase band formation revealed by yellow fluorescent protein-CLIP170 microtubule plus-end labeling. *Plant Cell* **15**: 597-611
- Doerner P. (1998).** Root development: quiescent center not so mute after all. *Current Biology* **8**: R42-44
- Evrard A, Kumar M, Lecourieux D, Lucks J, von Koskull-Döring P, Hirt H. (2013).** Regulation of the heat stress response in Arabidopsis by MPK6-targeted phosphorylation of the heat stress factor HsfA2. *Peer Journal* **1**: e59. doi: 10.7717/peerj.59
- Furuya T, Matsuoka D, Nanmori T. (2014).** Membrane rigidification functions upstream of the MEKK1-MKK2-MPK4 cascade during cold acclimation in Arabidopsis thaliana. *FEBS Letters* **588**: 2025-2030
- Gao M, Liu J, Bi D, Zhang Z, Cheng F, Chen S, Zhang Y. (2008).** MEKK1, MKK1/MKK2 and MPK4 function together in a mitogen-activated protein kinase cascade to regulate innate immunity in plants. *Cell Research* **18**: 1190-1198
- Gardner AM, Vaillancourt RR, Lange-Carter CA, Johnson GL. (1994).** MEK-1 phosphorylation by MEK kinase, Raf, and mitogen-activated protein kinase: analysis of phosphopeptides and regulation of activity. *Molecular Biology of the Cell* **5**: 193-201
- Gibbon BC, Kropf DL. (1993).** Intracellular pH and its regulation in *Pelvetia* zygotes. *Developmental Biology* **157**: 259-268
- Granger C, Cyr R. (2001).** Use of abnormal preprophase bands to decipher division plane determination. *J Cell Sci.* Feb;114(Pt 3):599-607
- Guan Y, Meng X, Khanna R, LaMontagne E, Liu Y, Zhang S. (2014).** Phosphorylation of a WRKY transcription factor by MAPKs is required for pollen development and function in Arabidopsis. *PLoS Genet.* May **15**;10(5):e1004384. doi: 10.1371/journal.pgen.1004384

- Gunning BES. (1982).** The cytokinetic apparatus: its development and spatial regulation. In *The Cytoskeleton in Plant Growth and Development*. Edited by Lloyd CW. London: Academic Press;229-292
- Hamel LP, Nicole MC, Duplessis S, Ellis BE. (2012).** Mitogen-activated protein kinase signaling in plant-interacting fungi: distinct messages from conserved messengers. *Plant Cell* **24**: 1327-1351
- Han S, Wang CW, Wang WL, Jiang J. (2014).** Mitogen-activated protein kinase 6 controls root growth in Arabidopsis by modulating Ca<sup>2+</sup>-based Na<sup>+</sup> flux in root cell under salt stress. *Journal of Plant Physiology* **171(5)**: 26-34
- Hasezawa S, Kumagai F. (2002).** Dynamic changes and the role of the cytoskeleton during the cell cycle in higher *Plant Cells*. *International Reviews of Cytology* **214**: 161-191
- Hashimoto-Sugimoto M, Negi J, Monda K, Higaki T, Isogai Y, Nakano T, Hasezawa S, Iba K. (2016).** Dominant and recessive mutations in the Raf-like kinase HT1 gene completely disrupt stomatal responses to CO<sub>2</sub> in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* **67**: 3251-3261
- He P, Shan L, Lin NC, Martin GB, Kemmerling B, Nürnberger T, Sheen J. (2006).** Specific bacterial suppressors of MAMP signaling upstream of MAPKKK in Arabidopsis innate immunity. *Cell* **125**: 563-75
- Heidstra R. (2007).** Asymmetric Cell Division in Plant Development. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*. Alvaro Macieira-Coelho, Editor, Asymmetric Cell Division. Series: Progress in Molecular and Subcellular Biology. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg. ISBN: 978-3-540-69160-0
- Hemsley R, McCutcheon S, Doonan J, Lloyd C. (2001).** P34(cdc2) kinase is associated with cortical microtubules from higher plant protoplasts. *FEBS Letters* **508**: 157-161
- Hettenhausen C, Schuman MC, Wu J. (2015).** MAPK signaling: a key element in plant defense response to insects. *Insect Sci. Apr;22(2):157-64*
- Higaki T, Kutsuna N, Sano T, Hasezawa S. (2008).** Quantitative analysis of changes in actin microfilament contribution to cell plate development in plant cytokinesis. *BMC Plant Biology* **8**: 80. doi: 10.1186/1471-2229-8-80
- Hirt H. (2000).** Connecting oxidative stress, auxin, and cell cycle regulation through a plant mitogen-activated protein kinase pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **97**: 2405-2407
- Hoshi M, Ohta K, Gotoh Y, Mori A, Murofushi H, Sakai H, Nishida E. (1992).** Mitogen-activated-protein-kinase-catalyzed phosphorylation of microtubule-associated proteins, microtubule-associated protein 2 and microtubule-associated protein 4, induces an alteration in their function. *European Journal of Biochemistry* **203**: 43-52
- Hronková M, Wiesnerová D, Šimková M, Skůpa P, Dewitte W, Vráblová M, Zažímalová E, Šantrůček J. (2015).** Light-induced STOMAGEN-mediated stomatal development in Arabidopsis leaves. *Journal of Experimental Botany* **66**: 4621-4630  
<http://www.kalesse.uni-hannover.de/621.html> schéma struktury ratjadonu



- <http://www.nanopharma.cz/cs/produkty/nanomatrix3d-v-insertech-a-well-plate/12-well-plate-with-inserts-detail> *dvanáctijamková kultivační destička*
- <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/mm/401105?lang=en&region=CZ> *schéma struktury importazolu*
- <http://www.stemcell.com/en/Products/All-Products/PD98059.aspx> *schéma struktury PD98059*
- Huang GT, Ma SL, Bai LP, Zhang L, Ma H, Jia P, Liu J, Zhong M, Guo ZF (2012).** Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants. *Molecular Biology Reporter* **39**: 969-987
- Huang Y, Li CY, Qi Y, Park S, Gibson SI. (2014).** SIS8, a putative mitogen-activated protein kinase kinase kinase, regulates sugar-resistant seedling development in Arabidopsis. *Plant Journal* **77**: 577-588
- Hurst SR, Kropf DL. (1991).** Ionic requirements for establishment of an embryonic axis in *Pelvetia* zygotes. *Planta* **185**: 27-33
- Hush J, Wu L, John PC, Hepler LH, Hepler PK. (1996).** Plant mitosis promoting factor disassembles the microtubule preprophase band and accelerates prophase progression in *Tradescantia*. *Cell Biology International* **20**: 275-287
- Hyams JS, Lloyd CW. (1994)** in: *Modern Cell Biology* (Harford, J.B., Ed.), Vol. 13, Wiley-Liss, New York
- Chen RE, Thorner J. (2007).** Function and regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1773**: 1311-1340
- Cheng L, Karin M. (2001).** Mammalian MAP kinase signaling cascades. *Nature* **410**: 37-40
- Choi JW, Lim J. (2016).** Control of Asymmetric Cell Divisions during Root Ground Tissue Maturation. *Molecules to Cells* **39**: 524-529
- Chong H, Vikis HG, Guan KL. (2003).** Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cell Signaling* **15**: 463-9
- Ichimura K., et al. (2002).** Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: A new nomenclature. *Trends in Plant Science* **7**: 301-308
- Ishikawa M, Soyano T, Nishihama R, Machida Y. (2002).** The NPK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase contains a functional nuclear localization signal at the binding site for the NACK1 kinesin-like protein. *Plant Journal* **32**: 789-798
- Jeong S, Volny M, Lukowitz W. (2012).** Axis formation in Arabidopsis - transcription factors tell their side of the story. *Current Opinion in Plant Biology* **15**: 4-9
- Jiménez C, Berl T, Rivard CJ, Edelstein CL, Capasso JM. (2004).** Phosphorylation of MAP kinase-like proteins mediate the response of the halotolerant alga *Dunaliella viridis* to hypertonic shock. *Biochimica et Biophysica Acta* **1644**: 61-69
- Jonak C, Okrész L, Bögre L, Hirt H. (2002).** Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling. *Current Opinion in Plant Biology* Oct;5(5):415-24. Review
- Ju C, Chang C. (2012).** Advances in ethylene signalling: protein complexes at the endoplasmic reticulum membrane. *AoB Plants* pls031. doi: 10.1093/aobpla/pls031

- Jürgens G, Mayer U. (1994).** Arabidopsis. In EMBRYOS. Colour Atlas of Development. (ed. J. B. L. Bard), pp. 7-21. London: Wolfe Publishing.
- Kalesse M, Christmann M, Bhatt U, Quitschalle M, Claus E, Saeed A, Burzlaff A, Kasper C, Haustedt LO, Hofer E, Scheper T, Beil W. (2001).** The chemistry and biology of ratjadone. *Chembiochem* **2(9)**: 709-714
- Keshet Y, Seger R. (2010).** The MAP kinase signaling cascades: A system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions. *Methods in Molecular Biology* **661**: 3-38
- Keyse SM. (2000).** Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. *Current Opinion in Cell Biology* **12**: 186-192
- Kieber JJ, Rothenberg M, Roman G, Feldmann KA, Ecker JR. (1993).** CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in Arabidopsis, encodes a member of the raf family of protein kinases. *Cell* **72**: 427-441
- Kieber JJ, Rothenberg M, Roman G, Feldmann KA, Ecker JR. (1993).** CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in Arabidopsis, encodes a member of the raf family of protein kinases. *Cell* **72**: 427-441
- Komis G, Apostolakos P, Gaitanaki C, Galatis B. (2004).** Hyperosmotically induced accumulation of a phosphorylated p38-like MAPK involved in protoplast volume regulation of plasmolyzed wheat root cells. *FEBS Letters* **573**: 168-174
- Komis G, Illés P, Beck M, Šamaj J. (2011).** Microtubules and mitogen-activated protein kinase signalling. *Current Opinion in Plant Biology* **14**: 650-657
- Komis G, Luptovciak I, Dorskocilova A, Samaj J. (2015).** Biotechnological aspects of cytoskeletal regulation in plants. *Biotechnology Advances* **33**: 1043-1062
- Kondoh K, Nishida E. (2007).** Regulation of MAP kinases by MAP kinase phosphatases. *Biochimica et Biophysica Acta* **1773**: 1227-1237
- Kong Q, Qu N, Gao M, Zhang Z, Ding X, Yang F, Li Y, Dong OX, 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*. May;24(5):2225-36
- Kreis T, Vale R. (1999).** Guidebook to the Cytoskeletal and Motor Proteins. Oxford University Press, Oxford
- Krupnova T, Sasabe M, Ghebreghiorghis L, Gruber CW, Hamada T, Dehmel V, Strompen G, Stierhof YD, Lukowitz W, Kemmerling B, Machida Y, Hashimoto T, Mayer U, Jürgens G. (2009).** Microtubule-associated kinase-like protein RUNKEL needed [corrected] for cell plate expansion in Arabidopsis cytokinesis. *Current Biology* **19**: 518-523
- Krysan PJ, Jester PJ, Gottwald JR, Sussman MR. (2002).** An Arabidopsis mitogen-activated protein kinase kinase kinase gene family encodes essential positive regulators of cytokinesis. *Plant Cell*. **14(5)**: 1109-1120
- Kyriakis JM, Avruch J. (2012).** Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update. *Physiological Reviews* **92**: 689-737

- Laibach F (1965).** 60 Jahre Arabidopsis-Forschung, 1905-1965. AIS Vol. 1 Supplement
- Lampard GR, Lukowitz W, Ellis BE, Bergmann DC. (2009).** Novel and expanded roles for MAPK signaling in Arabidopsis stomatal cell fate revealed by cell type-specific manipulations. *Plant Cell* **21**: 3506-3517
- Lampard GR, Wengier DL, Bergmann DC. (2014).** Manipulation of mitogen-activated protein kinase kinase signaling in the Arabidopsis stomatal lineage reveals motifs that contribute to protein localization and signaling specificity. *Plant Cell* **26(8)**: 3358-3371
- Lee JS, Hnilova M, Maes M, Lin YC, Putarjunan A, Han SK, Avila J, Torii KU. (2015).** Competitive binding of antagonistic peptides fine-tunes stomatal patterning. *Nature* **522**: 439-443
- Li Z, Yue H, Xing D. (2012).** MAP Kinase 6-mediated activation of vacuolar processing enzyme modulates heat shock-induced programmed cell death in Arabidopsis. *New Phytologist* **195**: 85-96
- Liang Y, Sheikh F. (2016).** Scaffold Proteins Regulating Extracellular Regulated Kinase Function in Cardiac Hypertrophy and Disease. *Frontiers in Pharmacology* **7**: 37. doi: 10.3389/fphar.2016.00037
- Lipka E, Herrmann A, Mueller S. (2015).** Mechanisms of *Plant Cell* division. *Wiley Interdisciplinary Reviews of Developmental Biology* **4**: 391-405
- Liu XM, Nguyen XC, Kim KE, Han HJ, Yoo J, Lee K, Kim MC, Yun DJ, Chung WS. (2013).** Phosphorylation of the zinc finger transcriptional regulator ZAT6 by MPK6 regulates Arabidopsis seed germination under salt and osmotic stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **430(3)**: 1054-1059
- López-Bucio JS, Dubrovsky JG, Raya-González J, Ugartechea-Chirino Y, López-Bucio J, de Luna-Valdez LA, Ramos-Vega M, León P, Guevara-García AA. (2014).** Arabidopsis thaliana mitogen-activated protein kinase 6 is involved in seed formation and modulation of primary and lateral root development. *Journal of Experimental Botany* **65**: 169-183
- Lucas JR, Nadeau JA, Sack FD. (2006).** Microtubule arrays and Arabidopsis stomatal development. *Journal of Experimental Botany* **57**: 71-79.
- Lukowitz W, Roeder A, Parmenter D, Somerville C. (2004).** A MAPKK kinase gene regulates extra-embryonic cell fate in Arabidopsis. *Cell* **116**: 109-119
- Manders EMM, Verbeek FJ, Aten JA. (1993).** Measurement of colocalization of objects in dual-color confocal images. *Journal of Microscopy* **169**: 375-382
- Meissner T, Krause E, Vinkemeier U. (2004).** Ratjadone and leptomycin B block CRM1-dependent nuclear export by identical mechanisms. *FEBS Letters* **576**: 27-30
- Meng X, Zhang S. (2013).** MAPK cascades in plant disease resistance signaling. *Annual Reviews in Phytopathology* **51**: 245-266
- Menges M, Dóczy R, Okrészl L, Morandini P, Mizzi L, Soloviev M, Murray JA, Bögre L. (2008).** Comprehensive gene expression atlas for the Arabidopsis MAP kinase signalling pathways. *New Phytologist* **179**: 643-662

- Mészáros T, Miskolczi P, Ayaydin F, Pettkó-Szandtner A, Peres A, Magyar Z, Horváth GV, Bakó L, Fehér A, Dudits D. (2000).** Multiple cyclin-dependent kinase complexes and phosphatases control G2/M progression in alfalfa cells. *Plant Molecular Biology* **43**: 595-605
- Mineyuki Y, Wick SM, Gunning BES. (1988).** Preprophase bands of microtubules and the cell cycle: kinetics and experimental uncoupling of their formation from the nuclear cycle in onion root-tip cells. *Planta* **174**: 518–526.
- Mishra NS, Tuteja R, Tuteja N. (2006).** Signaling through MAP kinase networks in plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **452**: 55-68
- Mittelstadt PR, Salvador JM, Fornace AJ Jr, Ashwell JD. (2005).** Activating p38 MAPK: new tricks for an old kinase. *Cell Cycle* **4**: 1189-1192
- Morrison DK. (2012).** MAP Kinase Pathways. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology **4**: a011254
- Moustafa K, AbuQamar S, Jarrar M, Al-Rajab AJ, Trémouillaux-Guiller J. (2014).** MAPK cascades and major abiotic stresses. *Plant Cell Reports* **33**: 1217-1225
- Müller J, Beck M, Mettbach U, Komis G, Hause G, Menzel D, Samaj J. (2010).** Arabidopsis MPK6 is involved in cell division plane control during early root development, and localizes to the preprophase band, phragmoplast, trans-Golgi network and plasma membrane. *Plant Journal* **61**: 234-248
- Müller S, Han S, Smith LG. (2006).** Two kinesins are involved in the spatial control of cytokinesis in Arabidopsis thaliana. *Current Biology* **16**: 888-894
- Musielak TJ, Bayer M. (2014).** YODA signalling in the early Arabidopsis embryo. *Biochemical Society Transactions* **42**: 408-412
- Murata T, Sano T, Sasabe M, Nonaka S, Higashiyama T, Hasezawa S, Machida Y, Hasebe M. (2013).** Mechanism of microtubule array expansion in the cytokinetic phragmoplast. *Nature Communications* **4**: 1967. doi: 10.1038/ncomms2967
- Nawkar GM, Maibam P, Park JH, Sahi VP, Lee SY, Kang CH (2013).** UV-Induced cell death in plants. *International Journal of Molecular Sciences* **14**: 1608-1628
- Nishimoto S, Nishida E. (2006).** MAPK signalling: ERK5 versus ERK1/2. *EMBO Reports* **7**: 782-786
- Nogami A, Mineyuki Y. (1999).** Loosening of a preprophase band of microtubules in onion (*Allium cepa* L.) root tip cells by kinase inhibitors. *Cell Structure & Function* **24**: 419-424
- Oades JM. (1978).** Mucilages at the root surface. *Journal of Soil Science* **29**: 1-16
- Panteris E, Adamakis ID, Tzioutziou NA. (2009).** Abundance of actin filaments in the preprophase band and mitotic spindle of brick1 Zea mays mutant. *Protoplasma* **236**: 103-106
- Panteris E. (2008).** Cortical actin filaments at the division site of mitotic *Plant Cells*: a reconsideration of the 'actin-depleted zone'. *New Phytologist* **179**: 334-341
- Paredez AR, Somerville CR, Ehrhardt DW. (2006).** Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules. *Science* **312**: 1491-1495
- Park HC, Song EH, Nguyen XC, Lee K, Kim KE, Kim HS, Lee SM, Kim SH, Bae DW, Yun DJ, Chung WS. (2011).** Arabidopsis MAP kinase phosphatase 1 is phosphorylated and activated by its substrate AtMPK6. *Plant Cell Reports* **30**: 1523-1531

- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. (2001).** Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine Reviews* **22**: 153-183
- Pecher P, Eschen-Lippold L, Herklotz S, Kuhle K, Naumann K, Bethke G, Uhrig J, Weyhe M, Scheel D, Lee J. (2014).** The Arabidopsis thaliana mitogen-activated protein kinases MPK3 and MPK6 target a subclass of 'VQ-motif'-containing proteins to regulate immune responses. *New Phytologist* **203**: 592-606
- Pérez-Salamó I, Papdi C, Rigó G, Zsigmond L, Vilela B, Lumbreras V, Nagy I, Horváth B, Domoki M, Darula Z, Medzihradzky K, Bögre L, Koncz C, Szabados L. (2014).** The heat shock factor A4A confers salt tolerance and is regulated by oxidative stress and the mitogen-activated protein kinases MPK3 and MPK6. *Plant Physiology* **165**: 319-334
- Perilli S, Di Mambro R, Sabatini S. (2012).** Growth and development of the root apical meristem. *Current Opinion in Plant Biology* **15**: 17-23
- Petráň M, Hadravský M, Egger MD, Galambos M (1968).** "Tandem-Scanning Reflected-Light Microscope". *Journal of the Optical Society of America* **58**: 661–664
- Petricka JJ, Van Norman JM, Benfey PN. (2009).** Symmetry breaking in plants: molecular mechanisms regulating asymmetric cell divisions in Arabidopsis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **1**: a000497
- Petricka JJ, Winter CM, Benfey PN. (2012).** Control of Arabidopsis root development. *Annual Reviews of Plant Biology* **63**: 563-590
- Pines J, Hunter T. (1990).** *p34cdc2: the S and M kinase?* *New Biology* **2**: 389-401
- Pitzschke A. (2015).** Modes of MAPK substrate recognition and control. *Trends in Plant Science* **20**: 49-55
- Prabakaran S, Lippens G, Steen H, Gunawardena J. (2012).** Post-translational modification: nature's escape from genetic imprisonment and the basis for dynamic information encoding. *Wiley Interdisciplinary Reviews in Systems Biology and Medicine* **4(6)**: 565-583
- Pulido R, Zuniga A, Ullrich A. (1998).** PTP-SL and STEP protein tyrosine phosphatases regulate the activation of the extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 by association through a kinase interaction motif. *EMBO Journal* **17**: 7337–7350
- Qi M, Elion EA. (2005).** MAP kinase pathways. *Journal of Cell Science* **118**: 3569–3572
- Quettier AL, Bertrand C, Habricot Y, Miginiac E, Agnes C, Jeannette E, Maldiney R. (2006).** The phs1-3 mutation in a putative dual-specificity protein tyrosine phosphatase gene provokes hypersensitive responses to abscisic acid in Arabidopsis thaliana. *Plant Journal* **47**: 71171-9
- Raman M, Chen W, Cobb MH. (2007).** Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* **26**: 3100–3112
- Rasmussen CG, Humphries JA, Smith LG. (2011).** Determination of symmetric and asymmetric division planes in plant cells. *Annual Reviews in Plant Biology* **62**: 387-409

- Ray LB, Sturgill TW. (1988).** Insulin-stimulated microtubule-associated protein kinase is phosphorylated on tyrosine and threonine in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **85**: 3753–3757
- Robert HS, Crhak Khaitova L, Mroue S, Benková E. (2015).** The importance of localized auxin production for morphogenesis of reproductive organs and embryos in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* **66**: 5029-5042
- Rodriguez MC, Petersen M, Mundy J. (2010).** Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annual Reviews in Plant Biology* **61**: 621-649
- Ron D, Chen CH, Caldwell J, Jamieson L, Orr E, Mochly-Rosen D. (1994).** Cloning of an intracellular receptor for protein kinase C: a homolog of the b subunit of G proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **91**: 839-843
- Roskoski R Jr. (2012).** MEK1/2 dual-specificity protein kinases: structure and regulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **417**: 5-10
- Rost TL. (2011).** The organization of roots of dicotyledonous plants and the positions of control points. *Annals of Botany* **107**: 1213-1222
- Samaj J, Ovecka M, Hlavacka A, Lecourieux F, Meskiene I, Lichtscheidl I, Lenart P, Salaj J, Volkmann D, Bögre L, Baluska F, Hirt H. (2002).** Involvement of the mitogen-activated protein kinase SIMK in regulation of root hair tip growth. *EMBO Journal* **21**: 3296-306
- Sasabe M, Boudolf V, De Veylder L, Inzé D, Genschik P, Machida Y. (2011).** Phosphorylation of a mitotic kinesin-like protein and a MAPKKK by cyclin-dependent kinases (CDKs) is involved in the transition to cytokinesis in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **108**:17844-17849
- Sasabe M, Machida Y. (2012).** Regulation of organization and function of microtubules by the mitogen-activated protein kinase cascade during plant cytokinesis. *Cytoskeleton* **69**: 913-918
- Sauer M, Paciorek T, Benková E, Friml J. (2006).** Immunocytochemical techniques for whole-mount in situ protein localization in plants. *Nature Protocols* **1**: 98-103
- Saxena M, Williams S, Brockdorff J, Gilman J, Mustelin T. (1999).** Inhibition of T cell signalling by mitogen-activated protein kinase targeted hematopoietic tyrosine phosphate (HePTP). *Journal of Biological Chemistry* **274**: 11693-11700
- Sethi V, Raghuram B, Sinha AK, Chattopadhyay S. (2014).** A mitogen-activated protein kinase cascade module, MKK3-MPK6 and MYC2, is involved in blue light-mediated seedling development in Arabidopsis. *Plant Cell*. Aug;**26(8)**:3343-57
- Shao W, Dong J. (2016).** Polarity in plant asymmetric cell division: Division orientation and cell fate differentiation. *Developmental Biology* In Press
- Sidonskaya E, Schweighofer A, Shubchynskyy V, Kammerhofer N, Hofmann J, Wieczorek K, Meskiene I. (2016).** Plant resistance against the parasitic nematode *Heterodera schachtii* is

mediated by MPK3 and MPK6 kinases, which are controlled by the MAPK phosphatase AP2C1 in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* **67**: 107-118

**Singh P, Mohanta TK, Sinha AK. (2015).** Unraveling the intricate nexus of molecular mechanisms governing rice root development: OsMPK3/6 and auxin-cytokinin interplay. *PLoS One* **10(4)**: e0123620. doi: 10.1371/journal.pone.0123620

**Sinha AK, Jaggi M, Raghuram B, Tuteja N. (2011).** Mitogen-activated protein kinase signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signaling and Behavior* **6**: 196-203

**Smékalová V, Doskočilová A, Komis G, Šamaj J. (2014a).** Crosstalk between secondary messengers, hormones and MAPK modules during abiotic stress signalling in plants. *Biotechnology Advances* **32**: 2-11

**Smékalová V, Luptovčiak I, Komis G, Šamajová O, Ovečka M, Doskočilová A, Takáč T, Vadovič P, Novák O, Pechan T, Ziemann A, Košútová P, Šamaj J. (2014b).** Involvement of YODA and mitogen activated protein kinase 6 in Arabidopsis post-embryonic root development through auxin up-regulation and cell division plane orientation. *New Phytologist* **203**: 1175-1193

**Smertenko AP, Chang HY, Sonobe S, Fenyk SI, Weingartner M, Bögre L, Hussey PJ. (2006).** Control of the AtMAP65-1 interaction with microtubules through the cell cycle. *Journal of Cell Science* **119**: 3227-3237

**Smith LG. (2001).** Plant cell division: building walls in the right places. *Nature Reviews in Molecular Cell Biology* **2**: 33-39

**Soderholm JF, Bird SL, Kalab P, Sampathkumar Y, Hasegawa K, Uehara-Bingen M, Weis K, Heald R. (2011).** Importazole, a small molecule inhibitor of the transport receptor importin- $\beta$ . *ACS Chemical Biology* **6**: 700-708

**Sonobe S, Nakayama N, Shimmen T, Sone Y. (2000).** Intracellular distribution of subcellular organelles revealed by antibody against xyloglucan during cell cycle in tobacco BY-2 cells. *Protoplasma* **213**: 218-227

**Sozzani R, Iyer-Pascuzzi A. (2014).** Postembryonic control of root meristem growth and development. *Current Opinion in Plant Biology* **17**: 7-12

**Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T. (2001).** Stem cells find their niche. *Nature* **414**: 98-104

**Stahl Y, Simon R. (2005).** Plant stem cell niches. *International Journal of Developmental Biology* **49**: 479-489

**Su J, Xu J, Zhang S. (2015).** RACK1, scaffolding a heterotrimeric G protein and a MAPK cascade. *Trends in Plant Science* **20**: 405-407

**Šamajová O, Komis G, Šamaj J. (2013).** Emerging topics in the cell biology of mitogen-activated protein kinases. *Trends in Plant Science* **18**: 140-148

**Takeuchi M, Karahara I, Kajimura N, Takaoka A, Murata K, Misaki K, Yonemura S, Staehelin LA, Mineyuki Y. (2016).** Single microfilaments mediate the early steps of microtubule bundling during preprophase band formation in onion cotyledon epidermal cells. *Molecular Biology of the Cell* **27**: 1809-1820

- Tang Q, Guittard-Crilat E, Maldiney R, Habricot Y, Miginiac E, Bouly JP, Lebreton S. (2016).** The mitogen-activated protein kinase phosphatase PHS1 regulates flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **243**: 909-923
- Tanoue T, Adachi M, Moriguchi T, Nishida E. (2000).** A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nature Cell Biology* **2**: 110–116.
- ten Hove CA, Lu KJ, Weijers D. (2015).** Building a plant: cell fate specification in the early *Arabidopsis* embryo. *Development* **142**: 420-430
- Tena G, Asai T, Chiu W-L, Sheen J. (2001).** Plant mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Current Opinion in Plant Biology* **4**: 392–400.
- Turrà D, Segorbe D, Di Pietro A. (2014).** Protein kinases in plant-pathogenic fungi: conserved regulators of infection. *Annual Reviews in Phytopathology* **52**: 267-288
- Ueda M, Laux T. (2012).** The origin of the plant body axis. *Curr Opin Plant Biol.* Dec;**15(6)**:578-84
- Ulm R, Revenkova E, di Sansebastiano GP, Bechtold N, Paszkowski J. (2001).** Mitogen-activated protein kinase phosphatase is required for genotoxic stress relief in *Arabidopsis*. *Genes & Development* **15**: 699-709
- Umbrasaitė J, Schweighofer A, Kazanavičiūtė V, Magyar Z, Ayatollahi Z, Unterwurzacher V, Choopayak C, Boniecka J, Murray JA, Bogre L, Meskiene I. (2010).** MAPK phosphatase AP2C3 induces ectopic proliferation of epidermal cells leading to stomata development in *Arabidopsis*. *PLoS One* **5(12)**: e15357. doi: 10.1371/journal.pone.0015357
- 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(7)**: e0133975. doi: 10.1371/journal.pone.0133975
- Wachsman G, Sparks EE, Benfey PN. (2015).** Genes and networks regulating root anatomy and architecture. *New Phytologist* **208**: 26-38
- Wainstein E, Seger R. (2016).** The dynamic subcellular localization of ERK: mechanisms of translocation and role in various organelles. *Curr Opin Cell Biol.* Apr;**39**:15-20
- Walker KL, Müller S, Moss D, Ehrhardt DW, Smith LG. (2007).** *Arabidopsis* TANGLED identifies the division plane throughout mitosis and cytokinesis. *Current Biology* **17**: 1827-1836
- Wang H, Ngwenyama N, Liu Y, Walker JC, Zhang S. (2007).** Stomatal development and patterning are regulated by environmentally responsive mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**: 63-73
- Wankhede DP, Kumar K, Singh P, Sinha AK (2013).** Involvement of mitogen activated protein kinase kinase 6 in UV induced transcripts accumulation of genes in phytoalexin biosynthesis in rice. *Rice* **6**: 35. doi: 10.1186/1939-8433-6-35



- Wasteneys GO. (2002).** Microtubule organization in the green kingdom: chaos or self-order? *Journal of Cell Science* **115**: 1345-1354
- Watanabe Y, Meents MJ, McDonnell LM, Barkwill S, Sampathkumar A, Cartwright HN, Demura T, Ehrhardt DW, Samuels AL, Mansfield SD. (2015).** Visualization of cellulose synthases in Arabidopsis secondary cell walls. *Science* **350**: 198-203
- Weingartner M, Binarova P, Drykova D, Schweighofer A, David JP, Heberle-Bors E, Doonan J, Bögre L. (2001).** Dynamic recruitment of Cdc2 to specific microtubule structures during mitosis. *Plant Cell* **13**: 1929-1943
- Wendrich JR, Weijers D. (2013).** The Arabidopsis embryo as a miniature morphogenesis model. *New Phytologist* **199**: 14-25
- Whaley WG, Mollenhauer HH. (1993). *J. Cell Biol.* 17, 216-221
- Worden N, Wilkop TE, Esteve VE, Jeannotte R, Lathe R, Vernhettes S, Weimer B, Hicks G, Alonso J, Labavitch J, Persson S, Ehrhardt D, Drakakaki G. (2015).** CESA TRAFFICKING INHIBITOR inhibits cellulose deposition and interferes with the trafficking of cellulose synthase complexes and their associated proteins KORRIGAN1 and POM2/CELLULOSE SYNTHASE INTERACTIVE PROTEIN1. *Plant Physiology* **167**: 381-393
- Wright AJ, Smith LG. 2007.** DIVISION PLANE ORIENTATION IN *PLANT CELLS*. In: Verma DPS and Hong Z, Editors, Cell Division Control in Plants. Series: *Plant Cell Monographs*. Vol. 9. Springer Berlin, Heidelberg. ISBN: 978-3-540-73487-1
- Wu J, Michel H, Dent P, Haystead T, Hunt DF, Sturgill TW. (1993).** Activation of MAP kinase by a dual specificity Tyr/Thr kinase. *Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Research* **28**: 219-225
- Xu J, Li Y, Wang Y, Liu H, Lei L, Yang H, Liu G, Ren D. (2008a).** Activation of MAPK kinase 9 induces ethylene and camalexin biosynthesis and enhances sensitivity to salt stress in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry* **283**: 26996-27006
- Xu XM, Zhao Q, Rodrigo-Peiris T, Brkljacic J, He CS, Müller S, Meier I. (2008b).** RanGAP1 is a continuous marker of the Arabidopsis cell division plane. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **105**: 18637-18642
- Yarmola EG, Bubb MR. (2009).** How depolymerization can promote polymerization: the case of actin and profilin. *Bioessays* **31**: 1150-1160
- Yi SY, Min SR, Kwon SY. (2015).** NPR1 is Instrumental in Priming for the Enhanced flg22-induced MPK3 and MPK6 Activation. *Plant Pathology Journal* **31**: 192-194
- Zehorai E, Yao Z, Plotnikov A, Seger R. (2010).** The subcellular localization of MEK and ERK--a novel nuclear translocation signal (NTS) paves a way to the nucleus. *Molecular and Cellular Endocrinology* **314**: 213-220
- Zhang T, Liu Y, Yang T, Zhang L, Xu S, Xue L, An L. (2006).** Diverse signals converge at MAPK cascades in plant. *Plant Physiology and Biochemistry* **44**: 274-283

**Zhao C, Nie H, Shen Q, Zhang S, Lukowitz W, Tang D. (2014).** EDR1 physically interacts with MKK4/MKK5 and negatively regulates a MAP kinase cascade to modulate plant innate immunity. *PLoS Genetics* **10**: e1004389. doi: 10.1371/journal.pgen.1004389

## Seznam zkratk

AIR 9	(z angl. Auxin-induced in root cultures 9)
ANP	MAP3 kináza (z angl. Arabidopsis homologues of nucleus and phragmoplast associated kinase)
BSA	hovězí sérový albumin (z angl. Bovine serum albumine)
CC	střední válec (z angl. Central cylinder)
CDK	cyklin dependentní kinázy
CTR 1	MAP3 kináza (z angl. Constitutive triple response 1)
CTR1	MAP3 kináza (z angl. Constitutive triple response)
DAPI	4, 6-diamin-2-fenylindol
dH <sub>2</sub> O	destilovaná voda
DIC	mikroskopie s diferenčním interferenčním kontrastem (z angl. Differential interference contrast)
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTT	dithiotreitol
EDR1	MAP3 kináza (z angl. Enhanced disease resistance 1)
ERK	MAP3 kináza (z angl. Extracellular signal-regulated kinase)
FM4-64	N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(diethylamino)fenyl)hexytrienyl) pyridinium dibromid
GFP	zelený fluorescenční protein (z angl. Green fluorescent protein)
GRD	transkripční faktor (z angl. Grounded)
HePTP	tyrosinová fosfatáza (z angl. Hematopoietic protein tyrosine phosphatase)
HRP	křenová peroxidáza (z angl. Horseradish peroxidase)
HT1	(z angl. High leaf temperature 1)

IgG	imunoglobuliny třídy G
IRAK	kinázy asociované s membránou mitochondrií (z angl. Interleukin-1 receptor-associated kinase)
JNK	kináza (z angl. cJun N-terminální protein kináza)
LRC	boční kořenová čepička (z angl. Lateral root cap)
MAPK, MPK	mitogenem aktivovaná protein kináza
MAPKK, MAP2K	mitogenem aktivovaná protein kináza kináza kináza
MAPKKK, MAP3K	mitogenem aktivovaná protein kináza kináza kináza
MEK1, 2	MAP2 kináza
MEKK1	mitogenem aktivovaná protein kináza kináza kináza 1
MKK1/2	mitogenem aktivovaná protein kináza kináza 1/2
MKP1	fosfatáza s duální specificitou (z angl. Mitogen activated protein kinase phosphatase 1)
MPK4	mitogenem aktivovaná protein kináza 4
MTSB	pufr stabilizující mikrotubuly (z angl. Microtubules stabilizing buffer)
Na[BH <sub>4</sub> ]	tetrahydridoboritan sodný
NES	jaderný exportní signál (z angl. Nuclear export signal)
NPK1	MAP3 kináza (z angl. Nucleus and Phragmoplast associated protein Kinase 1)
p38 / Hog1p	kináza (z angl. Hyperosmotic glycerol 1p)
PBS	fosfátový pufr (z angl. Phosphate buffered saline)
PFA	paraformaldehyd
PHS1	fosfatáza s duální specificitou (z angl. Propyzamide hypersensitive 1)
PIPES	piperazin-N, N'-bis(2-etansulfonová kyselina)
POK1/2	(z angl. Phragmoplast orienting kinesin 1 a 2)
PP2A	serin/treonin proteinová fosfatáza 2A

PP2C	serin/treonin proteinová proteinová fosfatáza 2C
PTP-SL	tyrosinová fosfatáza
PVDF	polyvinylidifluorid
RACK1	(z angl. Receptor for activated C-kinase 1)
Raf43	MAP3 kináza Raf43
RAM	apikální meristém kořene (z angl. Root apical meristem)
RC	kořenová čepička (z angl. Root cap)
SIS8	MAP3 kináza (z angl. Sugar insensitive 8)
SSP	membránový kinázový receptor (z angl. Short suspensor)
STEP	tyrosinová fosfatáza (z angl. Striatal-enriched protein-tyrosine phosphatase)
TANGLED	(z angl.
TBST	pufr (z angl. Tris buffered saline . Tween)
TEMED	N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin
WT	wild type
YODA	MAP3 kináza YODA
$\Delta$ Nyda	mutant YODA