

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Vyhodnocení a validace proteomické analýzy mutantů**

*Arabidopsis mpk4 a mpk6*

## **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Bc. Petra Kavalcová</b>
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Ing. Tomáš Takáč Ph.D.</b>
Rok:	: 2016

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

V Olomouci dne 22. 4. 2016

Chtěla bych poděkovat vedoucímu mé práce Ing. Tomášovi Takáčovi Ph.D. za odborné rady, věcné připomínky, trpělivost a ochotu při zpracování této diplomové práce. Práce byla podpořena granty IGA (projekty č. IGA\_PrF\_2015\_015 a IGA\_PrF\_2016\_012) ze studentské grantové soutěže na Univerzitě Palackého v Olomouci.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Petra Kavalcová
Název práce	Vyhodnocení a validace proteomické analýzy mutantů <i>Arabidopsis mpk4</i> a <i>mpk6</i>
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, Oddělení buněčné biologie
Vedoucí práce	Ing. Tomáš Takáč Ph.D.
Rok obhajoby práce	2016

### Abstrakt

Mitogenem aktivované protein kinasy (MAPKs) jsou proteiny účastníci se přenosu extracelulárního signálu v *Arabidopsis thaliana*. MPK4 a MPK6 hrají důležitou roli v odpovědích na různé stresové podněty a ve vývojových procesech. Mnoho studií ukazuje přímou funkční spojitost MAPKs a cytoskeletu. Mutanti *Arabidopsis mpk4* a *mpk6* vykazují vývojové defekty, kterých molekulární podstata není přesně známa. Předkládaná diplomová práce má za cíl využít proteomickou analýzu mutantů *mpk4* a *mpk6* pro jejich bližší charakterizaci po molekulární stránce. Proteomickou analýzou jsme chtěli identifikovat možné proteiny, které se podílí na fenotypu mutantů. Zpracováním proteomických dat a jejich následnou validací pomocí imunoblotování, PHOSTAG technologie, detekcí specifické aktivity vybraných antioxidantních enzymů a sledováním kořenového fenotypu u obou mutantů po vlivu auxinu (auxinolu), jsme zjistili poškození aktinového cytoskeletu u obou mutantů a možnou regulaci MPK4 a MPK6 pomocí aktinového cytoskeletu. Zjistili jsme také rozdíly v abundanci antioxidantních enzymů mezi oběma mutanty a rozdílnou senzitivitu vůči exogenní aplikaci auxinu a auxinolu. Je možné konstatovat, že kombinace proteomické analýzy s biochemickými a fenotypovými analýzami nám pomohla detekovat možné nové funkce MPK4 a MPK6.

Klíčová slova	MPK4, MPK6, mutanti, proteomika, bioinformatika, cytoskelet, antioxidační enzymy, auxin
Počet stran	80
Počet příloh	1
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname Bc. Petra Kavalcová

Title Evaluation and validation of proteomic analysis of *Arabidopsis* mutants *mpk4* and *mpk6*

Type of thesis Diploma

Department Centre of the region Hana for biotechnological and agricultural research, Department of cell biology

Supervisor Ing. Tomáš Takáč Ph.D.

The year of presentation 2016

### Abstract

Mitogen-activated protein kinases are proteins involved in the transmission of extracellular signals in *Arabidopsis thaliana*. MPK4 and MPK6 play an important role in responses to various stress stimuli and developmental processes. Many studies show a direct functional connection between MAPKs and cytoskeleton. *Arabidopsis mpk4* and *mpk6* mutants exhibit numerous developmental and physiological defects. Molecular regulation determining these defects are not exactly known. The present diploma thesis exploit differential proteomic analysis of *mpk4* and *mpk6* mutants for their better molecular characterization. We used shot-gun proteomic analysis to identify possible proteins that contribute to the phenotype and stress responses of the mutants. The differential proteomes of the mutants roots were evaluated by bioinformatic analysis and the proteins involved in development and antioxidant defence were validated using immunoblotting, specific activity staining on native PAGE gels as well as physiological examination of mutants response to auxin. Based on these data we found novel information about *mpk4* and *mpk6* mutants such as possible disturbances of actin cytoskeleton and auxin response as well as different regulation of antioxidant defense.

Keywords MPK4, MPK6, mutants, proteomics, bioinformatics,

cytoskeleton, antioxidant enzymes, auxin

Number of pages 80

Number of appendices 1

Language Czech

## OBSAH

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	11
<b>2</b>	<b>Současný stav řešené problematiky</b> .....	12
2.1	Mitogenem aktivované protein kinasy (MAPKs) .....	12
2.1.1	Mitogenem aktivovaná protein kinasa 4 (MPK4).....	13
2.1.2	Mitogenem aktivovaná protein kinasa 6 (MPK6).....	14
2.2	Rostlinný cytoskelet .....	15
2.3	Aktin 2.....	16
2.4	Proteiny vážící se na cytoskelet.....	17
2.4.1	Proteiny vážící se na aktin.....	17
2.4.2	Proteiny vážící se na mikrotubuly (MAP) .....	18
2.5	Interakce mezi MAPKs a cytoskeletem .....	20
2.5.1	MAPKs a aktinový cytoskelet.....	20
2.5.2	MAPKs a mikrotubuly .....	20
2.6	Auxin a jeho vliv na vývoj rostlin .....	21
2.7	Proteomické přístupy k analýze MAP kinasové signální dráhy.....	22
2.7.1	Výhody „shot-gun“ proteomického přístupu .....	23
<b>3</b>	<b>Materiál a metody</b> .....	24
3.1	Biologický materiál .....	24
3.2	Chemikálie.....	24
3.3	Přístroje .....	26
3.4	Metody.....	26
3.4.1	Příprava rostlinného materiálu .....	26
3.4.2	Extrakce proteinů pro proteomickou analýzu <i>mpk4</i> a <i>mpk6</i> <i>mutanta</i> .....	27
3.4.3	Měření obsahu proteinů.....	28
3.4.4	Extrakce proteinů pro Phostag analýzu a imunoblotování.....	29



3.4.5	Denaturující polykrylamidová elektroforéza, Phostag analýza a imunoblotování .....	29
3.4.6	Příprava rostlinného materiálu na ošetření IAA a auxinolem.....	30
3.4.7	Stanovení aktivity vybraných antioxidačních enzymů v <i>mpk4</i> a <i>mpk6</i> mutantech .....	31
3.4.8	Bioinformatické vyhodnocení proteomických dat .....	32
<b>4</b>	<b>Výsledky</b> .....	<b>34</b>
4.1	Přehled výsledků proteomické analýzy .....	34
4.2	Funkční klasifikace proteinů se změněnou abundancí v <i>mpk4</i> a <i>mpk6</i> mutantu pomocí Gene ontology anotace .....	34
4.2.1	Proteiny spojené s vývojovými procesy.....	37
4.2.2	Proteiny odpovědi na externí stimuly .....	39
4.3	Predikce proteinů fosforylovaných MPK4 a MPK6 .....	39
4.4	Validace proteomických dat .....	45
4.4.1	Cytoskeletální proteiny .....	45
4.4.2	Analýza fosforylované MPK4 a MPK6 v <i>der1-3</i> mutantu .....	49
4.4.3	Validace abundance antioxidačních enzymů .....	51
4.4.4	Odpověď <i>mpk4</i> a <i>mpk6</i> mutantů na působení auxinu a auxinolu .....	54
4.4.5	Vliv auxinu a auxinolu na <i>mpk4</i> mutantu.....	54
4.4.6	Vliv auxinu a auxinolu na <i>mpk6</i> mutantu.....	55
<b>5</b>	<b>Diskuze</b> .....	<b>57</b>
<b>6</b>	<b>Závěr</b> .....	<b>60</b>
<b>7</b>	<b>Seznam použité literatury</b> .....	<b>61</b>
<b>8</b>	<b>Seznam použitých zkratk</b> .....	<b>69</b>
<b>9</b>	<b>Přílohy</b> .....	<b>71</b>

## **CÍLE PRÁCE**

### **Teoretická část**

Zpracování literární rešerše:

MAP kinasová signalizace

Rostlinný cytoskelet

Interakce mezi MAP kinasami a cytoskeletem

### **Praktická část**

Vyhodnocení proteomických dat s využitím proteomických metod

Validace proteomických dat pomocí biochemických metod a fenotypové analýzy *mpk4* a *mpk6* mutantů *Arabidopsis*

# 1 ÚVOD

Mitogenem aktivované protein kinasy (MAPKs) jsou serin/threonin kinasy, které hrají klíčovou roli v přenosu extracelulárního signálu v *Arabidopsis thaliana*. Tato signální dráha je složena z MAPK kinas kinas, MAPK kinas a MAP kinas (MAPKs), které jsou v postupném sledu pomocí fosforylace aktivovány. Mezi nejvíce prozkoumané MAPK u *Arabidopsis* patří MPK4 a MPK6. MPK4 hraje důležitou roli v odpovědích na různé stresové podmínky (Smékalová et al., 2014), a je zahrnuta v procesech buněčného dělení (Beck et al., 2011). MPK6 je aktivována zejména působením chladu (Ichimura et al., 2000) a reaktivních forem kyslíku (Lumbreras et al., 2010). Mutant *mpk4* vykazuje defekty při mitóze a buněčném dělení, kdy dochází k narušení dělicího vřeténka a vzniku dvou až mnohjaderných buněk (Beck et al., 2011). Mutant *mpk6* vykazuje neuspořádané soubory buněk v kořenech a lokalizaci MPK6 na fragmoplastu a v preprofázním svazku (Müller et al., 2010).

Proteomika je metoda sloužící k identifikaci a kvantifikaci proteinů ve vzorku. Při použití rostlin mutantních v MAPKs má proteomika velký potenciál k charakterizaci nových procesů, které MAPKs regulují. Pomocí tohoto přístupu je také možné detekovat proteiny podílející se na fenotypových, fyziologických a metabolických vlastnostech mutantu.

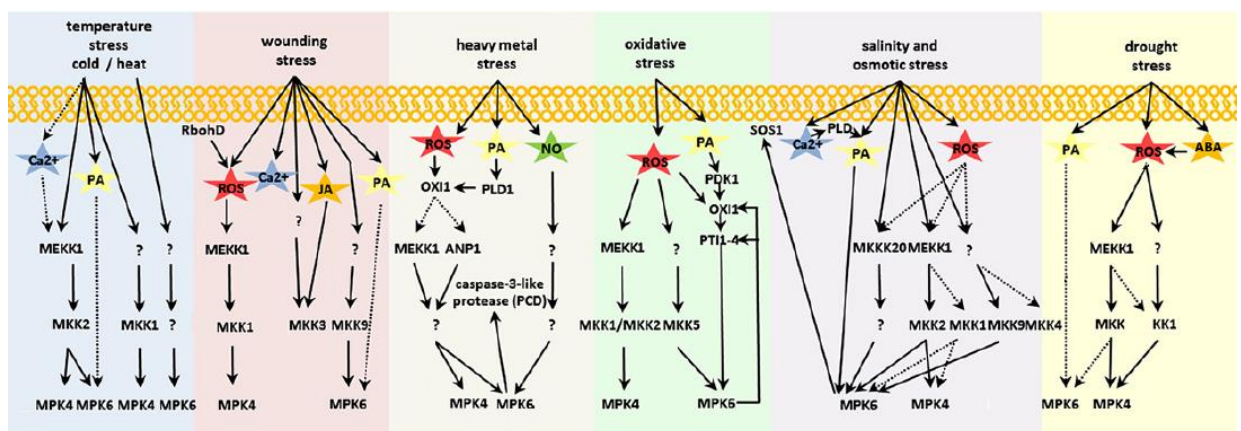
V této diplomové práci využijeme proteomickou analýzu k charakterizaci mutantů *mpk4* a *mpk6*. Budeme klást důraz na proteiny důležité pro vývojové procesy a při odpovědi na oxidativní stres. Proteomická data ověřujeme nezávislými biochemickými a fenotypovými analýzami.

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Mitogenem aktivované protein kinasy (MAPKs)

MAPKs jsou proteiny, přenášející signál pomocí fosforylace v eukaryotických buňkách. Signální dráha MAPKs je složena z 3 hlavních součástí zahrnujících MAPK kinasu kinasu (MAPKKK), která fosforyluje MAPK kinasu (MAPKK) na zbytcích aminokyselin serinu a threoninu. Výsledkem této fosforylace je aktivace MAPK na threoninu a tyrosinu (Jonak et al., 2002). MAPKs jsou zodpovědné za odpověď buněk na biotický a abiotický stres (Obr. 1), mají také úlohu v buněčném dělení, diferenciaci buněk a v jiných vývojových procesech. Cílovými proteiny, které MAPKs fosforylují jsou především transkripční faktory (Sheikh et al., 2016). Jsou ale také experimentální údaje o fosforylaci cytoskeletálních proteinů (Beck et al., 2011), anebo enzymu syntézy ethylenu (Liu et al., 2004).

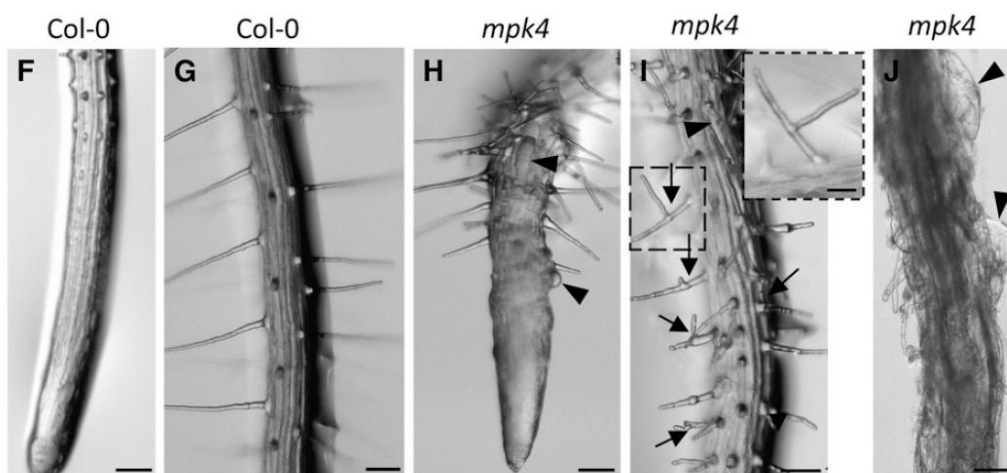
V genomu *Arabidopsis thaliana* bylo identifikováno 20 MAPKs, 10 MAPK kinas a 60 MAPK kinas kinas (Ichimura et al., 2002). Signální dráhy MAP kinas jsou úzce propojeny se signálními molekulami tzv. druhými posli (např. kyselina fosfatidová nebo kyslíkové radikály) (Lee et al., 2001). MAPKs také zprostředkovávají přenos signálu v odpovědi na růstové hormony jako je auxin (Lee et al., 2009), kyselina abscisová (Brock et al., 2010) a kyselina jasmonová (Howe, 2004). Nejvíce studovanými MAPKs jsou u rostlin kromě MPK3 také MPK4 a MPK6, kterými se budeme v teoretické části diplomové práce podrobněji zabývat.



Obr. 1 Schématické znázornění signálních drah MPK4 a MPK6 po působení abiotického stresu (Smékalová et al. 2014).

### 2.1.1 Mitogenem aktivovaná protein kinasa 4 (MPK4)

MPK4 je zahrnuta v signálních kaskádách při odpovědi na biotický a abiotický stres, jako např. působení vysokých a nízkých teplot (Ichimura et al., 2000), působení těžkých kovů (Liu et al., 2010), oxidační (Rentel et al., 2004) a osmotický stres (Teige et al., 2004) a působení bakterie *Pseudomonas syringae* (Suarez-Rodriguez et al., 2007). MPK4 je aktivována MAPKK již po 2 minutovém vystavení nízké teplotě v *Arabidopsis*. Byla také prokázána přímá interakce mezi MEKK1 (MAPKKK) a MPK4, kdy MPK4 interaguje s N-terminální regulační doménou MAPKKK (Ichimura et al., 1998). K aktivaci MPK4 může také dojít působením kyslíkových radikálů, které vznikají jako produkty aerobního metabolismu. Kyslíkové radikály aktivují MEKK1 (MAPKKK), která aktivuje MKK1/MKK2 (MAPKK) a následně dochází k aktivaci MPK4 (Pitzschke et al., 2009). V případě solného stresu je aktivátorem MPK4 MKK2 (MAPKK; Teige et al., 2004) (Obr. 1). Dále je MPK4 nezbytná pro procesy buněčného dělení (Beck et al., 2011), fotosyntézy (Gawroński et al., 2014) a pro organizaci kortikálních a mitotických mikrotubulů (Beck et al., 2010, 2011). Organizace mikrotubulů je regulována pomocí proteinů asociovaných s mikrotubuly (Hamada, 2007). Jedním z těchto proteinů je MAP65-1, který je fosforylován MPK4. Díky této fosforylaci dochází ke změnám v dynamice mikrotubulů (Komis et al., 2011). Mutace v MPK4 proteinu způsobují zpomalení vývoje a proto rostliny vykazují menší vzrůst (Su et al., 2007). Mezi další fenotypové znaky *mpk4* mutantů patří radiální růst primárního kořene a kratší kořeny, větvení kořenových vlásků a otok epidermálních buněk (Obr. 2; Beck et al., 2010). Pomocí imunofluorescence byla prokázána vícejadernost buněk (Beck et al., 2011). Při buněčném dělení také u mutantu nedochází k expanzi buněčných přepážek v kořenové špičce (Kosetsu et al., 2010). Další studie ukazují, že mutace v MPK4 způsobuje konstitutivní systémovou rezistenci, která zahrnuje zvýšenou hladinu kyseliny salicylové a zvýšenou odolnost k virulentním patogenům. Pomocí této mutace bylo prokázáno, že MPK4 je potřebná pro správnou funkci jasmonátové signální dráhy (Petersen et al., 2000).



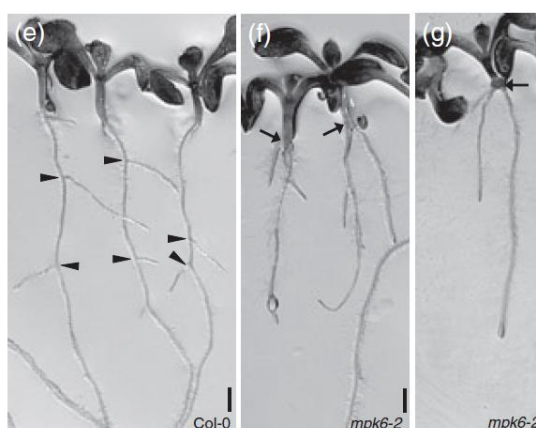
Obr. 2 Porovnání fenotypu kořenových vlásků u divého typu (Col-0) a mutantu (*mpk4*) (Beck et al., 2010).

### 2.1.2 Mitogenem aktivovaná protein kinasa 6 (MPK6)

Bylo prokázáno, že MPK6 je nezbytná pro rezistenci vůči patogenům (Menke et al., 2004). MPK6, stejně jako MPK4, hraje důležitou roli v reakci na chladové podmínky. Aktivovaná MPK6 byla zaznamenána již po 10 minutovém působení chladových podmínek (Ichimura et al., 2000). Také zvýšená hladina kyslíkových radikálů může způsobit aktivaci MPK6 (Lumbreras et al., 2010). Během oxidativního stresu je MPK6 aktivována jadernými a fragmoplast lokalizovanými kinasami 1, 2, 3 *Arabidopsis* (ANP1, ANP2, ANP3; (Kovtun et al., 2000)).

Kromě této dráhy, Rentel et al., 2004 objevili gen *OXII* (oxidative signal-inducible 1), který kóduje serin/threonin kinasu. Zvýšená hladina kyslíkových radikálů indukuje transkripci *OXII*, který aktivuje MPK6. Bylo prokázáno, že MPK6 je nezbytná pro expresi a aktivitu antioxidantních enzymů. Například v odpovědi *Arabidopsis thaliana* na exogenní aplikaci kyseliny abscisové dochází k expresi a aktivaci katalasy jenom za přítomnosti MPK6 (Xing et al., 2008). MPK6 je v této signální dráze fosforylována pomocí AtMKK1. V nedávné době bylo zjištěno, že MPK6 je důležitým zprostředkovatelem v signální dráze kyseliny jasmonové, která způsobuje opad listů. MPK6 zde štěpí a přenáší do jádra C-terminální konec CEND proteinu, který indukuje opadávání listů pomocí kyseliny jasmonové (Zhang et al., 2016). Při solném stresu je aktivátorem MPK6 MKK2 (MAPKK) a *mkk2* mutanti vykazují hypersenzitivní reakci při solném stresu (Teige et al., 2004). MPK6 může být také aktivována působením sucha, které indukuje akumulaci kyslíkových radikálů a kyseliny fosfatidové (Liu et al.,

2010). Aktivátorem MPK6 je také kadmium, které opět způsobuje akumulaci kyslíkových radikálů a aktivuje MPK6 především v kořenech *Arabidopsis* (Liu et al., 2010). MPK6 byla detekována na plasmatické membráně a na vezikulech *trans*-Golgi sítě. MPK6 byla také detekována v preprofázním svazku a fragmoplastu při buněčném dělení (Müller et al., 2010). Mezi základní fenotypové defekty MPK6 mutantních rostlin patří absence laterálních kořenů a zvýšené množství adventivních kořenů (Obr. 3; Müller et al., 2010). Na buněčné úrovni dochází k ektopickému dělení buněk (Müller et al., 2010) a při ztrátě funkce MPK6 dochází k shlukování průduchů (Wang et al., 2007).



Obr. 3 Porovnání fenotypu divého typu (Col-0) a mutantu (*mpk6*; Müller et al., 2010).

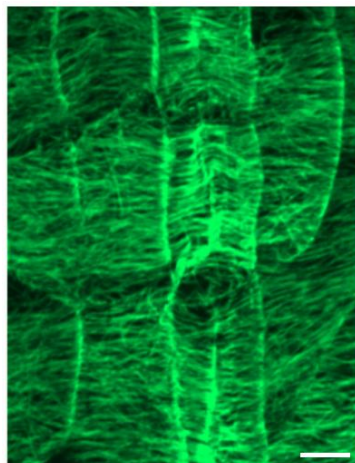
## 2.2 Rostlinný cytoskelet

Cytoskelet tvoří dynamickou, síťovitou strukturu, která vyplňuje cytoplazmu buňky. Mezi hlavní funkce cytoskeletu patří udržování buněčného tvaru, intracelulární transport organel, polární růst kořenových vlásků a pylové láčky a je také nezbytný pro správný průběh meiózy a mitózy (Staiger, Lloyd, 1991). Rostlinný cytoskelet je tvořen aktinovými filamenti a mikrotubuly (Obr. 4). Další nedílnou součástí cytoskeletu jsou molekulové motory (kinesiny, dyneiny a myosiny). Jejich hlavní funkcí je transportovat molekuly nebo buněčné orgány (Kost et al., 2002).

Základní stavební složkou aktinových filament je lineární polymer aktin. Aktinová vlákna jsou několik mikrometrů dlouhá a mají 7 nm v průměru. Mezi hlavní funkce aktinových filament patří mechanická podpora buňky a určování tvaru buňky (Cooper, 2000). Další jeho nezbytnou úlohou je regulace vezikulárního transportu a zprostředkování procesů endocytózy a exocytózy (Lanzetti, 2007). Aktin je složen z tzv. G-aktinu (monomer) a vláknitého F-aktinu (polymer; Dominguez et al., 2010). Genom

*Arabidopsis thaliana* obsahuje 10 aktinových genů, což je více než u hub nebo prvoků. Z těchto 10 genů je 8 funkčních genů a 2 jsou pseudogeny. Podle lokalizace můžou být izovariety aktinu rozděleny na vegetativní (*ACT2*, *ACT7*, *ACT8*) a reprodukční (*ACT11*, *ACT1*, *ACT3*, *ACT4* a *ACT12*; An et al., 1996). Bylo zjištěno, že geny *ACT4* a *ACT12* jsou silně exprimovány v kořenové čepičce a během vývoje pylového zrna (Huang et al., 1996). *ACT1* a *ACT3* jsou silně exprimovány ve zralém pylovém zrnu (An et al., 1996). *ACT2* a *ACT8* jsou exprimovány v listech, kořenech a pylových zrnech (An et al., 1996). *ACT11* je exprimován ve vyvíjejícím se vajíčku a pylových zrnech (McKinney et al., 1998).

Mikrotubuly jsou složeny ze dvou podjednotek,  $\alpha$ -tubulinu a  $\beta$ -tubulinu. Skládáním těchto podjednotek jsou tvořeny válcovité struktury o průměru 24 nm. Obě podjednotky mají vazebné místo pro GTP, jehož hydrolyzou vzniká GDP. Tento proces dává mikrotubulům jedinečnou vlastnost, která je nazývána dynamická nestabilita mikrotubulů (Burbank, Mitchison, 2006).



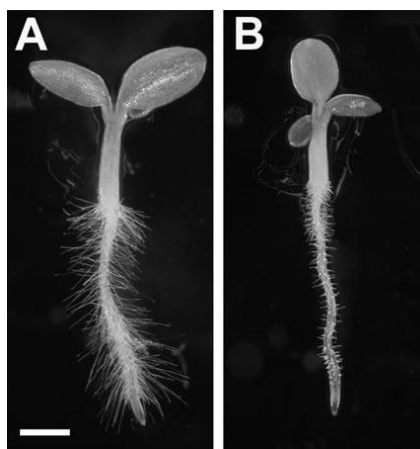
Obr. 4 Vizualizace kortikálních mikrotubulů epidermálních buněk primárního kořene *Arabidopsis* ekotyp Ler pomocí „wholemount“ imunolokalizace (Smékalová et al., 2014).

### 2.3 Aktin 2

Gen pro aktin 2 (*ACT2*) je exprimován ve vegetativních orgánech rostlin (An et al., 1996). *ACT2* je nezbytný pro růst kořenové špičky, kořenových vlásků a selekci místa růstu kořenového vlásku na epidermálních buňkách kořene. Tato funkce *ACT2* byla pozorována na *der1* (*deformed root hairs 1*) mutantu *Arabidopsis*. Bylo zjištěno, že *der1* lokus kóduje *ACT2* (Ringli et al., 2002). *der1* mutant vykazuje širší bázi kořenového vlásku a délka kořenových vlásků byla mnohem menší než u divého typu



(*Arabidopsis thaliana*, ekotyp C24), což dokazuje důležitou roli ACT2 při vývoji kořenových vlásků. U *der1* mutantu byl také pozorován postižený membránový transport (Grebe et al., 2003). Fenotyp *der1* mutantu můžeme vidět na Obr. 5.



Obr. 5 Porovnání fenotypů: A – divý typ C24 (dlouhé kořenové vlásky), B – *der1* (krátké kořenové vlásky; Ringli et al., 2002).

## 2.4 Proteiny vážící se na cytoskelet

Organizaci a dynamiku cytoskeletu regulují proteiny vážící se na cytoskelet. Můžeme je rozdělit do dvou skupin – proteiny asociované s aktinem nebo mikrotubuly.

### 2.4.1 Proteiny vážící se na aktin

Dynamika aktinového cytoskeletu je určována mnoha proteiny asociovanými s aktinem. Mezi hlavní funkce těchto proteinů patří svazkování aktinových vláken, fragmentace, nukleace a transport podél aktinových vláken (Higaki et al., 2007). V následujících řádcích se zaměříme na proteiny hrajících roli v organizaci aktinu.

Arp2/3 je proteinový komplex složený ze 7 podjednotek, jehož důležitou funkcí je polymerizace aktinu (Mullins et al., 1998). Důležitou funkcí tohoto komplexu je také nukleace F-aktinu, ale u rostlin tento efekt prokázán nebyl (Evangelista et al., 2002; Sagot et al., 2002), dále pohyb organel a určování tvaru buněk při jejich vývoji (Mathur, 2005). Další důležitou skupinou proteinů, účastnících se nukleace F-aktinu, jsou forminy. Forminy se váží na polymerační konec F-aktinu, inhibují jeho depolymerizaci a částečně chrání aktin od ostatních proteinů, které by mohly ukončit růst F-aktinu (Ingouff, 2005). Mezi další nukleární proteiny patří gelsolin, který byl identifikován v pylové láčce u máku. Tento protein také stříhá aktinová vlákna a brání shlukování profilin-aktinového komplexu (Huang et al., 2004).

### 2.4.1.1 Profilin

Profilin hraje roli ve změně dynamiky a organizace aktinového cytoskeletu a kontroluje polymerizaci aktinu (Sun et al., 2013). V nedávné studii bylo zjištěno, že PRF1 řídí dynamiku aktinových vláken pomocí modulace forminů, které zprostředkovávají nukleaci aktinu během růstu rostlinné buňky (Cao et al., 2015). Funkce profilinu závisí od aktivity jiných aktin-vázcích proteinů jako forminy a Arp2/3. V jejich závislosti může podpořit nebo inhibovat polymerizaci aktinu (Li et al., 2015). U *Arabidopsis* bylo identifikováno 5 izoform profilinu, PRF1-PRF5. *PRF1-PRF3* jsou exprimovány ve vegetativních orgánech, přičemž *PRF4-PRF5* jsou lokalizovány v orgánech reprodukčních (Christensen et al., 1996; Kandasamy et al., 2002). Další funkcí profilinu je interakce mezi plazmatickou membránou a cytoskeletem. Při této interakci dochází k vazbě profilinu na fosfatidylinositol 4,5 - bisfosfát (PIP<sub>2</sub>), který je ukotven na vnitřní straně cytoplazmatické membrány (Nebl et al., 2000; Caroni, 2001). PIP<sub>2</sub> se váže k transmembránovým proteinům a také interaguje s několika proteiny vázcích se na aktin, včetně profilinu (Goldschmidt-Clermont et al., 1990). Profilin je také proteinem který zprostředkovává interakci mezi cytoskeletem a vezikulárním transportem. Interakce mezi profilinem a vezikulárním transportem byla studována pomocí inhibitoru sekrece, Brefeldinu A (BFA). V kořenech *Arabidopsis* při ošetření BFA dochází ke tvorbě BFA kompartmentů, jako výsledek shlukování váček Golgiho aparátu (Geldner et al., 2003). Během tohoto procesu dochází ke zvýšení množství profilinu 2 a jeho akumulaci v BFA kompartmentech. Aktin byl také lokalizován v blízkém okolí BFA kompartmentů. Profilin se proto podílí na modulaci aktinu při tvorbě BFA kompartmentů. Zde můžeme nalézt spojitost mezi profilinem 2, aktinem a vezikulárním transportem (Takáč et al., 2011).

### 2.4.2 Proteiny vázcí se na mikrotubuly (MAP)

MAP se váží na mikrotubuly a regulují jejich dynamiku, stabilitu a organizaci (Gardiner et al., 2013). MAP proteinů existuje celá řada. V následujících řádcích se zaměříme na strukturní a destabilizující MAP.

#### 2.4.2.1 Strukturní MAP

Mezi hlavní funkci strukturních MAP patří propojení mikrotubulů s cytoplazmatickou membránou a dalšími kompartmenty buňky jako je endoplazmatické retikulum. Mezi nejlépe prostudované strukturní MAP patří rodina MAP65 proteinů, která obsahuje 9

členů. MAP65-1 a MAP65-2 byly lokalizovány uvnitř svazkujících se interfázních mikrotubulů v epidermálních buňkách hypokotylu (Lucas et al., 2011). Dvojitý mutant *map65-1 map65-2* vykazuje zpomalený růst, avšak jiné morfologické defekty zaznamenané nebyly (Lucas et al., 2011). MAP65-3 protein hraje úlohu při svazkování mikrotubulů, kde vytváří příčné vazby mezi antiparalelními mikrotubuly na jejich plus konci (Ho et al., 2012). MAP65-4 indukuje tvorbu příčných můstků mezi sousedními mikrotubuly. Asociace MAP65-4 a mikrotubulů je souběžná s jejich prodlužováním (Fache et al., 2010). MAP65-5 se váže k preprofáznímu svazku a také k profázním mikrotubulům (Gaillard et al., 2008). MAP65-6 se nachází hlavně v mitochondriích, kortikálních a interfázních mikrotubulech (Mao et al., 2005). Ostatní MAP65 proteiny ještě nebyly detailněji prozkoumány a charakterizovány.

Mezi další strukturní MAP můžeme zařadit WAVE-DAMPENED 2 (WVD2) protein. Nadexprese *WVD2* způsobuje zpomalení prodlužování buněk, kroucení kořene (Yuen et al., 2003) a změnu v orientaci kortikálních mikrotubulů v buňkách kořenevé čepičky (Perrin et al., 2007).

#### **2.4.2.2 Destabilizující MAP**

Mezi hlavní proteiny, které destabilizují mikrotubuly, můžeme zařadit katanin a MAP18. Katanin byl spolu s dalšími proteiny vázajících se na mikrotubuly izolován a purifikován z buněčné suspenzní kultury *Arabidopsis thaliana* (Hamada et al., 2013). Katanin je heterodimerní protein skládající se z 2 podjednotek – p60 a p80 (McNally and Vale, 1993). Podjednotka p60 se podílí na správném vývoji trichomů, hypokotylu, stonku a kořenových vlásků (Burk et al., 2001). Genom *Arabidopsis* obsahuje 4 geny s možnou funkcí podjednotky kataninu p80 (Roll-Mecak, McNally, 2010). Jejich funkce ale doposud nebyla popsána. Hlavní funkcí tohoto proteinu je stříhání mikrotubulů. Proces stříhání mikrotubulů je regulován hydrolyzou ATP, které je součástí p60 podjednotky. Podstatou tohoto procesu je navázání motorových proteinů na mikrotubuly. Motorové proteiny způsobí zlom na mikrotubulech a může dojít k navázání kataninu a „přestřížení“ mikrotubulů (Ghosh et al., 2012).

Pomocí turbidimetrické analýzy byl prokázán inhibiční vliv MAP18 na polymerizaci mikrotubulů. Transgenní rostliny s nadexpresí MAP18 vykazují zkroucení kořene a zvětšené buňky hypokotylu. Dále byla v transgenních rostlinách prokázána vyšší citlivost mikrotubulů k mikrotubulárním inhibitorům (např. oryzalinu). Při nedostatku

MAP18 byla naopak prokázána vyšší odolnost vůči oryzalinu (Wang et al., 2007). Zhu et al., 2013 prokázaly úlohu MAP18 v růstu pylové láčky, kdy dochází k modulaci aktinových filament.

## **2.5 Interakce mezi MAPKs a cytoskeletem**

MAPKs jsou enzymy, které zastávají důležitou úlohu nejen při reakcích na biotický a abiotický stres, ale také se účastní vývojových procesů, ve kterých hraje nezastupitelnou roli cytoskelet. Je tomu tak například při buněčném dělení (Bögre et al., 1999).

### **2.5.1 MAPKs a aktinový cytoskelet**

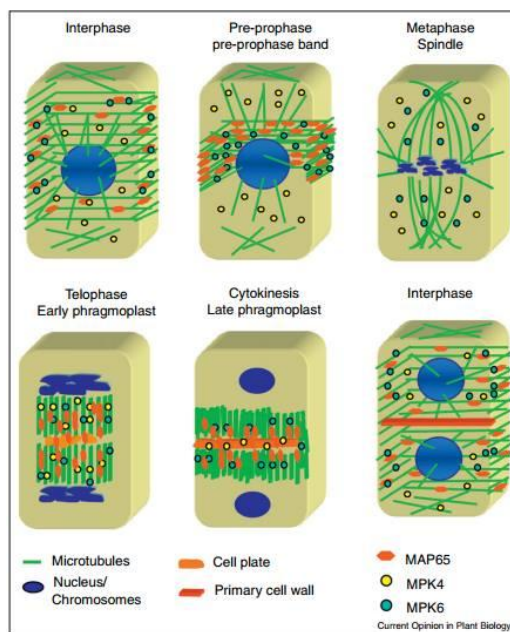
Existuje jenom málo znalostí o vztahu MAPKs a aktinového cytoskeletu. Vztah mezi MAPKs a aktinovým cytoskeletem byl u rostlin zkoumán pomocí látek narušující aktinový cytoskelet. Latrunculin B aktivuje stresem indukované MAPKs (SIMK) a stresem aktivované MAPKs (SAMK), které se účastní odpovědi na osmotický stres a stres z tepla a sucha (Šamaj et al., 2002). Jasplakinolid, látka snižující dynamiku aktinových vláken, aktivuje SIMK (Šamaj et al., 2002), ale ne SAMK (Sangwan et al., 2002). Účinek latrunculinu B a jasplakinolidu může naznačovat vliv MAPKs na aktinový cytoskelet (Šamaj et al., 2002). V této studii byla prokázána relokace stresem aktivované MAP kinasy SIMK vojtěšky z cytoplazmy do jádra při depolymerizaci aktinu působením latrunculinu B. Při stabilizaci aktinu pomocí jasplakinolidu dochází ke kolokalizaci SIMK s aktinovými vlákny v cytoplazmě.

### **2.5.2 MAPKs a mikrotubuly**

MAP kinasové signální dráhy jsou propojeny s cytoskeletem pomocí fosforylace cytoskeletálních proteinů nebo přes interakce s tzv. „scaffold“ proteiny (Komis et al. 2011, Meister et al., 2013). Beck et al., 2010 prokázali, že MAP65-1 je fosforylačním cílem MPK4 a je také nezbytná pro organizaci kortikálních mikrotubulů v epidermálních buňkách *Arabidopsis*. Jak bylo zmíněno dříve, MPK6 je lokalizována na mikrotubulech při buněčných procesech. Kohoutová et al., 2015 analyzovaly lokalizaci MPK6 v kořenovém meristému a interakci s EB1 proteinem na plus konci mikrotubulů. Pomocí dvojitého imunofluorescenčního značení byla MPK6 lokalizována v oblasti preprofázního proužku, metafázním dělicím vřetenku a fragmoplastu.

MAPKs regulují dynamiku mikrotubulů během osmotického stresu v kvasinkách (Hagan, 2008). Mikrotubuly a jejich asociace s MAPKs může být také ovlivněna nitrací

tyrosinového  $\alpha$ -tubulinu (Blume et al., 2013). Na Obr. 6 můžeme vidět schématické znázornění funkce interakce MPK4 a MAP65 v regulaci mikrotubulů. MAP65-1 a MAP65-2 byly identifikovány jako substráty MPK4 *in vitro*. MAP65-3 byl identifikován jako substrát pro MPK4 v NACK-PQR signální dráze u *Arabidopsis* (Sasabe et al., 2011).



Obr. 6 Asociace MAP65, MPK4 a MPK6 s mikrotubuly v různých fázích buněčného dělení (Komis et al., 2011).

## 2.6 Auxin a jeho vliv na vývoj rostlin

Auxiny jsou významná skupina rostlinných hormonů. Jedním z hlavních auxinů ve vyšších rostlinách je kyselina indol-3-octová (IAA). Auxin hraje nezbytnou roli v mnoha vývojových procesech jako je např. gametogeneze, embryogeneze nebo růst semenáčků (Zhao, 2010). Auxin také napomáhá vazbě mezi AUX/IAA proteiny a ubikvitin protein lipasou nazývanou SCF. Díky tomuto mechanismu je auxin také známý jako regulátor genové exprese (Estelle et al., 2004). Smékalová et al., 2014 prokázali vliv IAA na délku primárního kořene, kdy dochází k redukci jeho délky. Dále bylo prokázáno, že MPK6 je zahrnuta v postembryonálním vývoji kořene skrze auxinový regulační mechanismus. Transport auxinu v buňce je důležitý pro tvorbu laterálních kořenů, což bylo prokázáno za pomoci inhibitoru auxinového transportu – N-1-naftylftalamovou kyselinou (NPA; Casimiro et al., 2001). Jedním z inhibitorů auxinu je auxinol. Tento inhibitor potlačuje funkci TIR1 auxinového receptoru, což má za následek zkrácenou délku a kroucení primárního kořene (Smékalová et al., 2014).

## 2.7 Proteomické přístupy k analýze MAP kinasové signální dráhy

Mezi hlavní proteomické přístupy k analýze MAP kinasové signální dráhy patří analýza proteomu MAP kinasových mutantů, analýza fosfoproteomu stabilně transformovaných rostlin nesoucích konstitutivně aktivní formu heterologní MAPkinasy a využití „microarray“ proteinů (shrnutí v Takáč a Šamaj, 2015).

„Microarray“ proteomický přístup umožňuje identifikovat substráty MAP kinas pomocí imobilizovaných proteinů na destičce, a tak poznávat nové signální dráhy. Feilner et al., 2005 identifikovali pomocí tohoto přístupu 39 nových substrátů pro MPK6 (např. casein kinasa I). Všechny substráty byly purifikovány, separovány na SDS PAGE, přeneseny na PVDF membránu a inkubovány s MPK6 protilátkou za účelem ověření jejich pravosti. V analogické práci Popescu et al., 2009 identifikovali proteiny fosforylované aktivovanými MPK. Většina z 570 identifikovaných proteinů byly transkripční faktory hrající významnou úlohu ve vývojových procesech a odpovědích na stres. Například transkripční faktor WRKY62 je aktivován pomocí MPK6, která je indukována kyselinou salicylovou (Popescu et al., 2009).

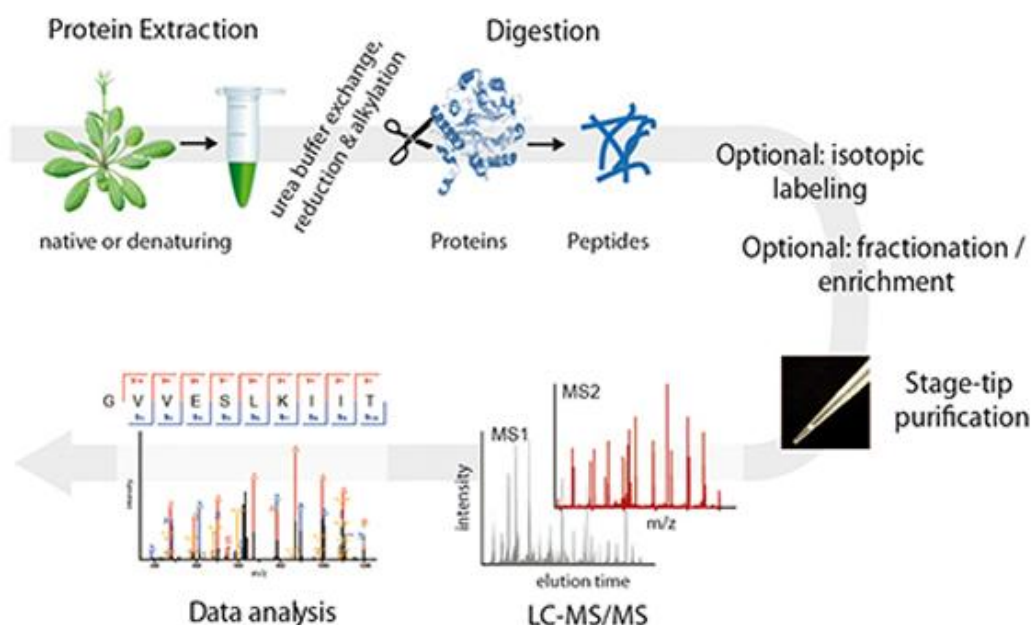
Byla také publikována proteomická analýza dvojitého mutantu *anp2anp3*. Mutant *anp2anp3* je deficientní ve 2 MAPKKK. Proteomická analýza ukázala zvýšené zastoupení enzymů FeSOD1, MnSOD, DHAR1 a regulačního proteinu CPN20 asociovaného s FeSOD1 v *anp2anp3* v porovnání s divým typem. Tato data byla validována pomocí imunoblotování a kvantitativního biochemického měření aktivity uvedených antioxidantních enzymů (Takáč et al., 2014). MKK1 je MAP kinasa kinasa hrající úlohu v odpovědi na stres, která aktivuje MPK4 a MPK6. Bylo zjištěno, že *mkk1* mutant má zvýšenou toleranci vůči solnému stresu. Proteomická analýza ukázala zvýšenou hladinu  $\alpha$  podjednotky mitochondriální H<sup>+</sup>-ATPasy a mitochondriální NADH dehydrogenasy (Conroy et al., 2013).

Hoehenwarter et al., 2013 použili dvoukrokovou MOAC (afinitní chromatografie s využitím kovového oxidu) chromatografii v kombinaci s LC-MS/MS k identifikaci a kvantifikaci fosforylovaných aminokyselin MAP kinasových substrátů v *Arabidopsis thaliana*. Tato metoda je unikátní v obohacení fosfoproteinů a následném obohacení fosfopeptidů. Mao et al., 2011 pomocí PHOSTAG metody prokázal, že transkripční faktor WRKY33 je substrát pro MPK6 při odpovědi na stres působením patogena *Botrytis cinerea*. Lassowskat et al., 2014 použili pro fosfoproteomický přístup ekotyp

*Arabidopsis* Col-0 a mutanty *mpk3* a *mpk6*. Všechny tyto rostliny exprimují MKK5 petržele pod dexamethason-inducibilním promotorem. Heterologní exprese MKK5 aktivuje MPK3 a MPK6. Identifikovali 17 možných substrátů MAP kinas.

### 2.7.1 Výhody „shot-gun“ proteomického přístupu

Podstatou tzv. shot-gun proteomické analýzy je identifikace jednotlivých proteinů za pomoci vysokoúčinné kapalinové chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (Obr. 7). Použitím rostlin s modifikovanou hladinou určitého genu se stává tento přístup vysoce účinný pro detekci proteinových kandidátů zodpovědných za fenotypové a fyziologické procesy v mutantu. Také můžeme najít nové molekulární procesy probíhající v mutantech, a které mohou být regulovány MAPKs, ve které je mutant deficientní (Takáč, 2015). Ověření těchto výsledků můžeme pomocí dalších metod jako je např. imunoblotování pomocí monospecifické primární protilátky nebo mikroskopie živých buněk s lokalizací fluorescenčně značených proteinů. Nezbytnou součástí proteomiky je zpracování proteomických dat a jejich následná interpretace. K těmto účelům je možné využít různé nástroje jako je např. Gene ontology anotace (Ashburner et al., 2000). Predikce protein-proteinových interakcí je možná pomocí aplikace STRING (Von Mering et al., 2005).



Obr. 7 Schéma identifikace proteinů a peptidů pomocí shot-gun proteomického přístupu (zdroj: [http://www.mpipz.mpg.de/protein\\_MS](http://www.mpipz.mpg.de/protein_MS)).

### 3 MATERIÁL A METODY

#### 3.1 Biologický materiál

Jako rostlinný materiál byl použit *Arabidopsis thaliana*, ekotyp C24 a Col-0 a mutantní rostliny *der1-3* (Ringli et al., 2002), *mpk4* (Beck et al., 2010) a *mpk6-2* (dále označován jako *mpk6*; Müller et al., 2010).

#### 3.2 Chemikálie

Tab. 1 Seznam použitých chemikálií

Název chemikálie	Dodavatel
2-merkptoethanol	Sigma Aldrich
40% akrylamid/Bis solution	Bio-Rad
acetát amonný	Sigma Aldrich
acetonitril	Sigma Aldrich
amfolyty	Serva
amid kyseliny jodoctové (IAA)	Sigma Aldrich
auxinol	Sigma Aldrich
Bis-Tris	Sigma Aldrich
Blotting-grade blocker (odtučněné mléko)	Bio-Rad
Clarity ECL Western Blotting substrate	Bio-Rad
Complete (Protease Inhibitor Cocktail Tablets)	Roche
Coomassie protein assay reagent	Sigma Aldrich
dithiothreitol (DTT)	Sigma Aldrich
dodecyl sulfát sodný (SDS)	Sigma Aldrich
dusičnan zinečnatý	Sigma Aldrich
ethanol	Sigma Aldrich
ethylenglykoltetraoctová kyselina (EGTA)	Sigma Aldrich
chlorid železitý	Sigma Aldrich
chlorid draselný	Sigma Aldrich
hexakynoželezitan draselný	Sigma Aldrich
glycerol	Sigma Aldrich
glycin	Sigma Aldrich
HEPES	Sigma Aldrich
hovězí sérový albumin (BSA)	Sigma Aldrich
hydrogensířičitan sodný	Sigma Aldrich
CHAPS	Sigma Aldrich
kyselina askorbová	Sigma Aldrich



Tab. 2 Seznam použitých chemikálií (*pokračování*)

kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA)	Sigma Aldrich
Laemmli pufr	Bio-Rad
methanol	Sigma Aldrich
močovina	Sigma Aldrich
Murashige & Skoog medium	Duchefa
Nitroblue tetrazolium chlorid (NBT)	Sigma Aldrich
octan amonný	Sigma Aldrich
O-dianizidin	Sigma Aldrich
peroxid vodíku	Sigma Aldrich
peroxodisíran amonný (APS)	Sigma Aldrich
PhosStop (Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets)	Roche
Phostag ligand	WAKO Laboratory Chemicals
phytagel	Sigma Aldrich
Ponceau S	Sigma Aldrich
riboflavin	Appllichem
sacharosa	Sigma Aldrich
Sequencing Grade Modified Trypsin	Promega
tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma Aldrich
TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit, 7,5%	Bio-Rad
trifluoroctová kyselina	Sigma Aldrich
Tris HCl	Sigma Aldrich
Trisem pufrovaný fenol pH 8,8	Sigma Aldrich
Triton X-100	Sigma Aldrich
Tween-20	Sigma Aldrich

Tab. 2 Seznam použitých protilátek

Název protilátky	Dodavatel	Ředění
anti-aktin	Sigma Aldrich	1:4000 v 1% BSA v TBS-T
anti-alfa tubulin	Serotec	1:2000 v 1% BSA v TBS-T
anti-beta tubulin	Sigma Aldrich	1:2000 v 1% BSA v TBS-T
anti-MPK4	Sigma Aldrich	1:1000 v 3% BSA v TBS-T
anti-MPK6	Sigma Aldrich	1:5000 v 1% BSA v TBS-T
anti-profilin	Sigma Aldrich	1:5000 v 1% BSA v TBS-T
Goat anti-rabbit IgG (H&L), horseradish peroxidase conjugate	Novex	1:5000 v 1% BSA v TBS-T
Goat anti-mouse rabbit IgG (H&L), horseradish peroxidase conjugate	Novex	1:5000 v 1% BSA v TBS-T

### 3.3 Přístroje

Tab. 3 Seznam použitých přístrojů

Název přístroje	Dodavatel
Aparatura pro SDS PAGE	Bio-Rad
ChemiDoc MP - Imaging system	Bio-Rad
MR-12 Rocker-Shaker	Biosan
pH elektroda (PC 2700)	Eutech Instruments
Analytické váhy (XA 110/2X)	Radwaag
Digestoř, flowbox	Merci
Fluorescenční binokulární stereomikroskop (Leica M165FC)	Leica
Centrifuga (Allegra 64R)	Beckman Coulter
Spektrofotometr (DU 730 lifescience)	Beckman Coulter
Imagescanner III	GE Healthcare

### 3.4 Metody

#### 3.4.1 Příprava rostlinného materiálu

Semena *Arabidopsis thaliana* ekotyp C24, Col-0 a mutantů *der1-3*, *mpk4* a *mpk6* byla vysterilizována ve 3 krocích. Nejprve byla semena inkubována 5 minut v 70%

ethanolu, poté 3 minuty v 96% ethanolu a nakonec byla 4x propláchnuta v 1 ml sterilní destilované vody. Vysterilizovaná semena byla nanášena na filtrační papír a vysušena. Poté byla nanášena na misku s ½ MS (Murashige a Skoog, 1962) pevným médiem (2,15 g MS (Duchefa), 0,1% (w/v) sacharóza a 8 g phytagelu na 1 l destilované vody, pH 5,8). Vysázená semena byla inkubována 1 den při 4 °C a následně uložena na 14 dní do fytotronu, kde byla kultivována vertikálně při 22 °C, 71 % vlhkosti a denním režimu 16/8. Pozitivní mutantní rostliny byly po 6 dnech kultivace selektovány na základě fenotypů pomocí binokulárního mikroskopu.

Pro proteomickou analýzu, imunoblotovou analýzu a analýzu aktivity antioxidantních enzymů byly odebrány kořeny mutantů *mpk4*, *mpk6* a divého typu Col-0 ve čtyřech biologických replikách. Rostliny byly odbírány pro každý mutant nezávisle, proto jsou analyzovány kořeny Col-0 zvlášť pro oba mutanty.

Pro analýzu fosforylace MAPK v kořenech *der1-3* mutantu byly 14-denní rostliny divého typu C24 a *der1-3* inkubovány v 15 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v tekutém ½ MS médiu. Adekvátní počet rostlin byl inkubován v tekutém ½ MS médiu bez H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ovlivnění probíhalo 30 minut při nízké rychlosti třepání ve fytotronu. Následně byly kořeny odebrány a homogenizovány pomocí tekutého dusíku v třecí misce. Homogenát byl skladován při -80 °C pro další zpracování.

### **3.4.2 Extrakce proteinů pro proteomickou analýzu *mpk4* a *mpk6* mutantů**

Ke zhomogenizovaným vzorkům bylo přidáno 300 µl extrakčního pufru (0,9 mol.l<sup>-1</sup> sacharóza, 0,1 mol.l<sup>-1</sup> Tris-HCl pH 8,8; 10 mmol.l<sup>-1</sup> ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), 100 mol.l<sup>-1</sup> KCl a 0,4% (v/v) 2-merkptoethanol) a 300 µl Trisem pufovaného fenolu (pH 8,8). Vzorky byly vortexovány a inkubovány 1 hodinu při 4 °C. Poté byly centrifugovány 5 minut, při 6000 g a 4 °C. Fenolová fáze (vrchní) byla odpipetována do čisté mikrozskumavky a k vodné (spodní) fázi bylo přidáno 200 µl fenolu a po zvortexování byla směs znovu centrifugována a fenolová fáze opět odebrána. Poté byly proteiny ve fenolové fázi precipitovány 5-ti násobným množstvím 0,1 mol.l<sup>-1</sup> acetátu amonného v 100% methanolu při -20 °C přes noc. Následně byly vzorky centrifugovány (13 000 g, 20 minut, 4 °C), a proteinový pelet promyt 1x v 0,1 mol.l<sup>-1</sup> acetátu amonném v 100% methanolu a 2x v 80% acetonu. Po každém promytí byly proteiny inkubovány 15 minut při -20 °C a centrifugovány při 13000 g a 4 °C. Po

precipitaci proteinů byl proteinový pelet rozpuštěn v 50  $\mu\text{l}$  6  $\text{mol.l}^{-1}$  močoviny v 50  $\text{mmol.l}^{-1}$  Tris-HCl pufru (pH 7,4) a inkubován 30 minut při pokojové teplotě. Byl změřen obsah proteinů ve vzorku. Pro trypsinové štěpení bylo pro každý vzorek použito 100  $\mu\text{g}$  proteinů. Nejprve byly vzorky inkubovány 1 hodinu v 1  $\text{mmol.l}^{-1}$  dithioeitol (DTT) při pokojové teplotě, následně bylo přidáno 11  $\mu\text{l}$  100  $\text{mmol.l}^{-1}$  IAA a nakonec byly proteiny štěpeny pomocí trypsinu (1  $\mu\text{g}/50$   $\mu\text{g}$  proteinu) přes noc při 37  $^{\circ}\text{C}$ . Po štěpení trypsinem bylo sníženo pH vzorku na 4 pomocí kyseliny octové a proteiny byly odsoleny na C18 kolonkách. C18 kolonky byly nejprve aktivovány 50% v/v acetonitrilem, poté byly promyty 0,1% (v/v) trifluoroctovou kyselinou (TFA) a došlo k nanesení vzorku. Odstranění nenavázaných složek bylo provedeno aplikací 0,5% TFA v 5% acetonitrilu. Vzorek byl eluován 90% acetonitrilem. Vzorky byly poté odeslány na proteomickou analýzu.

Kvantitativní proteomická analýza byla provedena pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie spojené s kapalinovou chromatografií (LC-MS/MS) na hmotnostním spektrometru Orbitrap LTQ Velos (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) verze Xcalibur version 2.1.0 spojené s UltiMate 3000 nano flow HPLC system (Dionex) externě v laboratoři Dr. Tibora Pechana na Mississippi State University.

Výsledkem proteomické analýzy byly identifikované proteiny pro každý individuální vzorek s uvedenou relativní kvantifikací v podobě intenzity píků.

Porovnání abundance proteinů bylo provedeno pomocí softwaru MS Excel. Byla provedena statistická analýza pomocí jednofaktorového Anova testu. Proteiny s hladinou průkaznosti  $\geq 95$  byly považovány za statisticky signifikantní.

Pro vyhodnocení byly zahrnuty proteiny se změnou abundance větší než 1,5 v porovnání s divým typem a proteiny detekovány jenom v 1 vzorku pro všechny biologické repliky.

### **3.4.3 Měření obsahu proteinů**

Měření obsahu proteinů bylo provedeno metodou Bradfordové (Bradford et al, 1976). Byla připravena reakční směs složená z 89  $\mu\text{l}$  destilované vody, 10  $\mu\text{l}$  Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma Aldrich) a 1  $\mu\text{l}$  vzorku. Absorbance byla měřena při 595

nm. Obsah proteinů byl odvozen z kalibrační křivky, která byla zhotovena pomocí hovězího sérového albuminu jako standardu.

#### **3.4.4 Extrakce proteinů pro Phostag analýzu a imunoblotování**

Proteiny byly z homogenizovaných kořenů extrahovány pomocí 200  $\mu$ l extrakčního pufru (50  $\text{mmol.l}^{-1}$  2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonová kyselina (HEPES), 75  $\text{mmol.l}^{-1}$  NaCl, 1  $\text{mmol.l}^{-1}$  ethylenglykoltetraocová kyselina (EGTA), 1  $\text{mmol.l}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ , 1  $\text{mmol.l}^{-1}$  NaF, 10% glycerol, 1  $\text{mmol.l}^{-1}$  DTT, inhibitor proteas Complete EDTA-free, ROCHE, a PhosSTOP (phosphatase inhibitor cocktail tablets, ROCHE). Vzorky byly z vortexovány a inkubovány 30 minut na ledě a poté centrifugovány (13 000 g, 15 minut, 4 °C). Supernatant byl přepipetován do čistých mikrokumavek. Po změření obsahu proteinů bylo do vzorku přidáno 5-ti násobné množství 80% acetonu a vzorky byly ponechány při -20 °C přes noc. Po vysrážení byly vzorky centrifugovány (15 minut, 13 000 g, 4 °C). Precipitát byl rozpuštěn v 50  $\mu$ l extrakčního pufru. Poté byl extrakt obohacen o Laemmli pufr (62,5  $\text{mmol.l}^{-1}$  Tris-HCl, pH 6,8; 10% glycerol; 1% LDS; 0,005% bromfenolová modř) a 2-merkptoethanol (ve finální koncentraci 5% (v/v)) a vzorek byl povařen 5 minut při 95 °C.

#### **3.4.5 Denaturující polyakrylamidová elektroforéza, Phostag analýza a imunoblotování**

Separace proteinů pro Phostag analýzu byla provedena na 7% separačním gelu (Tab. 4) a 4% zaostřovacím gelu (Tab. 5). Elektroforéza probíhala 5 hodin, při konstantních 10 mA/gel a 4°C. Současně byly ty samé vzorky separovány na 12% denaturujícím polyakrylamidovém gelu bez přídavku Phostag ligandu. Následně byl gel s ligandem inkubován 2x15 minut v 10  $\text{mmol.l}^{-1}$  roztoku EDTA a 1x15 minut v 1  $\text{mmol.l}^{-1}$  EDTA v transferovém pufru 1 (20  $\text{mmol.l}^{-1}$  Tris, 150  $\text{mmol.l}^{-1}$  glycin, 5  $\text{mmol.l}^{-1}$  hydrogensířičitan sodný, 10% methanol). Gel bez ligandu byl inkubován v transferovém pufru 2 (20  $\text{mmol.l}^{-1}$  Tris, 150  $\text{mmol.l}^{-1}$  glycin, 10% methanol).

Poté byly proteiny přeneseny z obou gelů při 24 V, 4 °C přes noc na polyvinylidene difluoridovou (PVDF) membránu s použitím transferového pufru 1 s přídavkem 5  $\text{mmol.l}^{-1}$  EDTA (Phostag analýza) a transferového pufru 2 (denaturující polyakrylamidová elektroforéza). Poté byly obě membrány inkubovány po dobu 1 hodiny v blokovacím pufru (4% (w/v) BSA a 4% (w/v) odtučněné sušené mléko v TBS-

T (20 mmol.l<sup>-1</sup> Tris; 150 mmol.l<sup>-1</sup> glycin; 0,001% (v/v) Tween). Následně byly membrány inkubovány s primárními protilátkami v ředění podle tabulky 2 přes noc a po promytí byla přidána sekundární protilátka (Tab. 2). Signál byl na PVDF membráně vizualizován chemiluminiscenčně na dokumentačním zařízení Chemidoc (Bio-Rad) po inkubaci v roztoku ECL (Clarity™ Western ECL Blotting Substrate, BioRad).

Pro kontrolu množství nanesených proteinů byly použity 12% TGX Stain-free FastCast akrylamidové gely. Bylo použito 5 µg proteinů do každé dráhy. TGX Stain-Free (BioRad) technologie umožňuje vizualizaci proteinů na gelu okamžitě po elektroforéze na základě UV signálu. Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 200 V. Signál byl detekován pomocí dokumentačního zařízení Chemidoc (Bio-Rad).

Tab. 4 Chemické složení 7% separačního gelu pro Phostag analýzu

<b>Celkové množství</b>	<b>5 ml</b>
Destilovaná voda	2 289 µl
1,25 mol.l <sup>-1</sup> bis-Tris-HCl, pH 6,8	1 430 µl
40% akrylamid	1 167 µl
10 mmol.l <sup>-1</sup> Zn(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	25 µl
5 mmol.l <sup>-1</sup> PHOSTAG	25 µl
10% APS	12,5 µl
TEMED	2,5 µl

Tab. 5 Chemické složení 4% zaostřovacího gelu pro Phostag analýzu

<b>Celkové množství</b>	<b>2,5 ml</b>
Destilovaná voda	1 520 µl
1,25 mol.l <sup>-1</sup> bis-Tris-HCl, pH 6,8	715 µl
40% akrylamid	250 µl
10% APS	12,5 µl
TEMED	2,5 µl

### 3.4.6 Příprava rostlinného materiálu na ošetření IAA a auxinolem

Vysterilizovaná semena (viz kapitola 3.4.1) Col-0 a mutantů *mpk4* a *mpk6* byla vyseta na ½ MS médium a kultivována ve fytotronu na 3 dny. Třídenní rostliny byly vyselektovány a přeloženy na ½ MS médium s obsahem 1 µmol.l<sup>-1</sup> amidu kyseliny jodoctové (IAA) nebo 10 µmmol.l<sup>-1</sup> auxinolu (α-[2,4-dimethylphenylethyl-2-oxo]-

IAA). Jako kontrola bylo použito adekvátní množství rostlin Col-0 a *mpk4*, *mpk6* mutantů, které bylo přeloženo na ½ MS médium. Takto přeložené rostliny byly vždy 6. den po působení IAA (auxinolu) pozorovány pod fluorescenčním binokulárním stereomikroskopem (Leica M165FC), kde byl sledován jejich fenotyp.

### 3.4.7 Stanovení aktivity vybraných antioxidačních enzymů v *mpk4* a *mpk6* mutantech

Kořeny 14-denních rostlin mutantů *mpk4* a *mpk6* a Col-0 byly homogenizovány v přítomnosti tekutého dusíku v třecí misce. Homogenát byl rozpuštěn v 50 mmol.l<sup>-1</sup> Na-fosfátovém pufru s obsahem 2 mmol.l<sup>-1</sup> askorbátu, 2 mmol.l<sup>-1</sup> EDTA a 10% glycerolu. Extrakt byl centrifugován (13000 g, 15 minut, 4 °C) a obsah proteinů v supernatantu byl měřen podle metody Bradfordové (1976). Na gel bylo nanášeno stejné množství proteinů ve vzorcích. Analýzy byly provedeny ve dvou biologických opakováních.

#### 3.4.7.1 Stanovení aktivity katalázy

Separace proteinů probíhala na 12% nativním polyakrylamidovém gelu (Tab. 6) a 4% zaostřovacím gelu (Tab. 7). Byl použit elektroforetický pufr s obsahem 25 mmol.l<sup>-1</sup> Tris-HCl a 192 mmol.l<sup>-1</sup> glycinu. Na gel bylo nanášeno 5 µg proteinů pro každý vzorek a elektroforéza probíhala 2 hodiny za konstantních 20 mA/gel. Po skončení elektroforézy byl gel promyt 3×5 minut v destilované vodě a následně inkubován 10 minut v 20 ml 0,006% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Po inkubaci byl gel opláchnut opět destilovanou vodou a inkubován 5 minut v roztoku 1% ferikyanidu (K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]) a 1% ferichloridu (FeCl<sub>3</sub>). Po inkubaci byl gel opláchnut destilovanou vodou a dokumentován na dokumentačním zařízení Chemidoc (Bio-Rad).

Tab. 6 Chemické složení 12% nativního separačního gelu

<b>Celkové množství</b>	<b>4,95 ml</b>
Destilovaná voda	2 173 µl
1,5mol.l <sup>-1</sup> bis-Tris-HCl, pH 8,8	1 250 µl
40% akrylamid	1 500 µl
10% APS	25 µl
TEMED	2,5 µl

Tab. 7 Chemické složení 4% zaostřovacího gelu

<b>Celkové množství</b>	<b>1,3 ml</b>
Destilovaná voda	793 $\mu$ l
0,5mmol.l <sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 6,8	312,5 $\mu$ l
40% akrylamid	125 $\mu$ l
10% APS	6,25 $\mu$ l
TEMED	1,25 $\mu$ l

### 3.4.7.2 Stanovení aktivity superoxiddismutasy (SOD)

Separace proteinů probíhala za stejných podmínek jako v části 3.4.7.1. Na gel bylo naneseno 15  $\mu$ g proteinů pro každý vzorek. Po skončení elektroforézy byl gel inkubován v 50 mmol.l<sup>-1</sup> Na fosfátovém pufru pH, 7,8 po dobu 15 minut. Poté následovala inkubace ve tmě v 50 mmol.l<sup>-1</sup> Na fosfátovém pufru, pH 7,8 s obsahem 0,5 mmol.l<sup>-1</sup> NBT (nitroblue tetrazolium chlorid). Nakonec byl gel inkubován ve tmě 20 minut v Na fosfátovém pufru, pH 7,8 s obsahem 8 mmol.l<sup>-1</sup> riboflavinu (rozpuštěn v 96% ethanolu), 0,3% tetramehylethylendiamin (TEMEDu) a 5 mmol.l<sup>-1</sup> EDTA. Po této inkubaci byl pro vizualizaci izoenzymů gel ponechán 10 minut na světle. Gely byly dokumentovány na dokumentačním zařízení Chemidoc (Bio-Rad).

### 3.4.7.3 Stanovení aktivity peroxidasy

Separace proteinů probíhala stejně jako v části 3.4.7.1. Na gel bylo naneseno 15  $\mu$ g proteinů pro každý vzorek. Po skončení elektroforézy byl gel inkubován 15 minut v 50 mmol.l<sup>-1</sup> Na acetátovém pufru pH 5 a poté 20 minut v 50 mmol.l<sup>-1</sup> Na acetátovém pufru pH 5 s obsahem 2 mmol.l<sup>-1</sup> O-dianizidinu (nejprve rozpuštěn v ethanolu) a 1 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Gely byly dokumentovány na dokumentačním zařízení Chemidoc (Bio-Rad).

Kvantifikace pásů z imunoblotování, PHOSTAG analýzy a analýzy aktivity enzymů byla provedena pomocí softwaru Image Lab 4.0.1 (Bio-Rad).

### 3.4.8 Bioinformatické vyhodnocení proteomických dat

K usnadnění interpretace proteomických dat byla použita bioinformatická analýza pomocí gene ontology (GO) anotace provedena pomocí Blast2GO, verze 2.8.0 (<https://www.blast2go.com>). GO anotace umožňuje funkční anotaci proteinových sekvencí a rozdělení proteinů podle 3 kategorií (v jakém kompartmentu buňky se proteiny nachází – buněčný kompartment; podle procesu, kterého se v buňce účastní –



biologický proces a nakonec podle molekulární funkce). Byly použity sekvence proteinů se změněnou abundancí u obou mutantů, sekvence proteinů detekované pouze v 1 vzorku (*mpk4* nebo *mpk6*) a sekvence proteinů detekovaných pouze v Col-0. Analýza pomocí Blast2Go probíhala v několika krocích. Po vložení sekvencí následuje porovnání sekvencí s databází NCBI *Arabidopsis thaliana* (tzv. BLAST search) a přiřazení pouze 1 proteinu pro každou sekvenci. Následně probíhá tzv. mapping step a poté „annotation step“, ve kterém dochází k přiřazení funkce proteinům. Kotvící sekvence pro vazbu MAPKs v diferenciálním proteomu mutantů byly predikovány pomocí ELM (Eukaryotic Linear motif) databáze na základě vložených sekvencí proteinů (Gould et al., 2009). Predikce MAPKs-specifických fosforylačních sekvencí v diferenciálním proteomu byla provedena pomocí GPS (Group-based prediction system) 2.1.2. softwaru (Xue et al., 2008).

## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Přehled výsledků proteomické analýzy

Pomocí LC-MS/MS proteomické analýzy bylo v kořenech *mpk4* mutantu identifikováno v průměru 437 proteinů a v kořenech *mpk6* mutantu 444 proteinů.

Výsledkem porovnání proteomu kořenů mutantu *mpk4* s Col-0 bylo 65 proteinů se statisticky významně změněnou abundancí (Tab. P1). V *mpk4* bylo identifikováno 34 proteinů se sníženou abundancí a 31 proteinů, které jsou v *mpk4* mutantovi ve zvýšeném množství. Devět proteinů bylo identifikováno pouze v *mpk4* mutantu, přičemž v divém typu tyto proteiny identifikovány nebyly (Tab. P2) a 24 proteinů bylo detekováno pouze v Col-0. Lze předpokládat, že proteiny které byly identifikovány jenom v jednom vzorku byly v tom druhém pod prahem citlivosti identifikace a mají v mutantu vyšší/nížší abundanci. V případě *mpk6* mutantu bylo detekováno 32 proteinů se změněnou abundancí (Tab. P3). V *mpk6* mutantovi bylo identifikováno 16 proteinů se sníženou abundancí a 16 proteinů se zvýšenou abundancí v porovnání s Col-0. Devatenáct proteinů bylo identifikováno pouze v *mpk6* mutantu, přičemž v divém typu tyto proteiny identifikovány nebyly (Tab. P4) a 1 protein byl detekován pouze v Col-0.

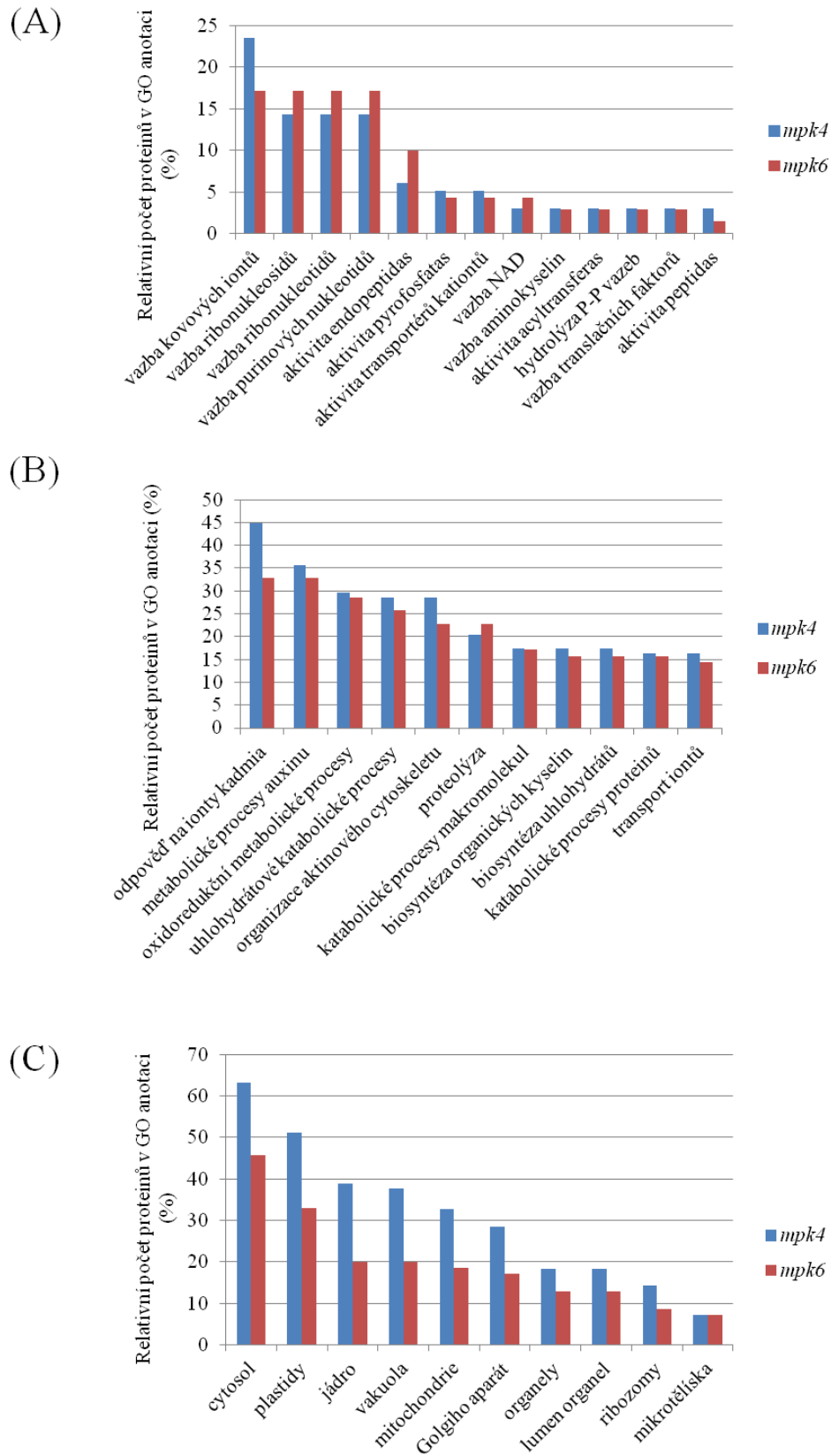
### 4.2 Funkční klasifikace proteinů se změněnou abundancí v *mpk4* a *mpk6* mutantu pomocí Gene ontology anotace

Pomocí tzv. GO anotace jsme zařídili diferenciální proteom mutantů podle 3 kategorií (biologický proces, molekulární funkce a buněčná lokalizace, ve kterém se daný protein nachází). GO anotace přiřazuje proteinu funkci na základě experimentálních dat, homologie s jinými proteiny a predikce. Funkce je proteinu přiřazena v několika úrovních. Vyšší úroveň anotace vždy zahrnuje víc anotací nižší úrovně. V kategoriích biologický proces a molekulární funkce jsme vybrali úroveň 6 a v kategorii buněčný kompartment úroveň 8. Porovnání počtu proteinů, zařazených do GO anotací podle biologického procesu, molekulární funkce a kompartmentu z těchto úrovní u obou mutantů, se nachází na Obr. 8. Z grafu B je patrné, že diferenciální proteom obou mutantů naznačuje změny v regulaci aktinového cytoskeletu, při odpovědi na ionty kadmia a také můžeme vidět malý rozdíl v metabolických procesech týkajících se auxinu a oxidoredukčních metabolických procesů. V grafu C můžeme vidět rozdělení

proteinů diferenciálního proteomu mutantů podle buněčné lokalizace. I zde jsou patrné rozdíly, především u mitochondrií nebo Golgiho aparátu.

V předkládané diplomové práci se budeme soustředit pouze na proteiny důležité pro MAPKs signalizaci, a to proteiny regulující vývojové procesy a stresové odpovědi.

Tyto výsledky naznačují, že v *mpk4* mutantu jsme detekovali víc proteinů se změnou abundancí v kategoriích při odpovědích na ionty kadmia, metabolických procesech spojených s auxinem a organizaci aktinového cytoskeletu, přičemž v *mpk6* mutantu převažovali např. proteiny spojené s proteolýzou a aktivitou endopeptidas.



Obr. 8 Porovnání relativního počtu proteinů v jednotlivých GO anotacích podle (A) – molekulární funkce, (B) – biologického procesu, (C) – lokalizace.

### 4.2.1 Proteiny spojené s vývojovými procesy

Na Obr. 9 můžeme vidět porovnání proteinů zařazených do kategorií spojených s vývojovými procesy. Z grafu vyplývá, že k největším rozdílům mezi oběma mutanty dochází při vývoji orgánů, kořenového systému, výhonku a pylové láčky. Množství proteinů účastnících se těchto procesů, je vyšší v *mpk6* mutantu.

Cytoskeletální proteiny jsou také důležité pro mnoho vývojových procesů. Tab. 8 obsahuje diferenciálně abundantní proteiny detekované v kořenech mutantů *mpk4* důležité pro regulaci cytoskeletu. Stejná data jsou uvedena v Tab. 9, ale pro *mpk6* mutantu.

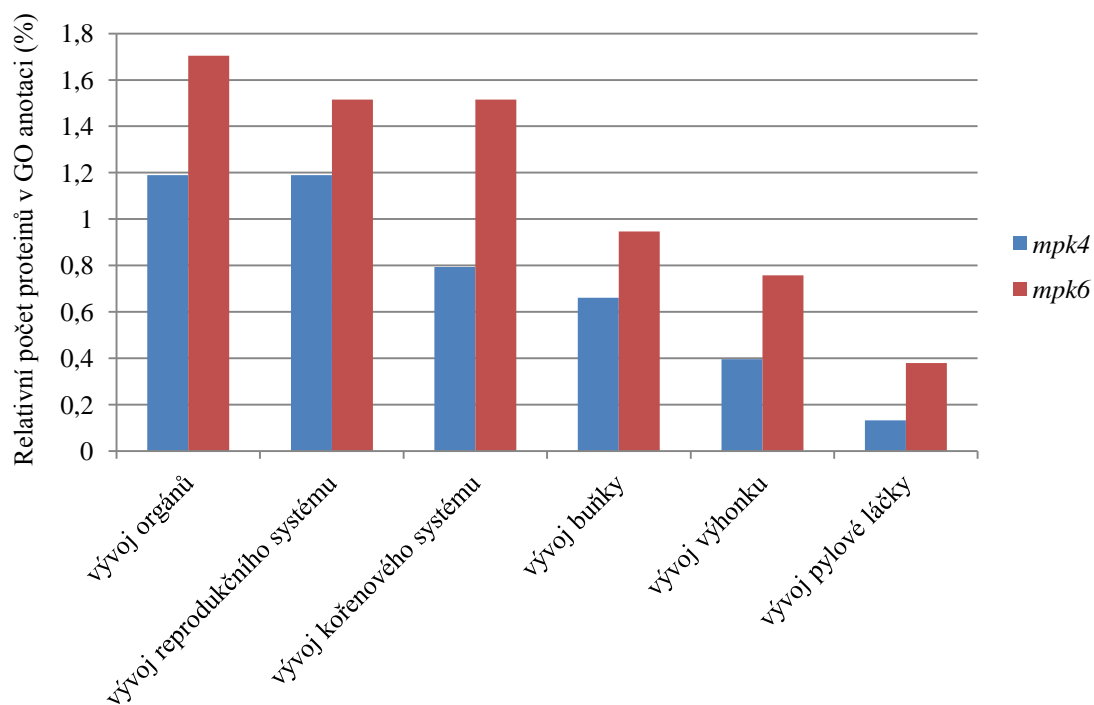
Z tabulek vyplývá, že chybějící MPK4 u *mpk4* mutantu způsobila sníženou abundanci proteinů aktinového cytoskeletu, kromě annexinu 1, kde byla detekována zvýšená abundance. Chybějící MPK6 u *mpk6* mutantu zvýšenou abundanci především proteinů mikrotubulárního cytoskeletu.

Tab. 8 Diferenciálně abundantní cytoskeletální proteiny detekované v kořenech *mpk4* mutantu

Kód proteinu	Název proteinu	Změna abundance
gi15233538	profilin 2	0,25
gi30686836	dehydrin ERD10	0,32
gi15224838	profilin 1	0,36
gi15220216	annexin 1	4,41

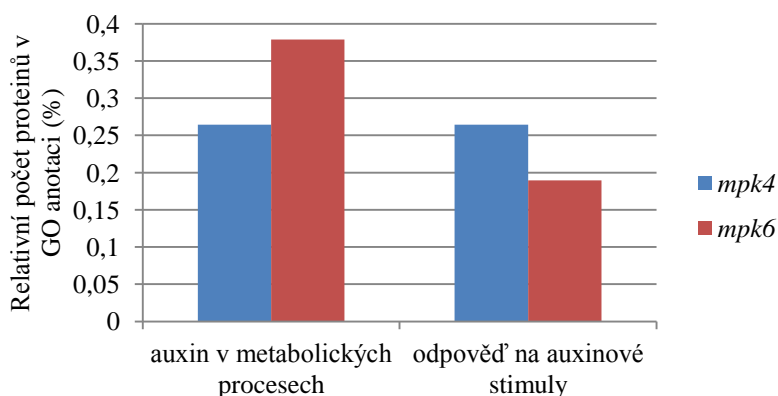
Tab. 9 Diferenciálně abundantní cytoskeletální proteiny detekované v kořenech *mpk6* mutantu

Kód proteinu	Název proteinu	Změna abundance
gi15233538	profilin 2	0,21
gi15241179	tubulin alpha-5	2,9
gi30683070	tubulin alpha-6	5,01
gi15242516	actin 7	5,81
gi15222075	actin 8	pouze v <i>mpk6</i>
gi15232671	phospholipase D alpha 1	pouze v <i>mpk6</i>
gi15227503	Actin-like ATPase superfamily protein	pouze v <i>mpk6</i>



Obr. 9 Množství proteinů hrajících roli ve vývoji jednotlivých částí rostliny v *mpk4* a *mpk6* mutantu.

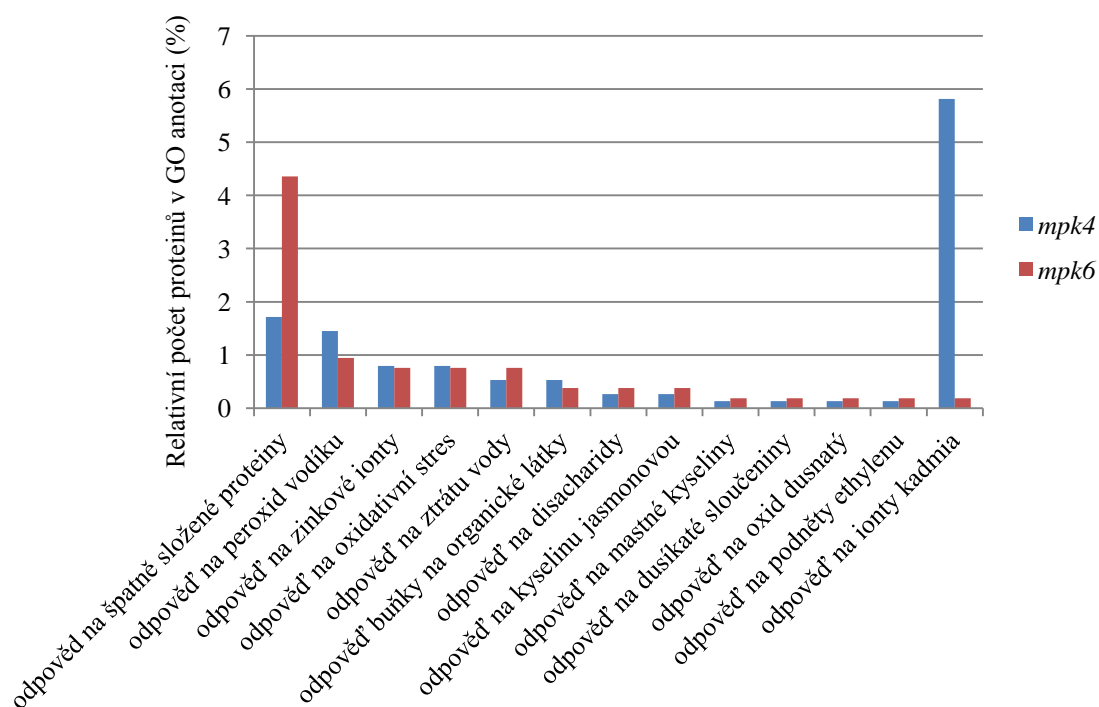
Auxin je rozhodující fytohormon pro různé vývojové procesy. Na Obr. 10 je porovnání proteinů účastnících se procesů, při kterých hraje nezbytnou úlohu auxin. GO anotace ukázala roli proteinů zahrnutých v diferenciálním proteomu obou mutantů v metabolických procesech spojených s auxinem a také při reakcích rostliny na auxinové podněty. V první kategorii je množství proteinů zvýšené u *mpk6* mutantu a v druhé kategorii u *mpk4* mutantu.



Obr. 10 Porovnání proteinů hrajících úlohu v reakcích na auxin v *mpk4* a *mpk6* mutantu.

## 4.2.2 Proteiny odpovědi na externí stimuly

Na Obr. 11 můžeme vidět porovnání GO anotací spojených s reakcemi na různé stresové podmínky a stimuly. Z grafu vyplývá, že k největším rozdílům mezi oběma mutanty dochází při skládání proteinů, odpovědích na peroxid vodíku a ionty kadmia. Proteiny funkčně anotované jako důležité pro odpověď na peroxid vodíku a ionty kadmia byly více zastoupené v *mpk4* mutantovi, naopak v *mpk6* mutantovi je více proteinů zastoupeno při odpovědi na špatně složené proteiny.



Obr. 11 Porovnání proteinů hrajících úlohu ve stresových reakcích v *mpk4* a *mpk6* mutantu.

## 4.3 Predikce proteinů fosforylovaných MPK4 a MPK6

Diferenciální proteom mutantů MAPK může také obsahovat proteiny, které jsou přímo fosforylovány danou MAPK. Ty obsahují ve své aminokyselinové sekvenci MAPK-specifické fosforylační místo a také MAPK specifickou kotvící sekvenci (Jonak et al., 2002). Pro predikci proteinů fosforylovaných MAP kinasami jsme provedli predikci těchto dvou parametrů pomocí ELM source (Eukaryotic Linear Motif, Dinkel et al., 2011) a softwaru GPS 3.0 (<http://gps.biocuckoo.org>, Liu et al., 2015). Predikované proteiny a příslušné aminokyselinové sekvence jsou uvedeny v Tab. 10 a Tab. 11. V *mpk4* mutantovi bylo predikováno 15 možných proteinů se specifickým

fosforylačním místem a kotvící doménou. V případě *mpk6* mutanta bylo takových proteinů predikováno 8.



Tab. 10 Seznam proteinů se specifickým fosforylačním místem a kotvicí doménou v *mpk4* mutantu

Kód proteinu	Název proteinu	Sekvence fosfopetidů	Kotvicí sekvence	Změna abundance
gi 145324054	arabinogalactan protein 31	EVNHKTQTPSLAPAP HPHPPAKSPVKPPVK PPVKAPVSPPAKPPV PPVKPPVSPPAKPPV APVKPPVSPTKPPV PPTKPPVTPPVYPPK	KFNRSLVAV, 180-188 [A] KKLGKSTVVV, 285-294 [A] KLGKSTVVV, 286-294 [A]	pouze v divém typu
gi 15226573	Ferredoxin--nitrite reductase	SFSLTFTSPLLSSS	KPKRSVLV, 19-26 [A] KIEREPMKL, 74-82 [A] KSSKDDIDVRL, 103-113 [A] RKWNVCV, 246-252 [A] KDGRFGFNLLV, 274-284 [A] KRCEEAIP, 291-299 [A] RQKTRMMWL, 328-336 [A] KKGVRVTELVPL, 554-565 [A] KGVVTELVPL, 555-565 [A]	pouze v divém typu
gi 15233349	aconitate hydratase 1	RATIANMSPEYGATM YFKGMTMSPPGPHGV	RIDKLPYSIRI, 35-45 [A] KRPHDRVPL, 378-386 [A] KKACDLGL, 458-465 [A]	pouze v divém typu
gi 18400212	dihydrolipoamide acetyltransferase, long form protein	TTSTKLSSPMAGPKL EIGMPSLSPTMTEGN	RRDHAVAV, 20-27 [A]	pouze v divém typu
gi 22331076	Subtilase family protein	PLLLCFFSPSSSSSD LLRSLPSSPQPATLL HGFSARLSPIQTAAL REIHTTHTPAFLGFS LGTLIGSPSPRVA LIGSPSPRVAAFS ANVEIDVSPSKLAFS	RRHPSVISV, 93-101 [A]	pouze v divém typu
gi 240254562	uncharacterized protein	SSSGNVTTPTQTAST	KSRDIDLSF, 1264-1272 [A]	pouze v divém typu

Tab. 11 Seznam proteinů se specifickým fosforylačním místem a kotvicí doménou v *mpk4* mutantu (*pokračování*)

Kód proteinu	Název proteinu	Sekvence fosfopetidů	Kotvicí sekvence	Změna abundance
gi 30682607	mRNA decapping complex VCS	PGISAQPSPVTQQQ TPPLNLQSPRSNHNP TLPQLPLSPRLSSKL	RKAQPLVVL, 352-360 [A] KESKRLEVAL, 918-927 [A] KRLEVAL, 921-927 [A]	pouze v divém typu
gi 15221019	GDSL esterase/lipase	ITVAGQNSPVVALFT KFSDDLITPDFLAKF REFWVPPTPATVHAS	KFMKIPLAI, 88-96 [A]	5,48
gi 15232603	60S acidic ribosomal protein P0-2	KGTVEIITPVELIKQ YDNGSVFSPEVLDLT	RKGLRGDSVVL, 44-54 [A] KGLRGDSVVL, 45-54 [A] KINKGTVEI, 148-156 [A]	4,61
gi 186513287	argininosuccinate synthase	ALNGKALSPATLLAE	RGKLLKVVVL, 93-101 [A] KKHNVPVPV, 255-263 [A] KKDMYMMSV, 293-301 [A] KLYKGSVSV, 393-401 [A]	3,63
gi 15240765	voltage dependent anion channel 2	DITATLGSPVISFGA	KHPRFGLSLAL, 264-274 [A]	2,41
gi 334185190	heat shock protein 70-3	DLLLLDVTPLSLGLE	RARFEELNI, 305-313 [A] RIPKVQQLLV, 348-357 [A]	0,57
gi 14532542	proteasome subunit alpha type-5-A	AVEKRITSPLEPSS	KTKEGVVLAV, 41-50 [A]	0,32
gi 30691626	heat shock protein 70-1	GTSGTEQTPEAEFEE	KRSDNIDL, 289-296 [A] KKQLIDL, 573-579 [A]	0,32
gi 30696056	elongation factor EF-2	EEMQRPGTPLYNIKA KGLKEAMTPLSEFED	KRLAKSDPMVV, 509-519 [A] RLAKSDPMVV, 510-519 [A]	0,08

Tab. 12 Seznam proteinů se specifickým fosforylačním místem a kotvicí doménou v *mpk6* mutantu

Kód proteinu	Název proteinu	Sekvence fosfopeptidů	Kotvicí sekvence	Změna abundance
gi 15230005	regulatory particle triple-A ATPase 5A	*****MATPMVEDTS	RKGKCVVL, 102-109 [A] KERFEKLGV, 194-202 [A]	pouze v <i>mpk6</i>
gi 15232671	phospholipase D alpha 1	AAAGFPESPEAAAEA	RRPKPGGDVTI, 244-254 [A] RPKPGGDVTI, 245-254 [A] KKKASEGVRV, 259-268 [A] KKASEGVRV, 260-268 [A] KLRDLSDIII, 439-448 [A] RRAKDFIYV, 511-519 [A] RAKDFIYV, 512-519 [A] KGEKFRVYVVV, 561-571 [A] KFRVYVVV, 564-571 [A]	pouze v <i>mpk6</i>
gi 15232776	cell division control protein 48-A	*****MSTPAESSDS	RKKSPNRLVV, 23-32 [A] KKSPNRLVV, 24-32 [A] KVVRSNLRVRL, 90-100 [A] RVRLGDVISV, 97-106 [A] RPVRKGDLFL, 148-157 [A] RKGDLFL, 151-157 [A] KSKRAHVIV, 339-346 [A] RRFGRFDREIDI, 361-372 [A] RFGRFDREIDI, 362-372 [A] RFDREIDIGV, 365-374 [A] KNMKLAEDVDL, 389-399 [A] REKMDVIDL, 427-435 [A]	pouze v <i>mpk6</i>

Tab. 13 Seznam proteinů se specifickým fosforylačním místem a kotvicí doménou v *mpk6* mutantu (*pokračování*)

<b>gi 15233111</b>	cysteine synthase C1	AYDLLDSTPDAFMCQ	KRDASLLI, 50-57 [A] KSKNPNVKI, 238-246 [A] KGKLIVTI, 331-338 [A]	pouze v <i>mpk6</i>
<b>gi 334186086</b>	ketol-acid reductoisomerase	APSLSCPSPTSSSKT GWSVALGSPFTFATT	KKEKVSL, 88-94 [A]	3,44
<b>gi 334185190</b>	heat shock protein 70-3	DLLLLDVTPSLGLE	RARFEELNI, 305-313 [A] RIPKVQQLLV, 348-357 [A]	3,15
<b>gi 145324054</b>	arabinogalactan protein 31	EVNHKTQTPSLAPAP HPHPPAKSPVKPPVK PPVKAPVSPPAKPPV PPVKPPVSPPAKPPV APVKPPVSPTKPPV PPTKPPVTPPVYPPK	KFNRSLVAV, 180-188 [A] KKLGKSTVVV, 285-294 [A] KLGKSTVVV, 286-294 [A]	0,64
<b>gi 15221156</b>	pyrophosphate--fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase subunit beta 1	RDLTAVGSPENAPAK	KKAMVEL, 512-518 [A]	0,08

Tyto proteomické výsledky ukázaly významné rozdíly mezi mutanty především v cytoskeletálních a stresových proteinech. Analýza pomocí GO anotace naznačila významnější rozdíly v proteinech souvisejících s auxinovým metabolismem. Z těchto důvodů jsme se rozhodli některé významné cytoskeletální proteiny validovat pomocí imunoblotování za použití specifických protilátek. Pro zjištění, zda porušení aktinového cytoskeletu může vést k ovlivnění aktivity MPK4 a MPK6, jsme použili PHOSTAG technologii. Ze stresových proteinů jsme pomocí nativní polyakrylamidové (PAGE) elektroforézy detekovali specifickou aktivitu tří nejvýznamnějších antioxidačních enzymů. Rozdíly v proteinech spojených s auxinem jsme validovaly pomocí monitorování změn fenotypového projevu kořene *mpk4* a *mpk6* mutantů v porovnání s divým typem po působení auxinu a auxinolu.

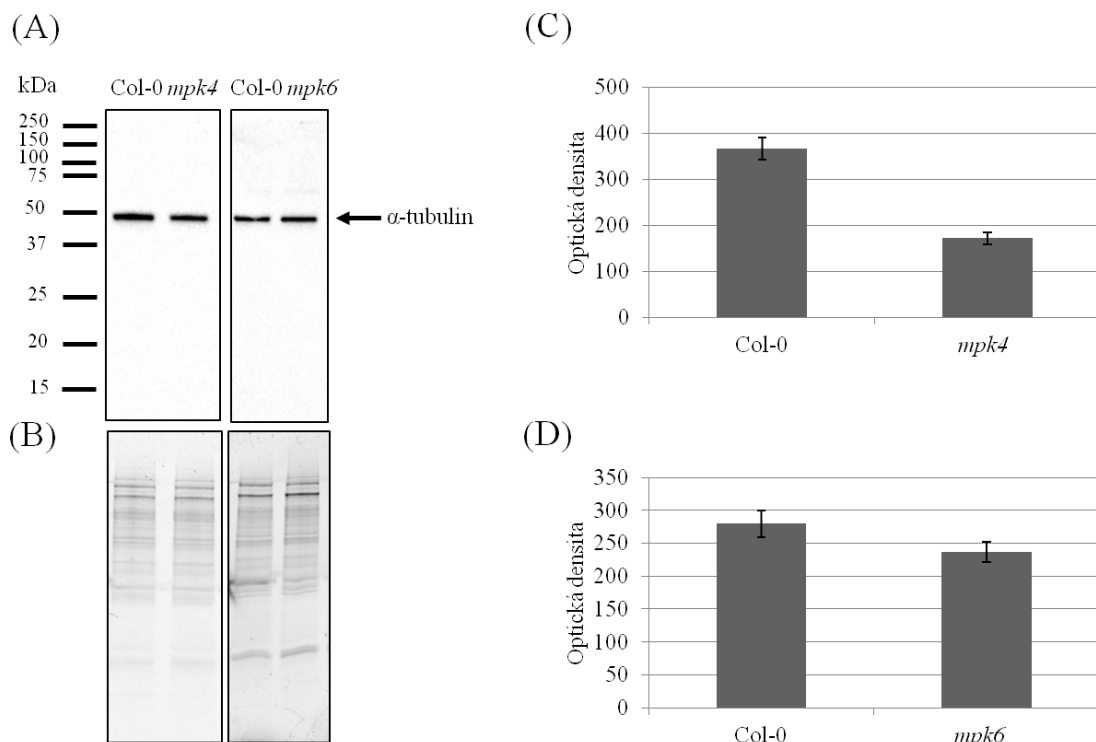
#### **4.4 Validace proteomických dat**

Validace proteomických dat nezávislými metodami je důležitá pro potvrzení výsledků proteomické analýzy. Na základě provedené proteomické analýzy proteomů *mpk4* a *mpk6* byly validovány cytoskeletální proteiny  $\alpha$ -tubulin,  $\beta$ -tubulin, profilin 1, profilin 2 a aktin pomocí imunoblotování za použití specifických protilátek.

##### **4.4.1 Cytoskeletální proteiny**

###### **4.4.1.1 Detekce abundance $\alpha$ -tubulinu**

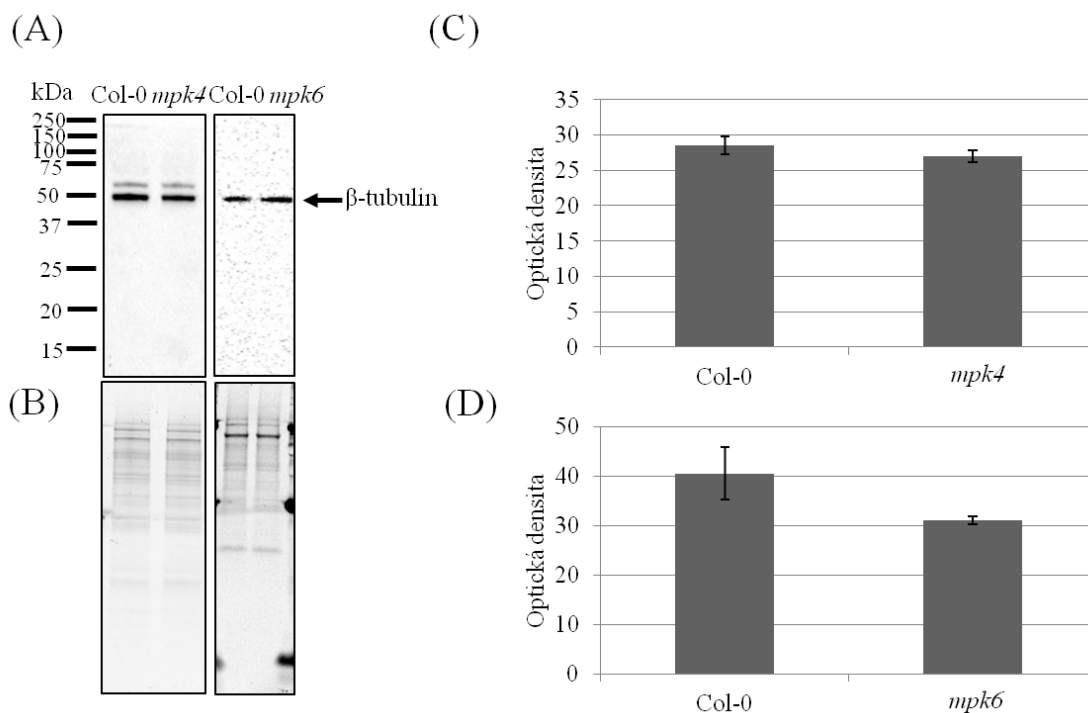
Proteomická analýza ukázala zvýšenou abundanci alfa-tubulinu 5 a 6 pouze v *mpk6* mutantu, ale pro porovnání obou abundancí jsme se rozhodli stanovit alfa-tubulin také v *mpk4* mutantu. Výsledky provedené imunoblotové analýzy v tomto případě nepotvrdily výsledky proteomické analýzy, protože anti-alfa-tubulinová protilátka detekuje více izoform . Imunoblotová analýza abundance alfa-tubulinu v mutantech *mpk4* a *mpk6* a divém typu ukázala, že  $\alpha$ -tubulin má v kořenech obou mutantů sníženou abundanci v porovnání s Col-0 (Obr. 12).



Obr. 12 (A) Imunoblotová detekce abundance  $\alpha$ -tubulinu v kořenech *mpk4* a *mpk6* mutantu a divého typu *Col-0*, (B) kontrola množství nanesených proteinů, (C) kvantifikace optické density pásu  $\alpha$ -tubulinu v *Col-0* a *mpk4* mutantu, (D) kvantifikace optické density pásu  $\alpha$ -tubulinu v *Col-0* a *mpk6* mutantu, chybové úsečky představují SD (N=3).

#### 4.4.1.2 Detekce abundance $\beta$ -tubulinu

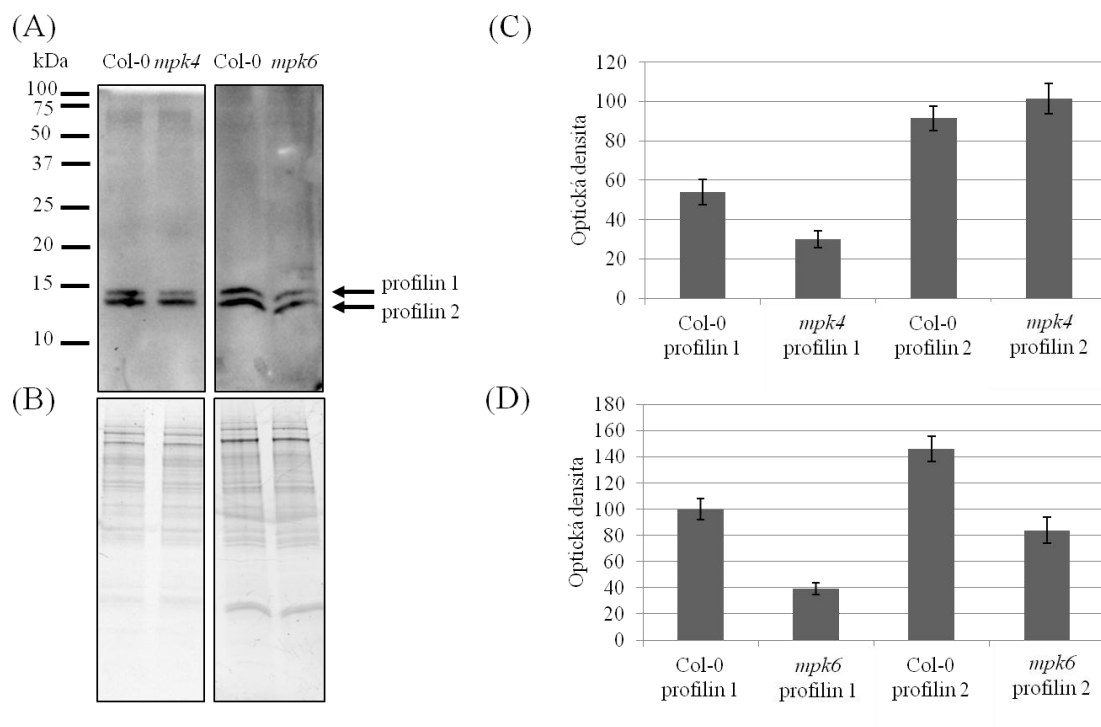
Kromě alfa-tubulinu jsme se rozhodli analyzovat i abundanci beta-tubulinu v kořenech obou mutantů. Imunoblotová analýza abundance beta-tubulinu v mutantech *mpk4* a *mpk6* a divém typu ukázala, že beta-tubulin je ve shodě s alfa-tubulinem v kořenech obou mutantů sníženou abundancí v porovnání s *Col-0* (Obr. 13).



Obr. 13 (A) Imunoblotová detekce abundance  $\beta$ -tubulinu v kořenech *mpk4* a *mpk6* mutantu a divého typu Col-0, (B) kontrola množství nanesených proteinů, (C) kvantifikace optické density pásu  $\beta$ -tubulinu v Col-0 a *mpk4* mutantu, (D) kvantifikace optické density pásu  $\beta$ -tubulinu v Col-0 a *mpk6* mutantu, chybové úsečky představují SD (N=3).

#### 4.4.1.3 Detekce abundance profilinu 1 a profilinu 2

Specifická protilátka anti-profilin, klon 2B8 (Sigma Aldrich) rozpoznává 3 izoformy profilinu PRF1 (14,2 kDa), PRF2 (13,8 kDa) a PRF3 (18,2 kDa). PRF3 má v kořenech zanedbatelné zastoupení (Kandasamy et al., 2002). Imunoblotová analýza kořenů *Arabidopsis*, pomocí anti-profilinové protilátky, ukázala přítomnost 2 pásů s molekulovou hmotností, která odpovídá profilinu 1 a profilinu 2. Z výsledků imunoblotování vyplývá, že profilin 1 má v kořenech obou mutantů sníženou abundanci v porovnání s Col-0 a profilin 2 má zvýšenou abundanci v *mpk4* mutantu a sníženou abundanci v *mpk6* mutantu (Obr. 14). Uvedené výsledky se částečně shodují s proteomickými daty, přičemž jsme potvrdili sníženou abundanci profilinu 1 u *mpk4* mutantu a profilinu 2 u *mpk6* mutantu. Snížená abundance profilinu 2 u *mpk4* mutantu (proteomické data) se imunoblotováním nepotvrdila.

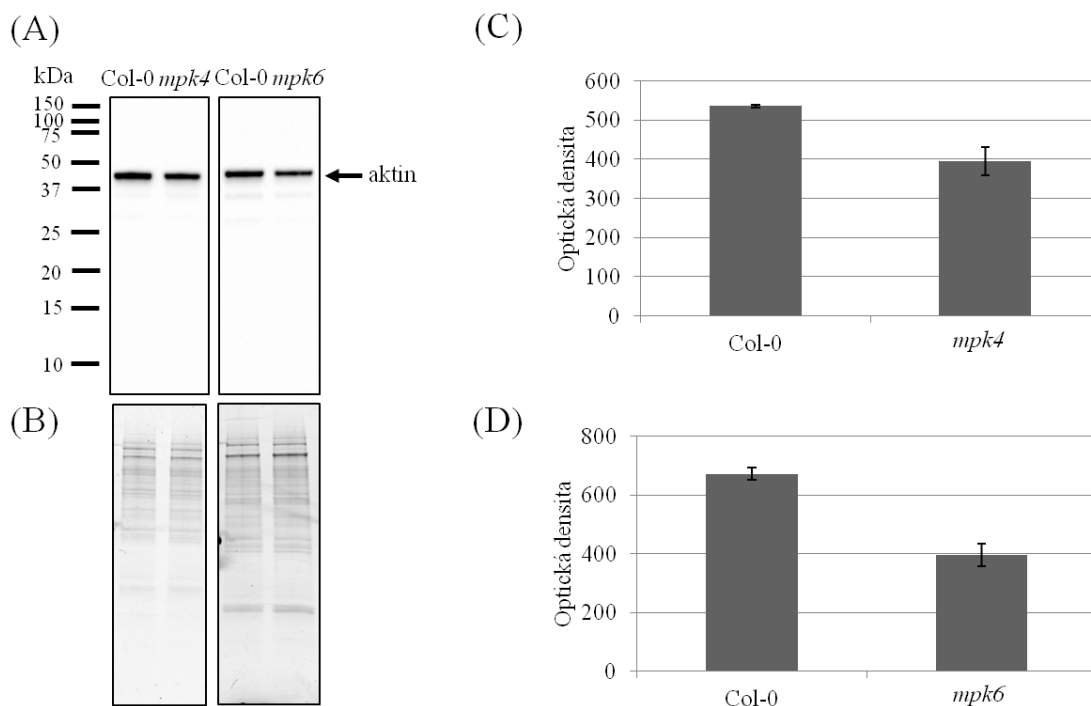


Obr. 14 (A) Imunoblotová detekce abundance profilinu 1 a profilinu 2 v kořenech *mpk4* a *mpk6* mutantu a divého typu Col-0, (B) kontrola množství nanesených proteinů, (C) kvantifikace optické density pásu profilinu 1 a profilinu 2 v Col-0 a *mpk4* mutantu, (D) kvantifikace optické density pásu profilinu 1 a profilinu 2 v Col-0 a *mpk6* mutantu, chybové úsečky představují SD (N=3).

#### 4.4.1.4 Detekce abundance aktinu

Imunoblotová analýza abundance aktinu v mutantech *mpk4* a *mpk6* a divém typu ukázala, že aktin má sníženou abundanci v kořenech obou mutantů v porovnání s Col-0 (Obr. 15). Snížená abundance aktinu nepotvrdila výsledky proteomické analýzy u *mpk6* mutantu. Proteomická analýza ukázala zvýšenou abundanci aktinu 7 a aktin 8 je detekován pouze v *mpk6* mutantu. Je tedy možné, že protilátka detekuje všechny izoformy aktinu než ukázala proteomická analýza.





Obr. 15 (A) Imunoblotová detekce abundance aktinu v kořenech *mpk4* a *mpk6* mutantu a divého typu *Col-0*, (B) kontrola množství nanesených proteinů, (C) kvantifikace optické density pásu aktinu v *Col-0* a *mpk4* mutantu, (D) kvantifikace optické density pásu aktinu v *Col-0* a *mpk6* mutantu, chybové úsečky představují SD (N=3).

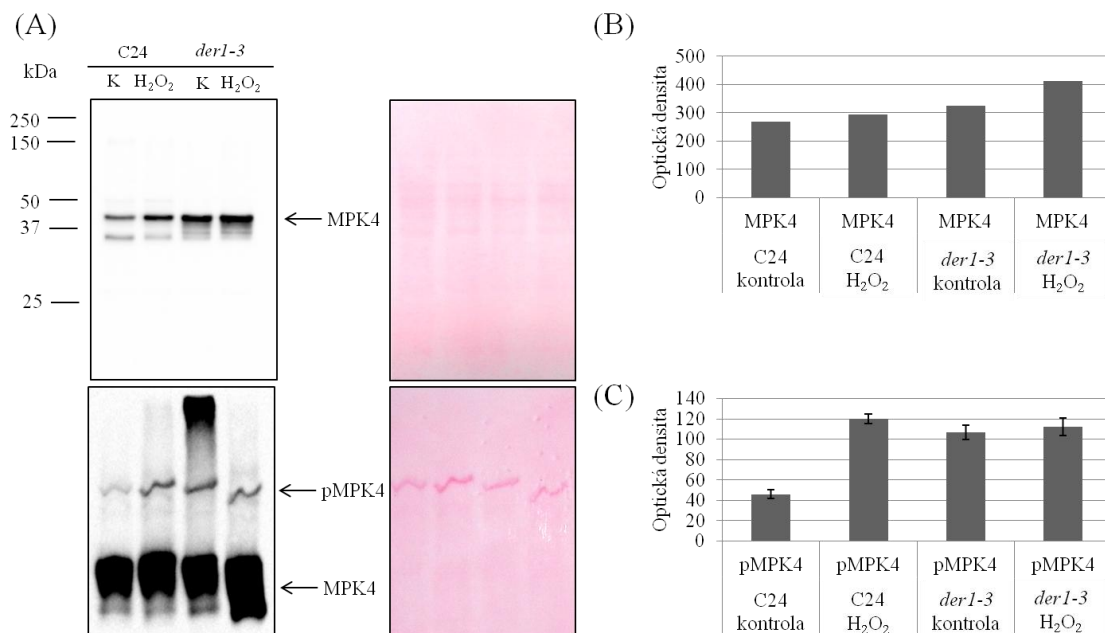
#### 4.4.2 Analýza fosforylované MPK4 a MPK6 v *der1-3* mutantu

Vztah mezi aktinem a MPK4 a MPK6 jsme se rozhodli podrobněji studovat pomocí detekce fosforylace MPK4 a MPK6 v kořenech mutantu *der1-3*, který má nefunkční gen pro AKTIN2. Fosforylaci jsme detekovali pomocí PHOSTAG technologie. Aktivace uvedených MAPK byla provedena 15 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

##### 4.4.2.1 Detekce fosforylované MPK4 v *der1-3* mutantu

Imunoblotová detekce abundance MPK4 ukázala zvýšené množství MPK4 v C24 i *der1-3* mutantu po ovlivnění peroxidem vodíku. Z výsledků je dále patrné, že MPK4 je ve zvýšeném množství v *der1-3* mutantu také za kontrolních podmínek oproti divému typu. Fosforylace MPK4 je v *der1-3* mutantu zvýšená za kontrolních podmínek oproti C24, ale po ovlivnění peroxidem vodíku dochází, oproti C24, ke snížení její fosforylace (Obr. 16).

Můžeme tedy konstatovat, že mutace v genu pro AKTIN2 v *der1-3* mutantu způsobuje zvýšenou abundanci a fosforylaci MPK4, ale inhibuje aktivaci MPK4 po vlivu peroxidu vodíku.

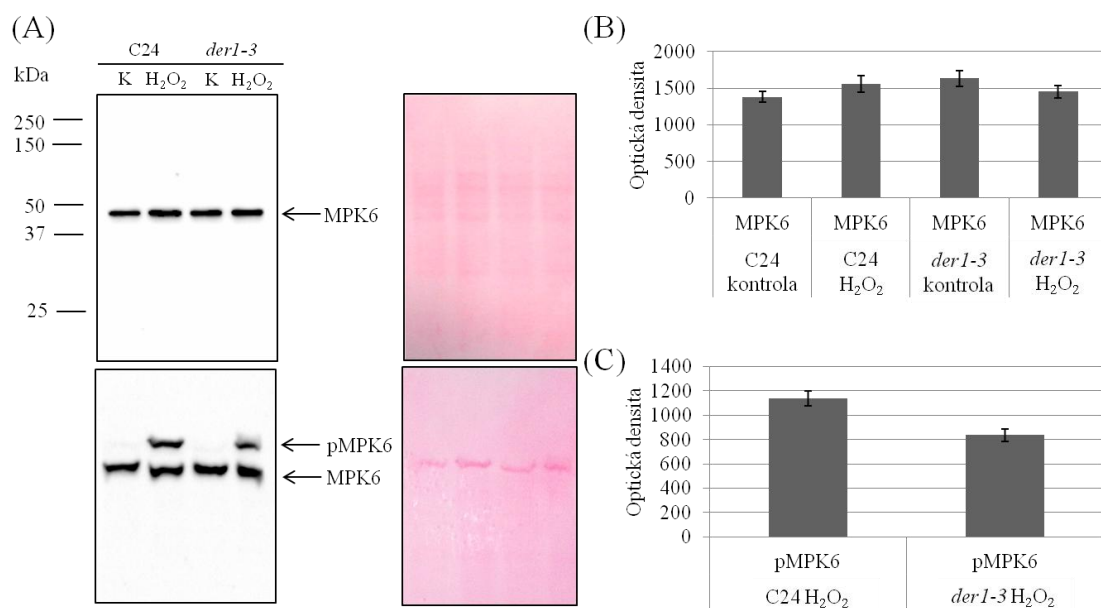


Obr. 16 Abundance a fosforylace MPK4 v *der1-3* mutantu a divém typu po ovlivnění peroxidem vodíku. (A) imunoblot ukazující abundanci MPK4 (vlevo nahoře), detekce fosforylace MPK4 pomocí phostag technologie (vlevo dole), kontrola množství nanesených proteinů pomocí barvení proteinů na membráně s Ponceau -S (vpravo nahoře a dole), (B) graf kvantifikace MPK4, (C) graf kvantifikace fosforylované MPK4. K-kontrola, chybové úsečky představují SD (N=3).

#### 4.4.2.2 Detekce fosforylované MPK6 v *der1-3* mutantu

Imunoblotová detekce abundance MPK6 ukázala zvýšené množství MPK6 v *der1-3* mutantu za kontrolních podmínek, ale po ovlivnění peroxidem vodíku dochází ke snížení abundance. V případě MPK6 byla fosforylace detekována pouze po ovlivnění peroxidem vodíku. V *der1-3* mutantu dochází ke snížení abundance fosforylované MPK6 oproti C24 (Obr. 17).

Z těchto výsledků můžeme konstatovat, že mutace v genu pro AKTIN2 inhibuje aktivaci MPK6 po vlivu peroxidu vodíku.

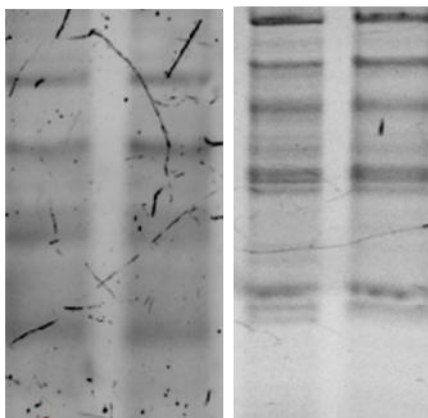


Obr. 17 Abundance a fosforylace MPK6 v *der1-3* mutantu a divém typu po ovlivnění peroxidem vodíku. (A) imunoblot ukazující abundanci MPK6 (vlevo nahoře), detekce fosforylace MPK6 pomocí phostag technologie (vlevo dole), kontrola množství nanesených proteinů pomocí barvení proteinů na membráně s Ponceau -S (vpravo nahoře a dole), (B) graf kvantifikace MPK6, (C) graf kvantifikace fosforylované MPK6. K-kontrola, chybové úsečky představují SD (N=3).

#### 4.4.3 Validace abundance antioxidantních enzymů

Proteomická analýza indikovala rozdíly v abundanci proteinů *mpk4* a *mpk6* důležitých pro odpověď na vliv peroxidu vodíku (např. katalasa 3, L-ascorbate peroxidasa 1). Proto jsme se rozhodli tento rozdíl podrobněji studovat. Provedli jsme proto vizualizaci specifické aktivity antioxidantních enzymů katalasy, MnSOD, FeSOD, CuZnSOD a peroxidasy v kořenech mutantů *mpk4* a *mpk6* na nativních polyakrylamidových gelech. Množství nanesených proteinů jsme ověřili vizualizací proteinů na „Stain free“ gelech (Biorad) (Obr. 18).

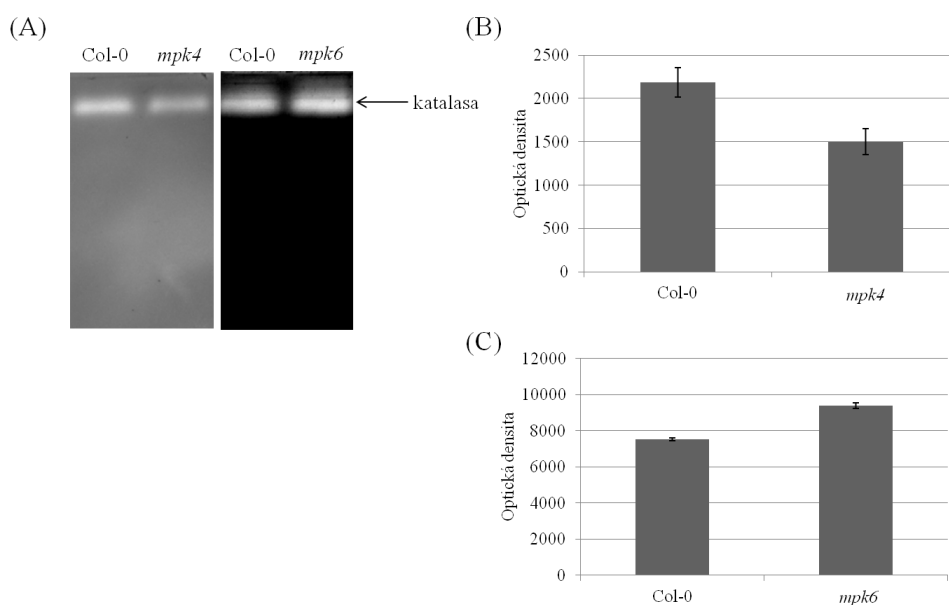
Col-0 *mpk4* Col-0 *mpk6*



Obr. 18 Kontrola množství nanesených proteinů.

#### 4.4.3.1 Detekce specifické aktivity katalasy

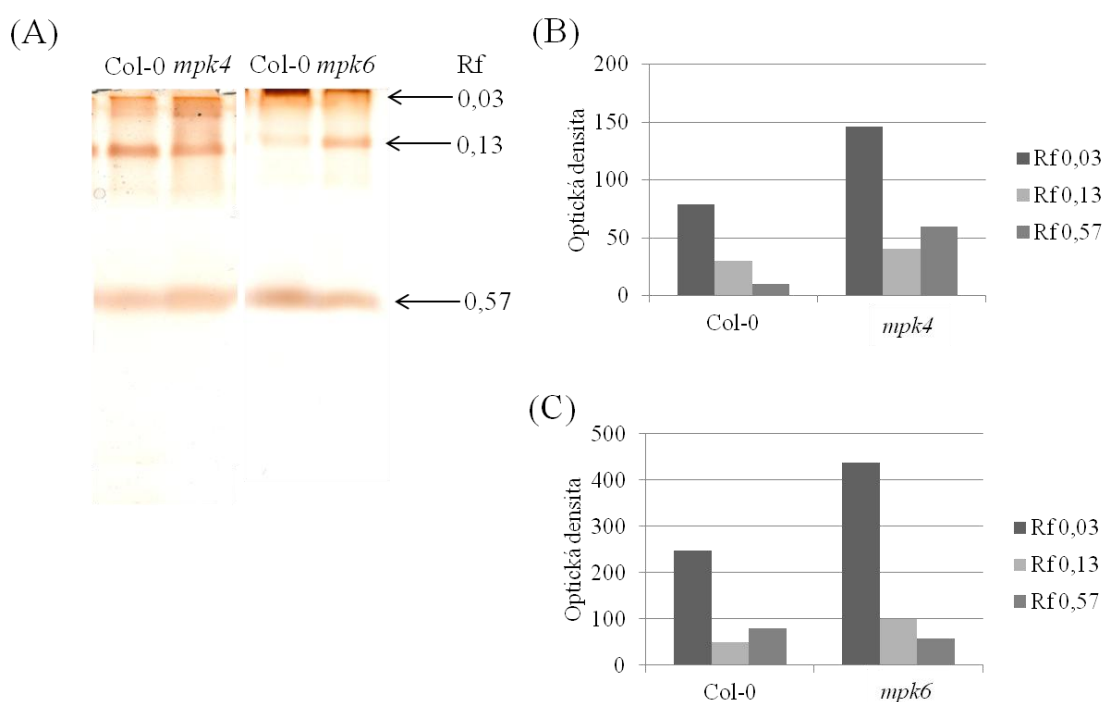
Detekce specifické aktivity katalasy na nativních PAGE gelech ukázala její sníženou aktivitu v kořenech *mpk4* mutantu a zvýšenou aktivitu v kořenech *mpk6* mutantu (Obr. 19) oproti divému typu. Proteomická analýza, na rozdíl od celkové aktivity katalasy, detekovala abundanci pouze 1 izoenzymu katalasy (katalasu 3) a to pouze v *mpk4* mutantu. To zdůvodňuje nesoulad mezi aktivitou katalasy a proteomickými daty. Na základě těchto experimentů jsme zjistily rozdílnou regulaci aktivity katalasy v kořenech *mpk4* a *mpk6* mutantů.



Obr. 19 (A) Vizualizace aktivity katalasy v kořenech *mpk4* a *mpk6* mutantu a divého typu Col-0, (B) kvantifikace pásu katalasy v Col-0 a *mpk4*, (C) kvantifikace pásu katalasy v Col-0 a mutantu *mpk6*, chybové úsečky představují SD (N=3).

#### 4.4.3.2 Detekce specifické aktivity peroxidasy

Detekce specifické aktivity peroxidasy na nativních PAGE gelech ukázala zvýšení všech jejích detekovaných izoenzymů v kořenech *mpk4* mutantu oproti divému typu. U *mpk6* mutantu došlo také ke zvýšení aktivity izoenzymů s retenčním faktorem 0,03 a 0,13. Izoenzym s retenčním faktorem 0,57 měl sníženou specifickou aktivitu (Obr. 20). Proteomická analýza detekovala sníženou abundanci určitých izoenzymů peroxidasy v *mpk4* mutantu, což koreluje se zjištěnou specifickou aktivitou. Podobně jako v případě katalasy, jsme zjistili rozdíl v regulaci některých izoenzymů peroxidasy mezi *mpk6* a *mpk4* mutantem.

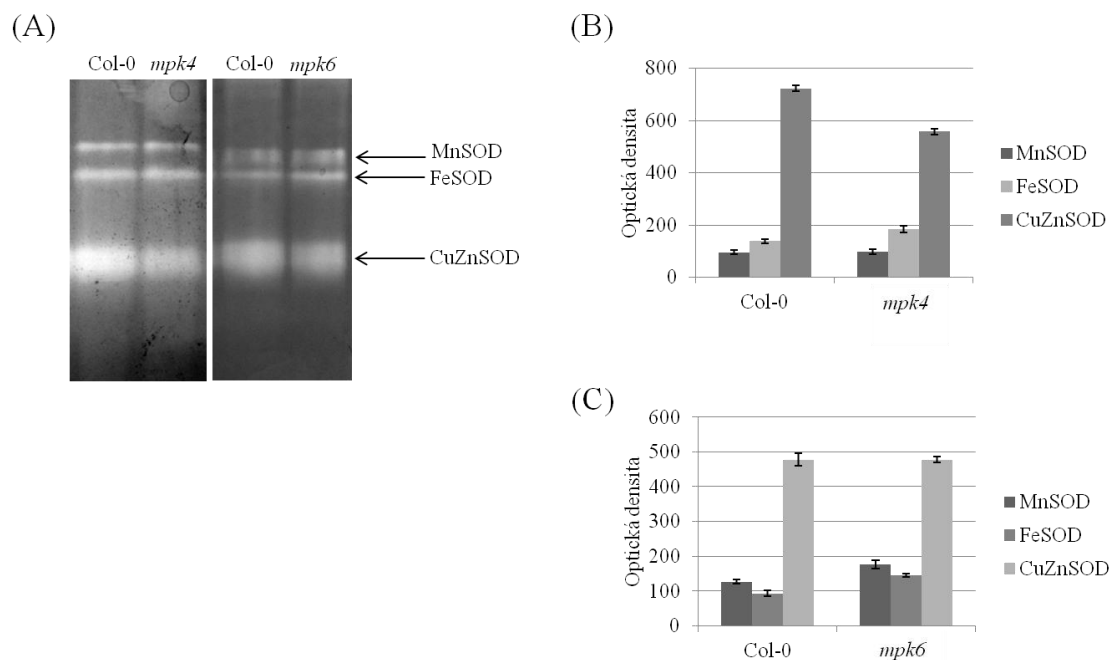


Obr. 20 (A) Vizualizace aktivity izoenzymů peroxidasy v kořenech *mpk4* a *mpk6* mutantu a divého typu Col-0, (B) kvantifikace pásů izoenzymů peroxidasy v Col-0 a *mpk4*, (C) kvantifikace pásů izoenzymů peroxidasy v Col-0 a mutantu *mpk6*, chybové úsečky představují SD (N=3).

#### 4.4.3.3 Detekce specifické aktivity MnSOD, FeSOD, Cu/ZnSOD

Superoxiddizmutáza (SOD) je na rozdíl od katalasy a peroxidasy enzym důležitý pro odbourávání superoxidu (Cadenas, 1989). Z důvodu jeho významu pro antioxidační obranu, jsme se rozhodli stanovit i aktivitu SOD. Specifické barvení aktivity SOD na nativních gelech umožňuje detekovat aktivitu všech tří izoform SOD. Zjistili jsme, že

specifická aktivita MnSOD a FeSOD byla u obou mutantů mírně zvýšená v porovnání s Col-0. Aktivita Cu/ZnSOD byla u *mpk4* snížena a u *mpk6* mutantu významnější rozdíl, v porovnání s divým typem, detekován nebyl (Obr. 21).



Obr. 21 (A) Vizualizace aktivity MnSOD, FeSOD a Cu/ZnSOD v kořenech *mpk4* a *mpk6* mutantu a divého typu Col-0, (B) kvantifikace pásů MnSOD, FeSOD a Cu/ZnSOD v Col-0 a *mpk4*, (C) kvantifikace pásů MnSOD, FeSOD a Cu/ZnSOD v a Col-0 a mutantu *mpk6*, chybové úsečky představují SD (N=3).

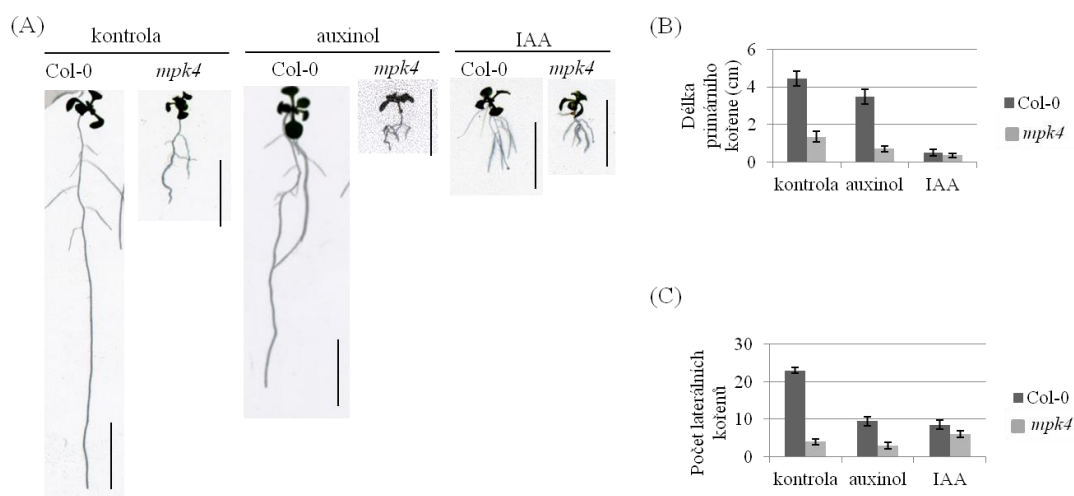
#### 4.4.4 Odpověď *mpk4* a *mpk6* mutantů na působení auxinu a auxinolu

Na základě provedené proteomické analýzy a prokázaných rozdílů mezi proteiny souvisejícími s auxinovým metabolismem, jsme se rozhodli tato data validovat pomocí pozorování kořenového fenotypu po aplikaci exogenního auxinu a auxinolu.

#### 4.4.5 Vliv auxinu a auxinolu na *mpk4* mutantu

K tomuto experimentu byly použity 3-denní semenáčky, které byly přeloženy na ½ MS médium s obsahem 1 μM auxinu (IAA) nebo 10 μM auxinolu. Výsledky jsou zpracovány po 6 denním působení IAA a auxinolu. Auxinol snížil délku primárního kořene u Col-0 a také u *mpk4* mutantu. Inhibice růstu se jeví intenzivnější u *mpk4* mutantu porovnání s Col-0. Auxin zcela úplně zastavil růst primárního kořene u Col-0 a *mpk4* mutantu. Pozorování počtu laterálních kořenů (LK) ukázalo redukci počtu LK u

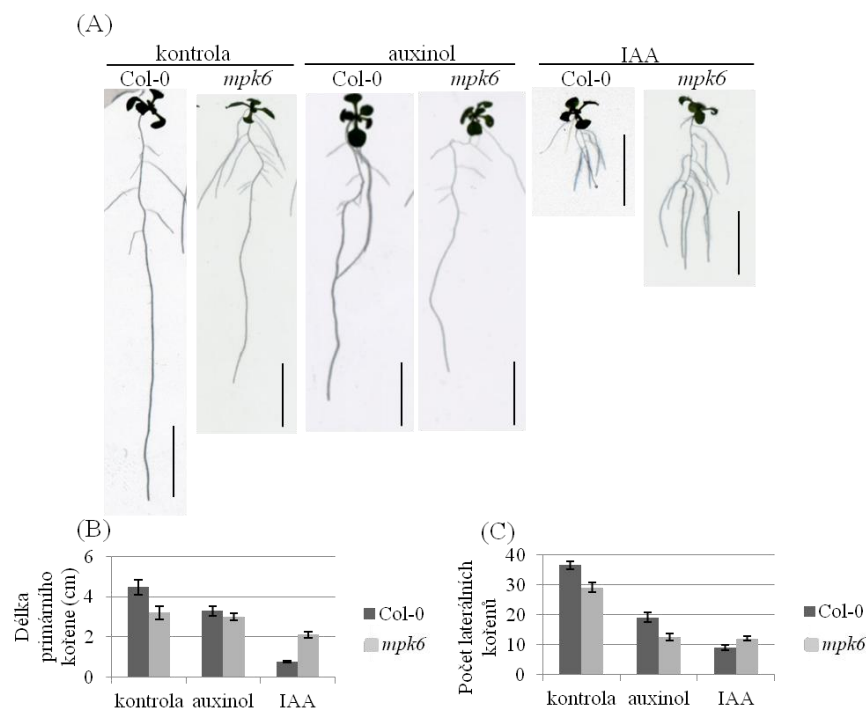
Col-0 po auxinu i auxinolu. Počet LK u mutanta *mpk4* byl snížen po auxinolu, ale po vlivu IAA jsme zaznamenali mírné zvýšení (Obr. 22).



Obr. 22 Fenotypové projevy kořene *mpk4* mutanta po 6 denním působení auxinolu a auxinu. (A) fenotypové projevy Col-0 a *mpk4* mutanta za kontrolních podmínek, po působení auxinolu a IAA, (B) graf kvantifikace délky primárního kořene a (C) graf počtu laterálních kořenů, měřítko – 1 cm, chybové úsečky představují SD, auxinol (N=15), auxin (N=18).

#### 4.4.6 Vliv auxinu a auxinolu na *mpk6* mutanta

K tomuto experimentu byly použity 4-denní semenáčky, které byly přeloženy na ½ MS médium s obsahem 1  $\mu$ M IAA nebo 10  $\mu$ M auxinolu. Výsledky jsou zpracovány po 6 denním působení auxinolu a IAA. Auxinol snížil délku primárního kořene u Col-0 a také nepatrně u *mpk6* mutanta. Inhibice růstu se u *mpk6* mutanta v porovnání s Col-0 příliš neliší. Auxin zcela úplně zastavil růst primárního kořene u Col-0 a *mpk6* mutanta. Pozorování počtu LK ukázalo redukci počtu LK u Col-0 po auxinu i auxinolu. Počet LK se u mutanta *mpk6* po vlivu auxinolu a IAA příliš nemění (Obr. 23).



Obr. 23 Fenotypové projevy *mpk6* mutanta po 6 denním působení auxinolu a auxinu. (A) fenotypové projevy Col-0 a *mpk6* mutanta za kontrolních podmínek, po působení auxinolu a IAA, (B) graf kvantifikace délky primárního kořene a (C) graf hustoty laterálních kořenů, měřítko – 1 cm, chybové úsečky SD, auxinol (N=15), auxin (N=18).

Provedené experimenty ukazují větší změny, po vlivu IAA a auxinolu, v délce primárního kořene a také v počtu laterálních kořenů u *mpk4* mutanta. V případě *mpk6* mutanta dochází k výraznějším změnám pouze u množství laterálních kořenů. Tyto výsledky ukazují na vyšší citlivost *mpk4* na působení auxinu a mohou naznačovat poškození cytoskeletu.



## 5 DISKUZE

Zpracovaná data proteomické analýzy mutantů *mpk4* a *mpk6* potvrdila výsledky nedávno publikované transkriptomické analýzy mutantů MAPKs (Frei dit Frey et al., 2014) a ukázala na několik významných proteinů a možných souvislostí s fenotypy obou mutantů nebo jejich odolností při různých stresových reakcích.

Proteomická analýza ukázala změnu v několika proteinech regulující aktinový cytoskelet (profilin 1, profilin 2, dehydrin ARD10 a annexinu 1 v případě *mpk4* mutantu a aktinu 7, aktinu 8, profilinu 2 a superrodiny proteinů aktinových ATPas (Actin-like ATPase superfamily protein) v případě *mpk6* mutantu). Trendy těchto proteinů byly odlišné u *mpk4* a *mpk6* mutantu, což může naznačovat poškození aktinového cytoskeletu, ale jeho regulace může být odlišná. Toto tvrzení mohou potvrdit i fenotypové znaky mutantů (Beck et al, 2010, Müller et al, 2010). Například růst kořenových vlásků je silně podmíněn specifickou organizací aktinového cytoskeletu (Baluška et al., 2000) a je postižen u *mpk4* mutantu (Beck et al., 2010). Regulaci aktinu při tvorbě kořenových vlásků, kromě jiných proteinů a molekul, zabezpečuje profilin, což bylo demonstrováno na mutantu *Arabidopsis prf1-1*, kde bylo zaznamenáno jejich zvýšené množství (McKinney et al., 2001). Snížená hladina obou izoform profilinu (profilin 1 a profilin 2) v *mpk4* mutantu může potvrdit roli profilinu na defektech v růstu kořenových vlásků u *mpk4* mutantu. Mezi další proteiny interagující s aktinem patří dehydrin ERD10 a annexin 1. Dehydrin ERD10 chrání aktinová vlákna před jejich depolymerizací (Abu-Abied et al., 2006) a annexin 1 je nezbytný pro organizaci a stabilizaci aktinového cytoskeletu v různých membránových doménách (Hu et al., 2000). V *mpk4* mutantu byl dehydrin ERD10 detekován ve sníženém množství naopak annexin 1 ve zvýšeném množství. Vzhledem k roli dvou zmíněných proteinů v regulaci aktinového cytoskeletu, je možné, že dochází k postižení aktinového cytoskeletu u *mpk4* mutantu v jeho polymerizaci. Tato regulace musí být ale experimentálně potvrzena. V rámci zjištění zda aktinový cytoskelet může ovlivnit funkci MPK4 a MPK6, jsme použili *der1-3* mutantu, který má nefunkční gen pro AKTIN2 (Ringli et al., 2002). Výsledky ukázaly, že dochází ke zvýšené abundanci MPK4 a MPK6 v *der1-3* mutantu oproti divému typu. Z toho můžeme usuzovat vliv aktinového cytoskeletu na funkci obou MAPKs.

Důležitým proteinem, který se účastní regulace cytoskeletu je phospholipasa D alfa 1 (PLDa1). Tento enzym katalyzuje produkci kyseliny fosfatidové (PA), která je důležitou součástí membrán a také fyzicky interaguje s MAP65-1 v odpovědi na solný stres, kde stabilizuje mikrotubuly (Zhang et al., 2012). PLDa1 byl detekován pouze v *mpk6* mutantu, což naznačuje jeho zvýšenou abundanci oproti kontrole. Můžeme předpokládat zvýšenou akumulaci PA u mutantu a vyšší stabilitu mikrotubulů. Vyšší stabilita mikrotubulů však vede ke snížení jejich dynamiky (Baskin et al, 1994). Díky změněné regulaci MAP65-1 proteinu pomocí zvýšené produkce kyseliny fosfatidové může docházet ke změnám v regulaci mikrotubulů v *mpk6* mutantu. To je v souladu i se sníženou abundancí dvou mikrotubulárních proteinů - alfa tubulinem 5 a 6. Naše výsledky potvrzují poškozenou organizaci mikrotubulů v *mpk6* mutantu (Müller et al, 2011). Naše výsledky indikují možné propojení regulace organizace mikrotubulů pomocí MPK6 s fosfolipasou D.

Z hlediska fenotypových efektů PLDa 1, Lanteri et al., 2008 dokázali zvýšenou tvorbu adventivních kořenů v odpovědi na zvýšenou tvorbu PA během exogenní aplikace auxinu a oxidu dusného. Můžeme předpokládat, že díky přítomnosti PLDa1 v *mpk6* mutantu dochází k tvorbě kyseliny fosfatidové a tedy k tvorbě adventivních kořenů. Predikce fosforylačních míst ukázala PLDa1 jako jeden z možných cílů MPK6.

Podobně jako cytoskelet, auxin hraje rozhodující roli ve vývoji rostlin a hlavně kořenového systému (Estelle et al., 2004). Proteomická analýza ukázala rozdíl u obou mutantů v proteinech spojených s auxinem a také při odpovědi na auxinové stimuly. Auxin je rostlinný hormon, který hraje důležitou úlohu při buněčném dělení (Okushima et al., 2005). Mezi hlavní účinky auxinu patří redukovaná délka primárního kořene (Rahman et al., 2007). Podobně IAA inhiboval primární růst také u divého typu a obou mutantů v našich experimentech, přičemž růst primárního kořene byl inhibován méně v porovnání s *mpk4* mutantem. Tento rozdíl může souviset s příjmem auxinu nebo může dojít k inaktivaci signální dráhy skrze TIR1 receptor v *mpk6* mutantu (Woodward et al., 2005). Pro potvrzení souvislosti fenotypu s inaktivací TIR1 receptoru byl použit auxinol (Smékalová et al., 2014), který se kompetitivně váže na TIR1 receptor a brání vazbě s IAA. Podobně jako auxin, auxinol způsobuje inhibici růstu primárního kořene *Arabidopsis* (Smékalová et al, 2014). Růst primární kořene mutantu *mpk6* byl méně inhibován než u mutantu *mpk4*. To může indikovat již zmíněnou inhibici TIR1

receptoru u *mpk6* mutantu, což je nutné potvrdit dalšími experimenty. Pomocí aplikace IAA a auxinolu se nám podařilo potvrdit možnou regulaci auxinové signalizace pomocí MPK6.

Další výsledek proteomické analýzy ukázal možné rozdíly mezi MPK4 a MPK6 v regulaci antioxidantních enzymů, protože v *mpk4* mutantu bylo postiženo víc proteinů důležitých pro antioxidantní obranu v porovnání s mutantem *mpk6*.

Katalasa je enzym významně se podílející na odbourávání peroxidu vodíku (Mhamdi et al., 2010). Proteomickou analýzou byla zjištěna nižší abundance izoformy katalasy 3 v *mpk4* mutantu v porovnání s divým typem. Naopak analýza celkové aktivity katalasy v *mpk4* ukázala nižší aktivitu v porovnání s Col-0. Expresní data ukazují, že isoforma *CAT3* (katalasa 3) je spolu s *CAT1* exprimována v kořenech jenom málo, přičemž nejvyšší expresi ukazuje isoforma *CAT2* (Mhamdi et al., 2010). Proto soudíme, že katalasa 3 tvoří jenom menší část celkové katalasové aktivity v kořenu *Arabidopsis*. To může vysvětlovat nesoulad mezi proteomickými a biochemickými analýzami. Aktivita katalázy byla naopak v mutantu *mpk6* vyšší v porovnání s Col-0.

Jak bylo zmíněno v dřívějších kapitolách, MPK4 a MPK6 jsou aktivovány oxidačním stresem, ale v rozdílných signálních drahách. Zatímco MPK4 je aktivována pomocí kyslíkových radikálů, které aktivují MAPKKK (MEKK1) a poté dochází k aktivaci MAPKK (MKK1/MKK2; Pitzschke et al., 2009), MPK6 je také aktivována kyslíkovými radikály nebo kyselinou abscisovou, ale přes ANP proteiny (MAPKKK; Kovtun et al, 2000). O důležitosti MPK4 v oxidativním stresu svědčí několik studií. Např. Nakagami et al., 2006 identifikovali MPK4 jako cíl MAP kinasy kinasy kinasy MEKK1 a také zvýšenou hladinu kyslíkových radikálů v *mpk4* mutantu.

Kromě katalasy jsme zjistili také rozdíly v izoenzymovém složení peroxidas, což jsou také důležité enzymy pro detoxifikaci peroxidu vodíku. Rozdílné signální dráhy pro MPK4 a MPK6 v odpovědi na oxidační stres patrně vedou i k odlišné regulaci katalasy a peroxidas v *mpk4* a *mpk6* mutantech. Doposud byla publikována role MPK6 v expresi katalasy po ovlivnění kyselinou abscisovou (Xing et al. 2008). Naše výsledky indikují regulaci aktivity katalasy také pomocí MPK4, avšak tato regulace se javí jako opačná vůči MPK6.

## 6 ZÁVĚR

V předkládané diplomové práci jsme se zabývali proteomickou analýzou, kterou jsme využili pro charakterizaci a porovnání dvou MAP kinasových mutantů *Arabidopsis*, *mpk4* a *mpk6*, pro identifikaci vybraných cytoskeletálních proteinů a proteinů hrajících roli při stresové odpovědi. Dále jsme se zabývali otázkou, zda poškozený aktinový cytoskelet může ovlivnit regulaci MPK4 a MPK6. Nakonec jsme sledovali změny na kořenech obou mutantů po vlivu auxinu (auxinolu).

Zjistili jsme, že *mpk4* mutant má poškozený aktinový cytoskelet, což se projevuje na jeho již publikovaných fenotypových znacích. Poškození cytoskeletu může ovlivnit funkci MAPKs, jak jsme prokázali na *der1-3* mutantu.

Kromě změn ve vývojových procesech, jsme zjistili rozdíly v antioxidační obraně. Byly zjištěny významné rozdíly aktivit u katalasy a izoenzymů peroxidasy. Z toho vyplývají rozdíly v odbourávání peroxidu vodíku mezi oběma mutanty.

Na základě zpracovaných proteomických dat se nám podařilo objevit nové poznatky týkající se vývojových procesů a antioxidační obrany u obou mutantů. Můžeme tedy říct, že se proteomická analýza ukázala jako úspěšná a může sloužit jako efektivní nástroj pro nacházení dalších souvislostí mezi proteiny a buněčnými procesy.

## 7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Abu-Abied M., Golomb L., Belausov E., Huang S., Geiger B., Kam Z., Geiger B., Kam Z., Staiger Ch. J., Sadot, E. (2006): Identification of plant cytoskeleton-interacting proteins by screening for actin stress fiber association in mammalian fibroblasts. *The Plant Journal* **3**, 367-379.
- An Y. Q., McDowell J. M., Huang S., McKinney E. C., Chambliss S., Meagher R. B. (1996): Strong, constitutive expression of the Arabidopsis ACT2/ACT8 actin subclass in vegetative tissues. *The Plant Journal* **10**, 107-121.
- Ashburner M., Ball C. A., Blake J. A., Botstein D., Butler H., Cherry J. M., Davis A. P., Dolinski K., Dwight S. S., Eppig J. T., Harris M. A., Hill D. P., Issel-Tarver L., Kasarskis A., Lewis S., Matese J. C., Richardson J. E., Ringwald M., Rubin G. M., Sherlock G. (2000): "Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium". *Nature Genetics* **1**, 25–9.
- Baluška F., Salaj J., Mathur J., Braun M., Jasper F., Šamaj J., Chua N. H., Barlow W. P., Volkmann D. (2000): Root hair formation: F-actin-dependent tip growth is initiated by local assembly of profilin-supported F-actin meshworks accumulated within expansin-enriched bulges. *Developmental biology* **2**, 618-632.
- Baskin T. I., Wilson J. E., Cork A., Williamson R. E. (1994): Morphology and Microtubule Organization in Arabidopsis Roots Exposed to Oryzalin or Taxol. *Plant and Cell Physiology* **35**, 935–942.
- Beck M., Komis G., Müller J., Menzel D., Šamaj J. (2010): Arabidopsis Homologs of Nucleus- and Phragmoplast-Localized Kinase 2 and 3 and Mitogen-Activated Protein Kinase 4 Are Essential for Microtubule Organization. *The Plant Cell* **22**, 775-771.
- Beck M., Komis G., Ziemann A., Menzel D., Šamaj J. (2011): Mitogen-activated protein kinase 4 is involved in the regulation of mitotic and cytokinetic mikrotubule transitions in Arabidopsis thaliana. *New Phytologist* **189**, 1069-1083.
- Blume Y. B., Krasylenko Y. A., Demchuk O. M., Yemets A. I. (2013): Tubulin tyrosine nitration regulates microtubule organization in plant cells. *Frontiers in plant science* **4**.
- Bögre L., Calderini O., Binarova P., Mattauch M., Till S., Kiegerl, S., Jonak C., Barker P., Pollaschek Ch., Huskisson N. S., Hirt H. (1999): A MAP kinase is activated late in plant mitosis and becomes localized to the plane of cell division. *The Plant Cell* **1**, 101-113.
- Bradford M. (1976): A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Biochemistry* **72**, 248-254.
- Brock A. K., Willmann R., Kolb D., Grefen L., Lajunen H.M., Bethke G., Lee J., Nürnberger T., Gust A.A. (2010): The Arabidopsis mitogen-activated protein kinase phosphatase PP2C5 affects seed germination, stomatal aperture, and abscisic acid-inducible gene expression. *Plant Physiology* **153**, 1098–1111.
- Burbank K. S., Mitchison T. J. (2006): Microtubule dynamic instability. *Current Biology* **14**, R516-R517.
- Burk D. H., Liu B., Zhong R., Morrison W. H., Ye Z. H. (2001): A katanin-like protein regulates normal cell wall biosynthesis and cell elongation. *Plant Cell* **13**, 807-827.
- Cadenas E. (1989): Biochemistry of oxygen toxicity. *Annual review of biochemistry* **1**,79-110.

- Cao L., Henty-Ridilla J. L., Blanchoin L., Staiger, C. J. (2015): Profilin-Dependent Nucleation and Assembly of Actin Filaments Controls Cell Elongation in Arabidopsis. *Plant physiology*, pp-01321.
- Caroni P. (2001): Actin cytoskeleton regulation through modulation of PI(4,5)P2 rafts. *The EMBO Journal* **16**, 4332-4336.
- Casimiro I., Marchant A., Bhalerao R. P., Beeckman T., Dhooge S., Swarup R., Graham N., Sandberg G., Inzé D., Bennett, M. (2001): Auxin transport promotes Arabidopsis lateral root initiation. *The Plant Cell* **4**, 843-852.
- Conroy C., Ching J., Gao Y., Wang X., Rampitsch C., Xing T. (2013): Knockout of AtMKK1 enhances salt tolerance and modifies metabolic activities in Arabidopsis. *Plant Signaling & Behavior* **8**, e24206.
- Cooper J. A., Schafer D. A. (2000): Control of actin assembly and disassembly at filament ends. *Current opinion in cell biology* **1**, 97-103.
- Dominguez R., Lee S. H. (2010): Regulation of Actin Cytoskeleton Dynamics in Cells. *Molecules and Cells* **29**, 311-325.
- Estelle M., Dharmasiri N. (2004): Auxin signaling and regulated protein degradation. *Trends in plant science* **6**, 302-308.
- Evangelista M., Pruyne D., Amberg D. C., Boone C., Bretscher A. (2002): Formins direct Arp2/3-independent actin filament assembly to polarize cell growth in yeast. *Nature cell biology* **1**, 32-41.
- Fache V., Gaillard J., Van Damme D., Geelen D., Neumann E., Stoppin-Mellet V., Vantard M. (2010): Arabidopsis kinetochore fiber-associated MAP65-4 cross-links microtubules and promotes microtubule bundle elongation. *The Plant Cell* **22**, 3804-3815.
- Feilner T., Hultschig C., Lee J., Meyer S., Immink R. G., Koenig A., Possling A., Seitz H., Beveridge A., Scheel D., Cahill D.J., Lehrach H., Kreutzberger J., Kersten B. (2005): High throughput identification of potential *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinases substrates. *Molecular and Cellular Proteomics* **4**, 1558-1568.
- Frei dit Frey N., Garcia A., Bigeard J., Zaag R., Bueso E., Garmier M., Pateyron S., Brunaud V., Balzergue S., Aubourg S., Martin-Magniette M., Colcombet, J. (2014): Functional analysis of Arabidopsis immune-related MAPKs uncovers a role for MPK3 as negative regulator of inducible defences. *Genome Biology*.
- Gaillard J., Neumann E., Van Damme D., Stoppin-Mellet V., Ebel C., Barbier E., Geelen D., Vantard M. (2008): Two microtubule-associated proteins of Arabidopsis MAP65s promote antiparallel microtubule bundling. *Molecular biology of the cell* **19**, 4534-4544.
- Gardiner J. (2013): The evolution and diversification of plant microtubule-associated proteins. *The Plant Journal* **75**, 219–229.
- Gawrońska P., Witońa D., Vashutina K., Bederskab M., Betlińska B., Rusaczonka A., Karpińska S. (2014): Mitogen-Activated Protein Kinase 4 Is a Salicylic Acid-Independent Regulator of Growth But Not of Photosynthesis in *Arabidopsis*. *Molecular Plant* **7**, 1151-1166.
- Geldner N., Anders N., Wolters H., Keicher J., Kornberger W., Müller P, A. Delbarre, Ueda T., Nakano A., Jürgens G. (2003): The Arabidopsis GNOM ARF-GEF Mediates Endosomal Recycling, Auxin Transport, and Auxin-Dependent Plant Growth. *Cell* **112**, 219–230.

- Ghosh D. K., Dasgupta D., Guha A. (2012): Models, Regulations, and Functions of Microtubule Severing by Katanin. *ISRN Molecular Biology* **2012**, 1-14.
- Goldschmidt-Clermont P. J., Machesky L. M., Baldassare J. J., Pollard T. D. (1990): The actin-binding protein profilin binds to PIP2 and inhibits its hydrolysis by phospholipase C. *Science* **247**, 1575–1578.
- Gould C. M., Diella F., Via A., Puntervoll P., Gemünd C., Chabanis-Davidson S., Sushama M., Haslam N., Sayadi A., Hughes T., Chica C., Travé G., Aasland R., Linding R., Seiler M. (2009): ELM: the status of the 2010 eukaryotic linear motif resource. *Nucleic acids research*, gkp1016.
- Grebe M., Xu J., Möbius W., Ueda T., Nakano A., Geuze H. J., Rook M. B., Scheres B. (2003): *Arabidopsis* sterol endocytosis involves actin-mediated trafficking via ARA6-positive early endosomes. *Current Biology* **13**, 1378-1387.
- Hagan I. M. Robertson A. M. (2008): Stress-regulated kinase pathways in the recovery of tip growth and microtubule dynamics following osmotic stress in *S. pombe*. *Journal of cell science* **121**, 4055-4068.
- Hamada T. (2007): Microtubule-associated proteins in higher plants. *Journal of plant research* **1**, 79-98.
- Hamada T., Nagasaki-Takeuchi N., Kato T., Fujiwara M., Sonobe S., Fukao Y., Hashimoto T. (2013): Purification and Characterization of Novel Microtubule-Associated Proteins from *Arabidopsis* Cell Suspension Cultures. *Plant physiology* **163**, 1804-1816.
- Higaki T., Sano T., Hasezawa S. (2007): Actin microfilament dynamics and actin side-binding proteins in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **10**, 549–556.
- Ho C. M. K., Lee Y. R. J., Kiyama L. D., Dinesh-Kumar S. P., Liu, B. (2012): *Arabidopsis* microtubule-associated protein MAP65-3 cross-links antiparallel microtubules toward their plus ends in the phragmoplast via its distinct C-terminal microtubule binding domain. *The Plant Cell* **24**, 2071-2085.
- Hoehenwarter W., Thomas M., Nukarinen E., Egelhofer V., Röhrig H., Weckwerth W., Conrath U., Beckers G. J. M. (2013): Identification of Novel *in vivo* MAP Kinase Substrates in *Arabidopsis thaliana* Through Use of Tandem Metal Oxide Affinity Chromatography. *Molecular & Cellular Proteomics* **12**, 369–380.
- Howe A. G. (2004): Jasmonates as Signals in the Wound Response. *Journal of Plant Growth Regulation* **23**, 223-237.
- Hu S., Brady S. R., Kovar D. R., Staiger C. J., Clark G. B., Roux S. J., Muday G. K. (2000): Identification of plant actin-binding proteins by F-actin affinity chromatography. *The Plant Journal* **1**, 127-137.
- Huang S., An Y. Q., McDowell J. M., McKinney E. C., Meagher, R. B. (1996): Conserved expression of the *Arabidopsis* ACT1 and ACT 3 actin subclass in organ primordia and mature pollen. *The Plant Cell* **8**, 15-30.
- Huang S., Blanchoin L., Chaudhry F., Franklin-Tong V. E., Staiger C. J. (2004): A gelsolin-like protein from *Papaver rhoeas* pollen (PrABP80) stimulates calcium-regulated severing and depolymerization of actin filaments. *Journal of Biological Chemistry* **22**, 23364-23375.
- Christensen H. E., Ramachandran S., Tan C. T., Surana U., Dong C. H., Chua N. H. (1996): *Arabidopsis* profilins are functionally similar to yeast profilins: identification of a

- vascular bundle-specific profilin and a pollen-specific profilin. *The Plant Journal* **2**, 269-279.
- Ichimura K., Mizoguchi T., Yoshida R., Yuasa T., Shinozaki K. (2000): Various abiotic stresses rapidly activate *Arabidopsis* MAP kinases ATMPK4 and ATMPK6. *The Plant Journal* **24**, 655-665.
- Ichimura K., Shinozaki K., Tena G., Sheen J., Henry Y., Champion A., Kreis M., Zhang S., Hirt H., Wilson C., Heberle-Bors E., Ellis E. B., Morris C. P., Innes W. R., Ecker R. J., Scheel D., Klessig F.D., Machida Y., Mundy J., Ohashi Y., Walker C.J. (2002): Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends in Plant Science* **7**, 301-308.
- Ichimura K., Mizoguchi T., Irie K., Morris P., Giraudat J., Matsumoto K., Shinozaki K. (1998): Isolation of ATMEKK1 (a MAP kinase kinase kinase)-interacting proteins and analysis of a MAP kinase cascade in *Arabidopsis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **253**, 532-543.
- Ingouff M., Gerald J. N. F., Guérin C., Robert H., Sørensen M. B., Van Damme D., Geelen D., Berger, F. (2005): Plant formin AtFH5 is an evolutionarily conserved actin nucleator involved in cytokinesis. *Nature Cell Biology* **4**, 374-380.
- Jonak C., Okrész L., Bögre L., Hirt H. (2002): Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling. *Current Opinion in Plant Biology* **5**, 415-424.
- Kandasamy M. K., McKinney E. C., Meagher R. B. (2002): Plant profilin isoforms are distinctly regulated in vegetative and reproductive tissues. *Cell motility and the cytoskeleton* **1**, 22-32.
- Kohoutová L., Kourova H., Nagy S. K., Volc J., Halada P., Mészáros T., Meskiene I., Bögre L., Binarová, P. (2015): The *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase 6 is associated with  $\gamma$ -tubulin on microtubules, phosphorylates EB1c and maintains spindle orientation under nitrosative stress. *New Phytologist* **207**, 1061-1074.
- Komis G., Illes P., Beck M., Šamaj J. (2011): Microtubules and mitogen-activated protein kinase signalling. *Current Opinion in Plant Biology* **14**, 650-657.
- Kosetsu K., Matsunaga S., Nakagami H., Colcombet J., Sasabe M., Soyano, T., Machida Y. (2010): The MAP kinase MPK4 is required for cytokinesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* **11**, 3778-3790.
- Kost B., Chua N. H. (2002): The Plant Cytoskeleton: Vacuoles and Cell Walls Make the Difference. *Cell Press* **108**, 9-12.
- Kovtun Y., Chiu W. L., Tena G., Sheen, J. (2000): Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proceedings of the national academy of sciences* **6**, 2940-2945.
- Lanteri M. L., Laxalt A. M., Lamattina L. (2008): Nitric oxide triggers phosphatidic acid accumulation via phospholipase D during auxin-induced adventitious root formation in cucumber. *Plant Physiology* **1**, 188-198.
- Lanzetti L. (2007): Actin in membrane trafficking. *Current Opinion in Plant Biology* **19**, 453-458.



- Lassowskat I., Böttcher Ch., Eschen-Lippold L., Scheel D., Lee J. (2014): Sustained mitogen-activated protein kinase activation reprograms defense metabolism and phosphoprotein profile in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science* **5**, 1-20.
- Lee J. S., Wang S., Sritubtim S., Chen J. G., Ellis B. E. (2009): Arabidopsis mitogen-activated protein kinase MPK12 interacts with the MAPK phosphatase IBR5 and regulates auxin signaling. *Plant Journal* **57**, 975-985.
- Lee s., Hirt H., Lee Y. (2001): Phosphatidic acid activates a wound-activated MAPK in Glycine max. *The Plant Journal* **26**, 479-486.
- Li J., Blanchoin L., Staiger C. J. (2015): Signaling to actin stochastic dynamics. *Annual Review of Plant Biology* **66**, 415-440.
- Liu J., Yu L., Nie J., Cao Ch., Jin Y., Yan M., Wang F., Xiao Y., Liang Y. Zhang W. (2010): Phosphatidic acid mediates salt stress response by regulation of MPK6 in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **188**, 762-773.
- Liu Y., Zhang S. (2004): Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **16**, 3386-3399.
- Lucas J. R., Courtney S., Hassfurder M., Dhingra S., Bryant A., Shaw S. L. (2011): Microtubule-associated proteins MAP65-1 and MAP65-2 positively regulate axial cell growth in etiolated *Arabidopsis* hypocotyls. *The Plant Cell* **23**, 1889-1903.
- Lumbreras V., Vilela B., Irar S., Solé M., Capellades M., Valls M., Coca M., Pagès M. (2010): MAPK phosphatase MKP2 mediates disease responses in *Arabidopsis* and functionally interacts with MPK3 and MPK6. *The Plant Journal* **63**, 1017-1030.
- Mao G., Meng X., Liu Y., Zheng Z., Chen Z., Zhang S. (2011): Phosphorylation of a WRKY Transcription Factor by Two Pathogen-Responsive MAPKs Drives Phytoalexin Biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **23**, 1639-1653.
- Mao T., Jin L., Li H., Liu B., Yuan M. (2005): Two microtubule-associated proteins of the *Arabidopsis* MAP65 family function differently on microtubules. *Plant Physiology* **138**, 654-662.
- Mathur J., Voigt B., Timmers A. C., Šamaj J., Hlavačka A., Ueda T., Preuss M., Nakano A., Stenmark H., Emans N., Baluška F. (2005): Actin-based motility of endosomes is linked to the polar tip growth of root hairs. *European journal of cell biology* **6**, 609-621.
- McKinney E. C., Kandasamy M. K., Meagher R. B. (2001): Small changes in the regulation of one *Arabidopsis* profilin isoform, PRF1, alter seedling development. *The Plant Cell* **5**, 1179-1191.
- McKinney E. C., Meagher R. B. (1998): Members of the *Arabidopsis* Actin Gene Family Are Widely Dispersed in the Genome. *Genetics* **149**, 663-675.
- McNally F. J., Valle R. D. (1993): Identification of katanin, an ATPase that severs and disassembles stable microtubules. *Cell* **75**, 419-429.
- Meister M., Tomasovic A., Banning A., Tikkanen, R. (2013): Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Scaffolding Proteins: A Recount. *International Journal of Molecular Sciences* **14**, 4854-4884.

- Menke F. L., Van Pelt J. A., Pieterse C. M., Klessig D. F. (2004): Silencing of the mitogen-activated protein kinase MPK6 compromises disease resistance in Arabidopsis. *The Plant Cell* **4**, 897-907.
- Mhamdi A., Queval G., Chaouch S., Vanderauwera S., Van Breusegem F., Noctor G. (2010): Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. *Journal of Experimental Botany* **61**, 4197-4220.
- Müller J., Beck M., Mettbach U., Komis G., Hause G., Menzel D., Šamaj J. (2010): Arabidopsis MPK6 is involved in cell division plane control during early root development, and localizes to the pre-prophase band, phragmoplast, trans-Golgi network and plasma membrane. *The Plant Journal* **2**, 234-248.
- Mullins R. D., Heuser J. A., Pollard T. D. (1998): The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **11**, 6181-6186.
- Murashige T., Skoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* **15**, 473-497.
- Nakagami H., Soukupová H., Schikora A., Zárský V., Hirt, H. (2006): A mitogen-activated protein kinase kinase kinase mediates reactive oxygen species homeostasis in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry* **50**, 38697-38704.
- Nebi T., Oh S. W., Luna E. J. (2000): Membrane cytoskeleton: PIP(2) pulls the strings. *Current Biology* **10**, 351-354.
- Okushima Y., Overvoorde P. J., Arima K., Alonso J. M., Chan A., Chang C., Hughes B., Lui A., Smith A., Nguyen D., Onodera, C. (2005): Functional genomic analysis of the AUXIN RESPONSE FACTOR gene family members in Arabidopsis thaliana: unique and overlapping functions of ARF7 and ARF19. *The Plant Cell* **2**, 444-463.
- Perrin R. M., Wang Y., Yuen C. Y. L., Will J., Masson, P. H. (2007): WVD2 is a novel microtubule-associated protein in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal* **49**, 961-971.
- Petersen M., Brodersen P., Naested H., Andreasson E., Lindhart U., Johansen B., Lacy M., Mattson O., Sharma S. B. (2000): Arabidopsis MAP kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* **7**, 1111-1120.
- Pitzschke A., Schikora A., Hirt H. (2009): MAPK cascade signalling networks in plant defence. *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 421-426.
- Popescu S. C., Popescu G. V., Bachan S., Zhang Z., Gerstein M., Snyder M., Dinesh-Kumar S. P. (2009): MAPK target networks in Arabidopsis thaliana revealed using functional protein microarrays. *Genes & Development* **23**, 80-92.
- Rahman A., Bannigan A., Sulaman W., Pechter P., Blancaflor E. B., Baskin, T. I. (2007): Auxin, actin and growth of the Arabidopsis thaliana primary root. *The Plant Journal* **3**, 514-528.
- Rentel M. C., Lecourieux D., Ouaked F., Usher S. L., Petersen L., Okamoto H., Knight H., Peck S. C., Grierson C. S., Hirt H., Knight M. R. (2004): OX11 kinase is necessary for oxidative burst-mediated signalling in Arabidopsis. *Nature* **427**, 858-861.
- Ringli C., Baumberger N., Diet A., Frey B., Keller B. (2002): ACTIN2 is essential for bulge site selection and tip growth during root hair development of Arabidopsis. *Plant Physiology* **129**, 1464-1472.

- Roll-Mecak A., McNally F. J. (2010): Microtubule-severing enzymes. *Current opinion in cell biology* **1**, 96-103.
- Sagot I., Rodal A. A., Moseley J., Goode B. L., Pellman D. (2002): An actin nucleation mechanism mediated by Bni1 and profilin. *Nature cell biology* **8**, 626-631.
- Sangwan V., Orvar B. J., Beyerly J., Hirt H., Dhindsa R. S. (2002): Opposite changes in membrane fluidity mimic cold and heat stress activation of distinct plant MAP Kinase pathways. *The Plant Journal* **31**, 629–638.
- Sasabe M., Kosetsu K., Hidaka M., Murase A., Machida, Y. (2011): Arabidopsis thaliana MAP65-1 and MAP65-2 function redundantly with MAP65-3/PLEIADE in cytokinesis downstream of MPK4. *Plant signaling & behavior* **5**, 743-747.
- Sheikh A.H., Eschen-Lippold L., Pecher .P, Hoehenwarter W., Sinha A.K., Scheel D, Lee J. (2016): Regulation of WRKY46 Transcription Factor Function by Mitogen-Activated Protein Kinases in Arabidopsis thaliana. *Frontiers in Plant Science* **7**.
- Smékalová V., Luptovciak I., Komis G., Šamajová O., Ovečka M., Doskočilová A., Takáč T., Vadovič P., Novák O., Pechan T., Ziemann A., Košútová P., Šamaj J. (2014): Involvement of YODA and mitogen activated protein kinase 6 in Arabidopsis post-embryogenic root development through auxin up-regulation and cell division plane orientation. *New Phytologist* **203**, 1175-1193.
- Staiger C. J., Lloyd C. W. (1991): The plant cytoskeleton. *Current opinion in cell biology* **1**, 33-42.
- Su S. H., Suarez-Rodriguez M. C., Krysan, P. (2007): Genetic interaction and phenotypic analysis of the Arabidopsis MAP kinase pathway mutations mekk1 and mpk4 suggests signaling pathway complexity. *FEBS letters* **7**, 3171-3177.
- Suarez-Rodriguez M. C., Adams-Phillips L., Liu Y., Wang H., Su S. H., Jester P. J., Krysan P. J. (2007): MEKK1 is required for flg22-induced MPK4 activation in Arabidopsis plants. *Plant Physiology* **2**, 661-669.
- Sun T., Li S., Ren H. (2013): Profilin as a regulator of the membrane-actin cytoskeleton interface in plant cells. *Frontiers in Plant Science* **4**, 512.
- Šamaj J., Ovečka M., Hlavačka A., Lecourieux F., Meskiene I., Lichtscheidl I., Lenart P., Salaj J., Volkmann D., Bögre L., Baluška F., Hirt H. (2002): Involvement of the mitogen-activated protein kinase SIMK in regulation of root hair tip growth. *The EMBO Journal* **21**, 3296–3306.
- Takáč T., Šamaj J. (2015): Advantages and limitations of shot-gun proteomic analyses on Arabidopsis plants with altered MAPK signaling. *Frontiers in plant science* **6**.
- Takáč T., Šamajová O., Vadovič P., Pechan T., Košútová P., Ovečka M., Husičková A., Komis G., Šamaj J. (2014): Proteomic and Biochemical Analyses Show a Functional Network of Proteins Involved in Antioxidant Defense of the Arabidopsis *anp2anp3* Double Mutant. *Journal of Proteome Research* **13**, 5347–5361.
- Takáč T., Pechan T., Richter H., Müller J., Eck C., Böhm N., Obert B., Ren H., Niehaus K., Šamaj J. (2011): Proteomics on Brefeldin A-Treated Arabidopsis Roots Reveals Profilin 2 as a New Protein Involved in the Cross-Talk between Vesicular Trafficking and the Actin Cytoskeleton. *Journal of proteome Research* **10**, 488-501.

- Teige M., Scheikl E., Eulgem T., Dóczy R., Ichimura K., Shinozaki K., Dangl L. J., Hirt H. (2004): The MKK2 Pathway Mediates Cold and Salt Stress Signaling in *Arabidopsis*. *Molecular Cell* **15**, 141-152.
- Von Mering C., Jensen L. J., Sne, B., Hooper S. D., Krupp M., Foglierini M., Bork, P., Jouffre N. (2005): STRING: known and predicted protein–protein associations, integrated and transferred across organisms. *Nucleic acids research* **33**(suppl1), D433-D437.
- Wang H., Ngwenyama N., Liu Y., Walker J.C., Zhang S. (2007): Stomatal Development and Patterning Are Regulated by Environmentally Responsive Mitogen-Activated Protein Kinases in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **19**, 63–73.
- Wang X., Zhu L., Liu B., Wang C., Jin L., Zhao Q., Yuan M. (2007): *Arabidopsis* MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN18 functions in directional cell growth by destabilizing cortical microtubules. *The Plant Cell* **19**, 877-889.
- Woodward A. W., Bartel, B. (2005): Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of botany* **5**, 707-735.
- Xing Y., Jia, W., Zhang J. (2008): AtMKK1 mediates ABA-induced CAT1 expression and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production via AtMPK6-coupled signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **3**, 440-451.
- Xue Y., Ren J., Gao X., Jin C., Wen L., Yao X. (2008): GPS 2.0, a tool to predict kinase-specific phosphorylation sites in hierarchy. *Molecular & cellular proteomics* **9**, 1598-1608.
- Yuen C. Y., Pearlman R. S., Silo-Suh L., Hilson P., Carroll K. L., Masson P. H. (2003): WVD2 and WDL1 modulate helical organ growth and anisotropic cell expansion in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **2**, 493-506.
- Zhang Q., Lin F., Mao T., Nie J., Yan M., Yuan M., Zhang W. (2012): Phosphatidic acid regulates microtubule organization by interacting with MAP65-1 in response to salt stress in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **11**, 4555-4576.
- Zhang Y., Liu J., Chai J., Xing D. (2016): Mitogen-activated protein kinase 6 mediates nuclear translocation of ORE3 to promote ORE9 gene expression in methyl jasmonate-induced leaf senescence. *Journal of experimental botany* **1**, 83-94.
- Zhao Y. (2010): Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annual review of plant biology* **61**, 49.
- Zhu L., Zhang Y., Kang E., Xu Q., Wang M., Rui Y., Fu Y. (2013): MAP18 regulates the direction of pollen tube growth in *Arabidopsis* by modulating F-actin organization. *The Plant Cell* **25**, 851-867.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACT	aktin
ANP	jaderné a fragmoplast lokalizované kinasy
BFA	Brefeldin A
DTT	dithiotreitol
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EGTA	ethylenglykoltetraoctová kyselina
GO	gene ontology
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonová kyselina
IAA	indol-3-octová kyselina
LC-MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie spojená s kapalinovou chromatografií
LK	laterální kořeny
MAP	proteiny vážící se na mikrotubuly
MAPKK	mitogenem aktivovaná protein kinasa kinasa
MAPKKK	mitogenem aktivovaná protein kinasa kinasa kinasa
MAPKs	mitogenem aktivované protein kinasy
MPK4	mitogenem aktivovaná protein kinasa 4
MPK6	mitogenem aktivovaná protein kinasa 6
OXI1	oxidative signal – inducible 1
PA	kyselina fosfatidová
PIP <sub>2</sub>	fosfatidylinositol 4,5 bisfosfát
PLDa1	phospholipasa D alfa 1
PRF	profilin
PVDF	polyvinylidene difluorid
SAMK	stresem aktivované mitogenem aktivované protein kinasy

SD	směrodatná odchylka
SIMK	stresem indukované mitogenem aktivované protein kinasy
SOD	superoxiddismutasa
TEMED	tetramethylethylendiamin
TFA	trifluoroctová kyselina
WVD2	Wave-dampened 2

## 9 PŘÍLOHY

Tab. P1 Seznam proteinů s diferenciálně změněnou abundancí v kořenu *mpk4* mutanta v porovnání s Col-0

Kód proteinu	Pokrytí	# Peptidů	# AMK	MH [kDa]	Vypoč. pI	Skóre	Název proteinu	Hodnota P	Změna abundance
gi30696056	14	25	843	93,8	6,25	161,39	elongation factor EF-2	9,40E-05	0,08
gi15237054	30,87	19	230	26	6,4	176,65	V-type proton ATPase subunit E1	1,50E-02	0,11
gi334186408	17,5	10	346	37,4	9,6	55,92	L-ascorbate peroxidase S	2,20E-02	0,11
gi30684617	29,17	11	144	15,4	5,55	64,37	40S ribosomal protein S12-1	4,30E-03	0,14
gi15237716	13,42	5	313	33,8	6,1	30,87	TOMV RNA binding protein	8,60E-03	0,21
gi18423437	8,88	1	169	19,2	4,77	3,67	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 5	1,80E-02	0,22
gi334188446	16,92	18	597	63,3	5,87	104,79	TCP-1/cpn60 chaperonin family protein	6,80E-03	0,23
gi30696930	21,37	18	482	52,1	7,75	122,47	Monodehydroascorbate reductase	7,50E-05	0,24
gi145323784	45,78	34	249	27,5	6,29	181,81	L-ascorbate peroxidase 1	4,10E-02	0,24
gi15233538	43,51	15	131	14	5,2	73	profilin 2	3,50E-03	0,25
gi18379244	49,01	23	151	17,6	5,55	128,66	MLP-like protein 329	5,10E-04	0,26
gi15236568	14,57	8	151	17,5	6,34	43,47	polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily protein	1,80E-02	0,28
gi15231255	13,42	16	596	63,3	5,73	92,97	TCP-1/cpn60 chaperonin family protein	2,30E-02	0,3

Tab. P1 Seznam proteinů s diferencially změněnou abundancí v kořenu *mpk4* mutanta v porovnání s Col-0 (*pokračování*)

gi79313339	20,76	5	236	25,5	5,2	26,99	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	2,40E-02	0,32
gi145325425	20,25	6	237	25,9	4,75	59,01	proteasome subunit alpha type-5-A	2,30E-02	0,32
gi30691626	14,37	19	682	73	5,62	147,99	heat shock protein 70-1	1,50E-02	0,32
gi30686836	25,1	17	259	29,4	5,47	75,07	dehydrin ERD10	2,00E-02	0,32
gi18379240	46,36	24	151	17,5	5,73	142,14	MLP-like protein 328	4,10E-04	0,35
gi15224838	43,51	11	131	14,3	4,82	72,27	profilin 1	2,00E-02	0,36
gi15225353	8,31	7	421	45,3	6,71	88,83	Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit beta	2,10E-02	0,37
gi15224648	30	6	100	11	4,88	43,39	membrane-associated progesterone binding protein 2	7,30E-04	0,38
gi15219721	38,86	32	332	35,5	6,55	225,34	malate dehydrogenase	1,60E-02	0,41
gi30690396	31,25	41	352	38,8	6,67	258,53	Peroxidase family protein	1,60E-02	0,42
gi238479568	9,82	3	163	18,5	4,78	16,32	thiocyanate methyltransferase 1	1,70E-02	0,43
gi145329204	22,88	13	306	32,3	7,49	75,34	triosephosphate isomerase	4,10E-02	0,45
gi15225798	24,68	14	462	48,5	8,34	87,2	3-ketoacyl-CoA thiolase 2	2,80E-02	0,47



Tab. P1 Seznam proteinů s diferencially změněnou abundancí v kořenu *mpk4* mutanta v porovnání s Col-0 (*pokračování*)

gi30690772	34,22	29	263	29,2	8,5	153,92	glutathione S-transferase phi 8	3,20E-03	0,5
gi15236211	43,02	19	172	18,4	8,69	168,3	rotamase cyclophilin 5	4,00E-03	0,5
gi15219886	15,18	10	191	21,2	4,34	45,56	cytochrome C oxidase 6B	9,20E-03	0,53
gi15234781	60,47	19	172	18,4	7,81	130,6	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP1	4,90E-03	0,54
gi334185190	26,81	44	649	71,1	5,7	229,3	heat shock protein 70-3	8,00E-03	0,57
gi18413214	29,59	9	169	18,8	8,27	61,76	nucleoside diphosphate kinase 1	4,50E-02	0,61
gi186502696	24,42	27	520	54,5	5,92	129,1	aminopeptidase family protein	3,50E-02	0,62
gi334185401	34,34	17	297	32,1	5,44	82,86	JA-responsive protein 1	2,30E-02	0,64
gi30699430	34,66	27	401	42,1	5,68	203,37	phosphoglycerate kinase	1,60E-02	1,59
gi79313257	25,2	24	734	80,7	4,7	221,13	DNA topoisomerase-like protein	1,40E-03	1,67
gi15239697	24,62	8	130	13,6	10,15	39,65	histone H2A	2,10E-02	2,29
gi15218090	16,1	8	503	54,4	6,33	80,45	putative mitochondrial-processing peptidase subunit alpha-1	3,80E-02	2,31
gi15235213	24,71	13	259	29,1	5,29	89,73	putative caffeoyl-CoA O-methyltransferase	2,70E-02	2,33

Tab. P1 Seznam proteinů s diferenciálně změněnou abundancí v kořenu *mpk4* mutanta v porovnání s Col-0 (*pokračování*)

gi79327847	31,7	26	388	41,9	6	125,33	isopropylmalate dehydrogenase 1	7,00E-03	2,41
gi15240765	16,67	5	276	29,6	8,85	64,56	voltage dependent anion channel 2	4,60E-03	2,41
gi15229809	5,88	8	187	21,6	9,41	26,53	uncharacterized protein	4,70E-02	2,58
gi15229231	50	55	338	36,9	7,12	308,86	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C subunit 1	3,50E-03	2,63
gi15222848	52,96	42	338	36,9	7,18	281,87	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	5,70E-03	2,71
gi145334507	23,1	57	765	84,3	6,51	317,79	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase	2,50E-02	2,74
gi15235401	38,21	23	212	24,1	6,35	146,9	glutathione S-transferase F2	2,10E-02	2,82
gi145332383	13,43	6	402	45,7	6,28	42,16	translational initiation factor 4A-1	4,30E-02	2,87
gi18411929	12,79	2	219	25,6	6,4	65,94	glutathione S-transferase TAU 19	1,30E-02	3,06
gi15221019	49,36	40	391	43,2	7,11	294,03	GDSL esterase/lipase	6,20E-04	3,6
gi186513287	3,78	3	450	49	7,72	18,56	argininosuccinate synthase	4,10E-02	3,63
gi79607896	31,91	60	705	72,4	5,5	368,81	jacalin-like lectin domain-containing protein	7,10E-04	3,66
gi18410311	12,56	6	215	23,8	7,18	59,49	kunitz trypsin inhibitor 1	9,40E-04	3,66

Tab. P1 Seznam proteinů s diferencially změněnou abundancí v kořenu *mpk4* mutanta v porovnání s Col-0 (*pokračování*)

gi15220216	34,7	20	317	36,2	5,38	159,85	annexin 1	1,30E-02	4,41
gi15232603	25	14	320	34,1	5,7	104,3	60S acidic ribosomal protein P0-2	4,40E-02	4,61
gi15227257	22,46	10	325	35,4	8,9	81,77	ATP synthase subunit gamma	1,80E-03	4,71
gi15233740	15,67	20	823	94,1	5,3	141,95	HSP90-like protein GRP94	4,60E-05	4,99
gi15233268	34	13	250	27,5	7,11	64,98	20S proteasome alpha-3 subunit	1,20E-02	5,44
gi18404748	28,76	26	386	43,1	8,7	164,62	GDSL esterase/lipase	5,10E-03	5,48
gi240255920	34,3	23	344	37,7	6,84	144,83	beta-1,3-endoglucanase that interacts with the 30C02 cyst nematode effector	4,30E-03	5,96
gi18414298	22,7	13	435	47,5	5,31	107,75	monodehydroascorbate reductase (NADH)	4,60E-02	6,1
gi79587736	18,2	10	283	31,9	5,27	55,37	glyoxalase I homolog	6,30E-04	7,08
gi15236981	17,91	2	134	15,5	10,4	28,17	60S ribosomal protein L14-2	7,70E-06	7,31
gi30694819	13,95	4	172	19,8	9,92	34,55	60S ribosomal protein L11-2	5,30E-03	9,45
gi15232845	25,42	28	531	59,1	6,79	183,49	probable mitochondrial-processing peptidase subunit beta	1,10E-04	13,11
gi145333043	14,77	10	325	35,5	5,16	61	adenosylhomocysteinase	1,50E-02	25,25

Tab. P2 Seznam detekovaných proteinů v *mpk4* mutantu nebo v Col-0

Kód proteinu	Pokrytí	# Peptidů	# AMK	MH [kDa]	Vypoč. pI	Score	Název proteinu	Vzorek
gi15226503	6,61	3	257	26,9	7,2	16,1	short-chain dehydrogenase reductase 3a	<i>mpk4</i>
gi15229631	15,7	3	146	16,9	10,78	36,15	60S ribosomal protein L26-1	<i>mpk4</i>
gi15237838	19,51	5	164	18,1	4,56	46,74	MD-2-related lipid recognition domain-containing protein	<i>mpk4</i>
gi15241316	33,78	17	222	25	10,32	87,57	40S ribosomal protein S8-1	<i>mpk4</i>
gi18410982	9,38	4	160	17,8	4,54	18,16	S-phase kinase-associated protein 1	<i>mpk4</i>
gi18421006	30,77	19	351	39,8	9,22	106,73	TRAF-like family protein	<i>mpk4</i>
gi186478702	3,71	3	377	43,9	7,61	17,48	catalase 3	<i>mpk4</i>
gi22328599	18,39	3	87	9,5	4,97	24,38	RNA recognition motif-containing protein	<i>mpk4</i>
gi145324054	6,3	5	315	33,9	10,7	42,42	arabinogalactan protein 31	<i>mpk4</i>
gi145334501	5,84	1	257	27	5,63	22,57	binding partner of acd11 1	Col-0
gi15219345	16,27	9	418	45,5	4,82	59,27	metacaspase 4	Col-0
gi15220874	27,55	13	196	22,1	8,78	63,97	kunitz type trypsin and protease inhibitor domain-containing protein	Col-0
gi15225899	13,68	3	190	21	8,54	18,85	Remorin family protein	Col-0
gi15226573	4,78	7	586	65,5	6,28	43,64	Ferredoxin--nitrite reductase	Col-0
gi15230534	23,54	34	650	71,1	5,25	208,69	heat shock protein 70-4	Col-0
gi15232058	13,4	6	321	34,9	8,95	25,84	peroxidase 27	Col-0

Tab. P2 Seznam detekovaných proteinů v *mpk4* mutantu nebo v Col-0 (pokračování)

gi15233349	6,46	13	898	98,1	6,4	78,55	aconitate hydratase 1	Col-0
gi15237679	14,29	5	112	12	6,4	32,07	peptidyl-prolyl isomerase FKBP12	Col-0
gi15237998	7,88	4	203	21,5	6,7	22,47	ATP synthase subunit delta'	Col-0
gi15239843	24,7	21	332	35,7	6,79	146,81	malate dehydrogenase	Col-0
gi15240454	3,66	4	464	50,1	9,14	25,37	dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex 1	Col-0
gi18400212	4,45	2	539	58,4	7,65	31,36	dihydrolipoamide acetyltransferase, long form protein	Col-0
gi18401423	11,93	1	109	12,2	5,68	14	heat stable protein 1	Col-0
gi18402503	33,54	4	164	16,9	5,3	33,78	uncharacterized protein	Col-0
gi18417863	13,6	5	268	30,2	4,81	36,66	14-3-3-like protein GF14 epsilon	Col-0
gi22331076	6,44	2	777	81,8	6,77	30,68	Subtilase family protein	Col-0
gi240254562	3	6	1333	148,5	4,75	81,64	uncharacterized protein	Col-0
gi240255880	53,49	11	86	9,3	4,48	61,9	heat shock factor binding protein	Col-0
gi30682607	1,6	3	1309	141,9	6,6	25,44	mRNA decapping complex VCS	Col-0
gi30687411	16,99	5	365	39,7	7,53	44,11	Dihydrolipoamide succinyltransferase	Col-0
gi30695409	4,27	1	398	40,9	6,5	23,45	acetoacetyl-CoA thiolase 2	Col-0
gi334186360	25,58	4	129	14	5,26	22,15	peptide methionine sulfoxide reductase B5	Col-0
gi79558700	17,16	6	169	19	6,79	32,4	rhodanese-like domain-containing protein	Col-0

Tab. P3 Seznam proteinů s diferenciólně změněnou abundancí v kořenu *mpk6* mutanta v porovnání s Col-0

Kód proteinu	Pokrytí	# Peptidů	# AMK	MH [kDa]	Vypoč. pI	Skóre	Název proteinu	Hodnota P	Změna abundance
gi15228041	35309	4	251	41815	18780	47,67	aquaporin TIP1-1	1,02E-05	0,05
gi15231569	32387	7	253	41876	41795	42,67	aquaporin TIP1-2	0,005259	0,08
gi15221156	32660	5	566	61,4	41918	49,41	pyrophosphate--fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase	0,010044	0,08
gi18394184	27,55	5	98	41861	15523	45,84	chaperonin 10	0,002671	0,09
gi15220770	41799	1	320	36,2	41978	44348	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase 2	0,032216	0,09
gi15240317	41951	6	555	60,3	28246	56,61	TCP-1/cpn60 chaperonin family protein	0,032586	0,14
gi30691988	41738	1	343	37,7	43313	41426	chaperone protein dnaJ 3	0,021753	0,14
gi145333041	22,48	5	129	41742	20241	41877	glycine-rich RNA-binding protein 2	0,028953	0,14
gi18403295	41807	8	504	55,2	34516	61,33	gamma-aminobutyrate transaminase POP2	0,014977	0,14
gi15240628	41861	2	238	41724	45170	40,65	delta subunit of Mt ATP synthase	0,031981	0,2
gi15233538	41668	7	131	14	41675	46,79	profilin 2	0,08855	0,21
gi15241592	30256	10	347	36,1	46600	70,64	Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit alpha-1	0,008807	0,22
gi18414298	29495	8	435	47,5	11444	56,54	monodehydroascorbate reductase (NADH)	0,007861	0,27
gi15226231	48,7	15	115	41740	22372	86,42	60S acidic ribosomal protein P2-1	0,020768	0,41
gi15239697	40	6	130	41803	42278	37,45	histone H2A	0,022498	0,43
gi145324054	45870	8	315	33,9	41830	53,18	arabinogalactan protein 31	0,029819	0,64

Tab. P3 Seznam proteinů s diferenciálně změněnou abundancí v kořenu *mpk6* mutanta v porovnání s Col-0 (*pokračování*)

gi15229522	35,05	18	485	53,1	27150	180,69	adenosylhomocysteinase 2	0,036912	1,59
gi26557005	25,44	23	507	54,9	22433	175,1	ATPase subunit 1	0,062333	1,9
gi15222848	52,96	54	338	36,9	43282	373,32	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	0,018262	2,27
gi30687350	42675	9	224	41694	20546	44,45	Elongation factor 1-beta 2	0,007242	2,43
gi15239146	61,9	65	588	64,4	15493	346,96	NADP-dependent malic enzyme 2	0,073743	2,46
gi145334555	18,65	8	327	36,9	43313	66,61	TRAF-like family protein	0,029122	2,54
gi15241179	19,78	11	450	49,6	41917	93,14	tubulin alpha-5	0,073244	2,9
gi15226212	19,83	3	242	41698	34578	31,96	60S ribosomal protein L7-2	0,032716	3,04
gi334185190	24,35	22	649	71,1	41825	202,97	heat shock protein 70-3	0,047434	3,15
gi334186086	23621	9	591	63,8	29373	61,95	ketol-acid reductoisomerase	0,004785	3,44
gi15236375	41784	20	471	51,7	45108	116,93	serine hydroxymethyltransferase 4	0,007147	3,6
gi30683070	28,57	13	427	47,2	41890	103,84	tubulin alpha-6 chain	0,021868	5,01
gi15242516	36,34	16	377	41,7	18019	127,72	actin 7	0,047726	5,81
gi186505986	25385	4	390	42,5	43252	60,44	S-adenosylmethionine synthase 3	0,002125	6,38
gi15219623	18,32	22	524	59,7	44378	162,51	beta-glucosidase 22	0,017529	11,4
gi145332383	34,08	15	402	45,7	46905	99,12	translational initiation factor 4A-1	0,005083	12,12

Tab. P4 Seznam detekovaných proteinů v *mpk6* mutantu nebo v Col-0

Kód proteinu	Pokrytí	# Peptidů	# AMK	MH [kDa]	vypoč. pI	Skóre	Název proteinu	Vzorek
gi145332819	46508	3	474	51.9	25720	30.92	pyruvate kinase	<i>mpk6</i>
gi145333007	31352	2	211	41662	15432	24.38	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha-like protein 4	<i>mpk6</i>
gi15220941	35855	1	327	35.7	26115	35.27	WD-40 repeat ArcA-like protein	<i>mpk6</i>
gi15221970	27395	1	859	98.0	19115	41693	lipoxygenase 1	<i>mpk6</i>
gi15222075	23.61	12	377	41.8	21306	106.86	actin 8	<i>mpk6</i>
gi15227503	43070	3	378	42.1	12175	46.37	Actin-like ATPase superfamily protein	<i>mpk6</i>
gi15230005	28672	2	424	47.5	41703	24.69	regulatory particle triple-A ATPase 5A	<i>mpk6</i>
gi15231024	41672	1	545	59.2	11110	41833	T-complex protein 1 subunit alpha	<i>mpk6</i>
gi15231059	24532	1	436	47.5	11902	18.32	acyl-coenzyme A oxidase 4	<i>mpk6</i>
gi15232671	35096	2	810	91.8	31898	56.92	phospholipase D alpha 1	<i>mpk6</i>
gi15232776	41706	11	809	89.3	45778	70.08	cell division control protein 48-A	<i>mpk6</i>
gi15233111	46082	3	368	39.9	19937	41.28	cysteine synthase C1	<i>mpk6</i>
gi15233320	13.60	1	250	25.0	23498	34182	aquaporin TIP2-1	<i>mpk6</i>
gi15235944	17989	1	379	41.8	25416	41771	uncharacterized protein	<i>mpk6</i>
gi18391349	16.35	3	104	41831	42095	32082	vacuolar calcium-binding protein-like protein	<i>mpk6</i>
gi18396845	44166	2	82	41707	29677	41863	14-3-3 family protein	<i>mpk6</i>
gi18421006	20.51	7	351	39.8	44805	49.14	TRAF-like family protein	<i>mpk6</i>
gi238479502	46296	4	458	50.4	11079	38.64	jacalin-related lectin 22	<i>mpk6</i>
gi30691619	23132	4	231	41664	20546	26.64	elongation factor 1B beta	<i>mpk6</i>
gi15227752	13636	1	354	37.4	35247	26.22	malate dehydrogenase	Col-0