

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2015**

**Jana Vinohradská**

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Charakterizace fenotypu a organizace  
mikrotubulů u vybraných MAPK mutantů**

**Bakalářská práce**

**Jana Vinohradská**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2015**

**Vedoucí práce: Georgios Komis, Ph.D.**

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Georgiose Komise, Ph.D. a s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne .....

.....

## Souhrn

Signální kaskády mitogenem-aktivovaných proteinkináz (MAPK) patří mezi významné intracelulární signální dráhy eukaryotních organismů. Tyto kaskády zprostředkovávají percepci, intracelulární transdukcii a amplifikaci širokého spektra signálů vyvolaných nejrůznějšími podněty. U rostlin mohou být tyto podněty jak biotického, tak abiotického původu a v konečném důsledku ovlivňují růst a samotné přežití rostlinného organismu. Signální kaskády MAPK rovněž přenáší signály mající význam při vývoji rostliny, nicméně jakožto dráhy s tímto významem jsou v současné literatuře poněkud opomíjené. Z tohoto důvodu je věnována pozornost výzkumu vývojově významných signálních drah zahrnujících MAPK a identifikaci procesů, do kterých jsou jednotlivé MAPK zapojeny.

Cílem této bakalářské práce bylo ukázat zapojení signálních drah MAPK prostřednictvím studia fenotypu mutantních rostlin *Arabidopsis thaliana mpk6-4* a *mpk6-4 + MPK6AEF*, které vykazují defektní signalizaci prostřednictvím mitogenem-aktivované proteinkinázy 6 (MPK6). Fenotypy byly porovnávány s divokým typem Col-0. Vliv mutací byl studován na celkovém fenotypu s důrazem na uspořádání buněk v kořeni těchto rostlin. Studie byly založeny na mikroskopické charakterizaci mutantních rostlin v porovnání s divokým typem. Pro studium organizace mikrotubulů a lokalizace MPK6 bylo užito imunofluorescenční značení metodou „whole mount“ s detekcí pomocí odpovídajících protilátek proti tubulinu a MPK6. Byly potvrzeny již dříve publikované fenotypové projevy v uspořádání průduchů a determinaci roviny buněčného dělení, rovněž byly identifikovány nové fenotypy a to zejména pro mutantu *mpk6-4 + MPK6AEF*. Výsledky pozorování na buněčné úrovni jednak potvrzují zapojení MPK6 do regulace roviny buněčného dělení a také přináší nové poznatky o lokalizaci MPK6 u mutantu *mpk6-4 + MPK6AEF*.

## Summary

Mitogen-activated protein kinase (MAPK) signalling cascades are fundamental intracellular signalling pathways in eukaryotic organisms. MAPK cascades mediate perception, intracellular transduction and amplification of a broad-spectrum of signals induced by various stimuli. Such stimuli may be of biotic and abiotic origin, ultimately affecting plant growth and survival. However MAPK cascades also mediate signal transduction of developmental significance and as such relevant signalling pathways are undermined in the contemporary literature. For this reason, attention is drawn to research of developmentally important signalling cascades involving MAPKs and to identify the processes in which individual MAPKs are involved.

The aim of this bachelor thesis was to exemplify developmental involvement of MAPK signalling through studies on the phenotype of *Arabidopsis thaliana mpk6-4* and *mpk6-4 + MPK6AEF* mutants of *Arabidopsis thaliana* which exhibit defective signalling through the mitogen-activated protein kinase 6 (MPK6). The phenotypes were compared with wild-type Col-0. The influence of mutations was studied on the phenotype of whole plants emphasizing on root tissue patterning and the organization of microtubules and localization of MPK6 in cells of primary roots of such mutants. Most of the studies depended on microscopic characterization of mutants against their wild type background. Microtubule organization and MPK6 localization in root cells were addressed by the immunofluorescent labelling method of root wholemounts appropriately tagged with anti-tubulin and anti-MPK6 antibodies. Previously published phenotypes on stomatal phenotype and root cell division plane determination were corroborated herein, while novel phenotypes were identified especially in the *mpk6-4 + MPK6AEF* mutant. Observations at the cellular level confirmed the involvement of MPK 6 in regulation of cell division plane orientation and also showed new information about the localization of MPK6 in *mpk6-4 + MPK6AEF* mutant.

Za cenné rady, připomínky, čas a neobyčejně vstřícný přístup velmi děkuji vedoucímu své bakalářské práce Georgiovi Komisi, Ph.D. Můj velký dík patří také doc. Mgr. Miroslavovi Ovečkovi, Ph.D. za konzultace při vlastním psaní práce. V neposlední řadě děkuji také celému kolektivu Oddělení buněčné biologie Centra regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum pod vedením prof. RNDr. Josefa Šamaje, DrSc. za poskytnutí možnosti pracovat v příjemné a přátelské atmosféře tohoto oddělení.

# Obsah

1	Úvod .....	8
2	Cíle práce .....	9
3	Literární přehled .....	10
3.1	Modelový organismus <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh .....	10
3.2	Signální kaskáda mitogenem-aktivovaných proteinkináz .....	11
3.2.1	Struktura a aktivace signální kaskády .....	11
3.2.2	Jednotliví členové signální kaskády u rostlin .....	13
3.2.2.1	Mitogenem-aktivovaná proteinkináza kináza kináza (MAP3K).....	13
3.2.2.2	Mitogenem-aktivovaná proteinkináza kináza (MAP2K) .....	13
3.2.2.3	Mitogenem-aktivovaná proteinkináza (MAPK).....	14
3.2.3	Strukturní motivy interagujících partnerů signální kaskády .....	15
3.2.4	Cílové molekuly a buněčná odpověď .....	16
3.2.5	Regulace signální kaskády.....	17
3.2.6	Lokalizace a prostorové uspořádání signální kaskády .....	18
3.2.7	Komplexita signální dráhy .....	20
3.3	Mitogenem-aktivovaná proteinkináza 6 .....	21
3.4	Buněčné dělení u rostlin .....	23
4	Experimentální část .....	25
4.1	Biologický materiál.....	25
4.2	Metody .....	25
4.2.1	Povrchová sterilizace semen.....	25
4.2.2	Příprava kultivačního média a kultivace rostlin .....	26
4.2.3	Příprava preparátů pro pozorování průduchů .....	27
4.2.4	<i>In vivo</i> značení membrán v buňkách kořene .....	28

4.2.5	Imunofluorescenční značení MPK6 a mikrotubulů metodou „whole mount“ ...	29
4.2.6	Kolokalizační analýza.....	31
4.2.7	Vyhodnocení výsledků .....	32
4.3	Seznam použitých chemikálií .....	32
4.4	Seznam použitých roztoků.....	33
4.5	Přístrojové vybavení laboratoře .....	36
5	Výsledky.....	37
5.1	Uspořádání průduchů.....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
5.2	Celkový fenotyp rostlin .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
5.3	Struktura a uspořádání buněk primárního kořene. ....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
5.4	Organizace mikrotubulů .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
5.5	Lokalizace mitogenem-aktivované proteinkinázy 6.....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
6	Diskuze .....	51
7	Závěr.....	55
8	Seznam použité literatury .....	56
9	Seznam použitých symbolů a zkratk .....	63



# 1 Úvod

Rostliny patří mezi imobilní organismy, což znamená, že se celý svůj život vyskytují na určitém stanovišti. Na rozdíl od mobilních živočichů nemohou toto stanoviště opustit ani v případě změny podmínek jejich životního prostředí. Schopnost přizpůsobit se změnám vnitřního i vnějšího prostředí je tedy pro jejich přežití naprosto klíčová.

Rostliny neustále přijímají signály jak z vnějšího okolí, tak i z vnitřního prostředí svého organismu. Může se jednat o vnější signály vyvolané stresem, ale také například o signály, které se přenášejí mezi buňkami v rámci rostliny. Všechny tyto podněty musí rostlinný organismus přijmout, zpracovat a adekvátně na ně zareagovat. V průběhu evoluce se tak u rostlin vyvinula celá řada signálních drah sloužících ke zpracování nejrůznějších stimulů. Tyto signální dráhy jsou vzájemně propojeny, koordinovány a svou souhrou se podílí na výsledné odpovědi rostlinného organismu na daný podnět.

Významnou roli v signální soustavě rostlin sehraávají signální dráhy mitogenem-aktivovaných proteinkináz (MAPK). Tyto dráhy jsou zapojeny do odpovědi rostlin na biotický i abiotický stres, podílí se rovněž na hormonální signalizaci a na řízení některých vývojových procesů (Colcombet *et* Hirt, 2008). Jedná se o signální kaskádu, která je aktivována prostřednictvím specifických sensorů či receptorů, následně dochází k sekvenční fosforylaci jednotlivých členů, mitogenem-aktivovaných proteinkináz kináz kináz (MAPKKK), mitogenem-aktivovaných proteinkináz kináz (MAPKK) a mitogenem-aktivovaných proteinkináz (MAPK). Aktivovaná MAPK dále fosforyluje příslušné efektorové molekuly, které zabezpečí průběh konečné buněčné odpovědi na daný stimul (Rodriguez *et al.*, 2010).

Studium mutantních rostlin, kde je mutací vyřazen konkrétní člen MAPK kaskády, nebo je jeho aktivita příslušnou mutací pozmeněna, umožňuje odhalit, jak důležitou roli tyto proteinkinázy v signální dráze zaujímají, do jakých vývojových nebo obranných procesů je tato signální dráha zapojena a jaké jsou možné interakce s dalšími členy této signální kaskády, případně s členy jiných signálních drah. Je rovněž možné studovat vztah MAPK i s jinými molekulami a funkčními komponentami buňky jako jsou organely, membrány nebo cytoskelet.

## 2 Cíle práce

1. Cílem teoretické části práce je shrnout současné poznatky týkající signální kaskády mitogenem-aktivovaných proteinkináz a jejich role v rostlinném organismu.
2. Cílem experimentální části je studium fenotypu rostlin *Arabidopsis thaliana* se dvěma rozdílnými mutacemi mitogenem-aktivované proteinkinázy 6 v porovnání s divokým typem rostliny *Arabidopsis thaliana* a dále studium organizace mikrotubulů a vnitrobuněčné lokalizace mitogenem-aktivované proteinkinázy 6 u těchto rostlin pomocí imunofluorescence.

## 3 Literární přehled

### 3.1 Modelový organismus *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh

*Arabidopsis thaliana*, (L.) Heynh. neboli huseníček rolní je dvouděložná krytosemenná rostlina. Řadí se do čeledi *Brassicaceae* tedy brukvovité. Do této čeledi se řadí rovněž ředkev, zelí či řepka, což jsou zemědělsky významné rostliny, nicméně samotný *Arabidopsis thaliana* je rostlina bez zemědělského významu. Nezastupitelnou roli má ovšem *A. thaliana* jakožto modelový organismus. V této souvislosti se o *A. thaliana* nachází zmínky v literatuře již začátkem 20. století. Práce shrnující výhody této rostliny pro její využití jako modelové rostliny pro molekulární biologii a genetiku byla uveřejněna roku 1943 a jejím autorem je Friedrich Laibach (Laibach, 1943; Meyerowitz, 2001). Od 40. let 20. století je tedy *A. thaliana* využíván jako modelový organismus a jeho význam v této oblasti stále roste.

Mezi vlastnosti, které tuto rostlinu předurčují právě k tomuto využití, patří zejména její krátká generační doba, velký počet potomků, nenáročnost na podmínky pěstování, malý počet chromozomů a poměrně malá velikost genomu. Krátká generační doba, která je asi 6 týdnů, umožňuje získat několik generací do roka, navíc z každé rostliny je možné získat velké množství semen. Nenáročnost *A. thaliana* spočívá v tom, že vzhledem k jejich velikosti je možné rostliny pěstovat na malé ploše a také na umělých médiích. Důležitým mezníkem byl rok 2000, kdy bylo dokončeno osekvenování celého genomu *A. thaliana*, který obsahuje 25 498 genů (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Genom *A. thaliana* obsahuje velký počet genů, které jsou přítomny také u zemědělsky významných plodin a výzkum využívající *A. thaliana* jako modelový organismus tak přináší řadu informací například o vývoji či odolnosti, které mohou najít praktické uplatnění. Důležitou je v tomto směru rozsáhlá kolekce inzerčních mutantů *A. thaliana*, která je významným zdrojem pro výzkum funkce jednotlivých genů a jejich produktů.

## 3.2 Signální kaskáda mitogenem-aktivovaných proteinkináz

Signální kaskáda, která je zprostředkována mitogenem-aktivovanými proteinkinázami (MAPK), je univerzální intracelulární signální dráha vyskytující se u eukaryotních organismů a to jak u živočichů, tak u rostlin. Přenáší řadu stimulů a je schopna aktivovat širokou škálu odpovědí na úrovni buňky, potažmo celého organismu.

Jak již bylo zmíněno, signální kaskády MAPK jsou zapojeny do řady procesů probíhajících v rostlinném těle. Hojně studovanou oblastí je zapojení MAPK do reakcí rostlin na stresové podmínky. Abiotickým stresem může být pro rostliny například změna intenzity osvětlení, změna teploty, nedostatek či nadbytek vody a v ní rozpuštěných látek. Jako biotický stres lze potom uvést interakci s patogeny či rostlinnými škůdci. Neméně důležité je zapojení MAPK signalizace do procesů se stresem přímo nesouvisejících – do vývojových procesů a do hormonálních regulací (Rodriguez *et al.*, 2010).

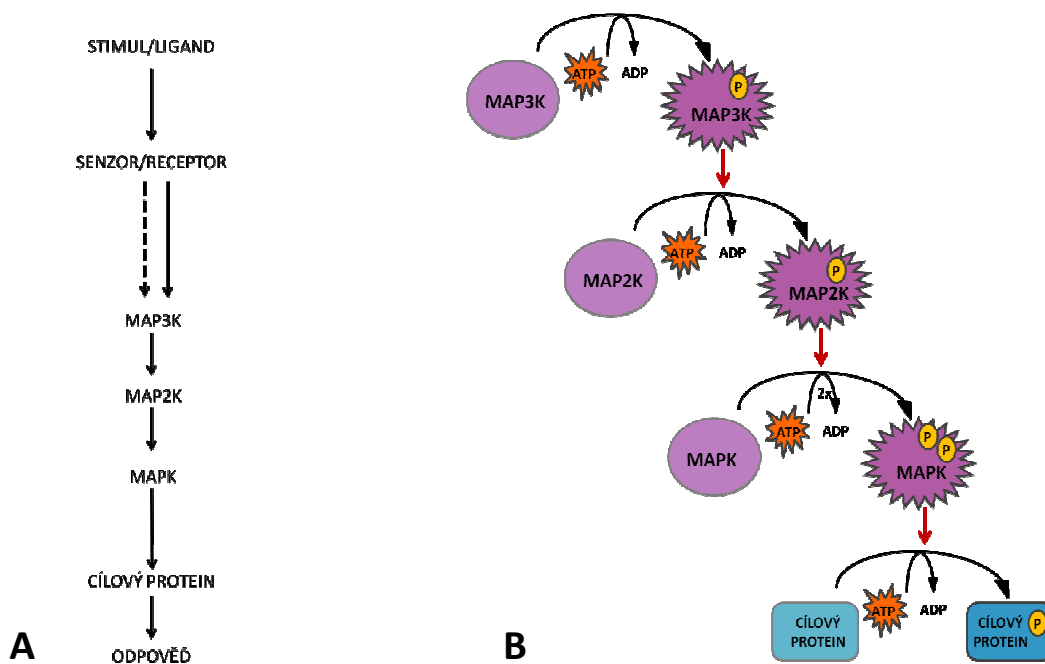
Objevení MAPK se váže k objevu specifického proteinu v živočišných buňkách. Tento sledovaný protein po stimulaci inzulinem fosforyloval konkrétní protein asociovaný s mikrotubuly, označovaný jako MAP-2 (Microtubule-Associated Protein 2), proto byl nazván MAP-2 kináza (Sturgill *et Ray*, 1986). Následně bylo zjištěno, že tento protein patří k širší skupině proteinů, které jsou fosforylovány na svých tyrosinových reziduích v reakci na přítomnost faktorů spouštějících mitózu (tzv. mitogenů). Proto byla tato skupina proteinů nazvána mitogenem-aktivované proteinkinázy (Rossomando *et al.*, 1987). V současné době je známo, že signální dráhy, na kterých se podílí MAPK, se nachází také u rostlin a hub. Rovněž bylo později objasněno, že MAPK jsou zapojeny i do procesů, které nesouvisí s buněčným dělením, avšak pojmenování této skupiny proteinů již zůstalo zachováno.

### 3.2.1 Struktura a aktivace signální kaskády

Signální dráha prostřednictvím mitogenem-aktivovaných proteinkináz umožňuje přenos a amplifikaci různorodých signálů jak vnitrobuněčných, mezibuněčných, tak i signálů přicházejících z okolního prostředí buňky (Ichimura *et al.*, 2002). Signální dráha je tvořena třístupňovou kaskádou, v níž dochází k sekvenční fosforylaci a tudíž i k aktivaci členů na jednotlivých stupních kaskády (Mishra *et al.*, 2006). MAPK jsou uspořádány v modulech a mohou tvořit i dočasné multienzymové komplexy. Enzymatická aktivita kináz se vyznačuje

schopností fosforylovat určité substráty, v tomto případě další proteiny. V obecné rovině vede fosforylace určitého proteinu k post-translační změně v jeho struktuře a tím také k jeho aktivaci.

Aktivace signální kaskády začíná u receptorů či senzorů, které po přijetí odpovídajícího stimulu spouští přenos signálu na další členy signální dráhy. Přímou či prostřednictvím dalších posílů dochází k fosforylaci mitogenem-aktivované proteinkinázy kinázy (MAP3K či MAPKKK), která je prvním členem signálního modulu. Tato fosforylace vede k její aktivaci. Aktivovaná MAP3K následně fosforyluje a tím aktivuje druhého člena modulu této signální kaskády, mitogenem-aktivovanou proteinkinázu kinázu (MAP2K nebo také MKK). Aktivovaná MAP2K poté fosforyluje mitogenem-aktivovanou proteinkinázu (MAPK, MPK). Aktivovaná MAPK je schopna fosforylovat a tím regulovat aktivitu cílových proteinů, jako jsou jiné proteinkinázy, transkripční faktory nebo proteiny cytoskeletu (Rodriguez *et al.*, 2010). Proces aktivace signální dráhy a přenosu signálů v rámci kaskády mitogenem-aktivovaných proteinkináz stručně vystihuje Obr. 1.



**Obr. 1** Signální kaskáda mitogenem-aktivovaných proteinkináz. Aktivace signální dráhy (A) a jednotlivé aktivační kroky v průběhu signalizace prostřednictvím třístupňové kaskády (B)

MAP3K = mitogenem-aktivovaná proteinkináza kináza kináza, MAP2K = mitogenem-aktivovaná proteinkináza kináza, MAPK = mitogenem-aktivovaná proteinkináza, ATP = adenosintrifofát, ADP = adenosindifofát, P = fosfátová slupina

## 3.2.2 Jednotliví členové signální kaskády u rostlin

### 3.2.2.1 Mitogenem-aktivovaná proteinkináza kináza kináza (MAP3K)

Mitogenem-aktivované proteinkinázy kinázy kinázy (MAP3K) se řadí mezi serin/threonin kinázy, tedy kinázy fosforylující serinové či threoninové aminokyselinové zbytky v proteinech. MAP3K aktivují podřízené MAP2K prostřednictvím fosforylace dvou aminokyselin, a to ve specifickém strukturním motivu na aktivační smyčce molekuly MAP2K (Colcombet *et Hirt*, 2008).

MAP3K tvoří nejpočetnější skupinu mezi jednotlivými členy kaskády. Analýza genomu rostlinného modelového organismu *A. thaliana* odhalila 80 členů této skupiny (Colcombet *et Hirt*, 2008, Pitzschke *et al.*, 2009). Podle strukturní analýzy založené na pořadí aminokyselin v katalytické doméně u jednotlivých členů byla skupina rozdělena na dvě třídy podle podobnosti s již známými MAP3K u savců či kvasinek. První je třída MEKK proteinových kináz, jejíž členové mají podobnost s MEKK1, což je konkrétní MAP3K u savců, a také s Ste11 a BCK1, což jsou konkrétní MAP3K u kvasinek. Druhou třídou je třída RAF proteinových kináz. Členové této třídy vykazují strukturní podobnosti s RAF1 vyskytující se u savců (Ichimura *et al.*, 2002).

### 3.2.2.2 Mitogenem-aktivovaná proteinkináza kináza (MAP2K)

Mitogenem-aktivované proteinkinázy kinázy (MAP2K) jsou dvojitě specifické kinázy. Stejně jako MAP3K se řadí mezi serin/threonin kinázy, navíc patří také do skupiny tyrozin kináz fosforylujících tyrozinové aminokyselinové zbytky v proteinech. Sobě podřízené MAPK aktivují za dvojitě fosforylace tyrozinového a threoninového zbytku ve specifickém motivu na aktivační smyčce MAPK (Colcombet *et Hirt*, 2008).

Jak již bylo zmíněno, MAP2K mají ve své struktuře specifický motiv obsahující serinové či threoninové aminokyselinové zbytky, které jsou fosforylovány MAP3K. Tento motiv se nachází v aktivační smyčce molekuly MAP2K a má následující aminokyselinovou sekvenci S/T-X<sub>3-5</sub>-S/T (S-serin, T-threonin, X-libovolná aminokyselina). Tato sekvence je podobná sekvenci, která byla nalezena u živočišných MAP2K (Bardwell *et Thorner*, 1996).

Pro interakci s podřízenými MAPK nesou MAP2K na svém N-konci důležitou sekvenci, tzv. D-doménu (z anglického Docking Domain), která je kompatibilní s tzv. CD-doménou (z anglického Conserved/Common Docking Domain) u MAPK. Tato specifická sekvence MAP2K se skládá z bazických reziduí lysinu či argininu a hydrofobních reziduí leucinu či izoleucinu. Pořadí aminokyselin v této sekvenci je následující [K/R][K/R][K/R]X<sub>1-5</sub>[L/I]X[L/I] (K-lysin, R-arginin, L-leucin, I-izoleucin, X-libovolná aminokyselina) (Ichimura *et al.*, 2002).

V genomu *A. thaliana* bylo identifikováno 10 MAP2K (Rodriguez *et al.*, 2010). Podle sekvenční analýzy byly MAP2K rozděleny do 4 skupin A-D. Mezi jednotlivými skupinami se nacházejí strukturální rozdíly (Ichimura *et al.*, 2002). Mezi ty významné patří např. absence intronů u členů skupiny C a D nebo přítomnost domény pro jaderný transportní faktor (NTF) (Hammel *et al.*, 2006), který zprostředkovává transport molekul do jádra.

### 3.2.2.3 Mitogenem-aktivovaná proteinkináza (MAPK)

Mitogenem-aktivované proteinkinázy (MAPK) jsou posledními členy popisované signální kaskády. Stejně jako ostatní členové kaskády se řadí mezi serin/threonin kinázy a po aktivaci jsou tak schopny fosforylovat cílové proteiny. Jsou aktivovány MAP2K, které fosforylují tyrozinový a threoninový aminokyselinový zbytek v tzv. TXY-motivu (T-threonin, Y-tyrosin, X-libovolná aminokyselina). Tento motiv je přítomen na aktivační smyčce cílové molekuly MAPK (Ichimura *et al.*, 2002).

Jak již bylo uvedeno, dalším motivem, který můžeme ve struktuře MAPK nalézt, je tzv. CD-doména, která se podílí na interakci s MAP2K. Z její aminokyselinové sekvence [LH][LHY]DXX[DE]XX[DE]EPXC (L-lysin, H-histidin, Y-tyrosin, D-kys. asparagová, E-kys. glutamová, P-prolin, C-cystein, X-libovolná aminokyselina) jsou velmi důležitá rezidua kyseliny glutamové a asparagové, která interagují s bazickými rezidui lysinu a argininu u MAP2K (Tanoue *et al.*, 2000). Analogicky potom také hydrofobní rezidua lysinu, histidinu a tyrosinu u CD-domény interagují s hydrofobními rezidui leucinu či izoleucinu u MAP2K.

V genomu *A. thaliana* bylo nalezeno 20 MAPK, které jsou členěny do 4 skupin A-D. V těchto skupinách nalezneme dva subtypy MAPK v závislosti na struktuře jejich

TXY-motivu. Skupiny A, B a C obsahují členy, kteří nesou motiv TEY (T-threonin, E-kys. glutamová, Y-tyrosin), zatímco ve skupině D nalezneme členy nesoucí motiv TDY (T-threonin, D-kys. asparagová, Y-tyrosin). Další odlišnosti můžeme najít ve struktuře CD-domény. Zatímco členové skupin A a B nesou evolučně konzervovanou CD-doménu, u členů skupiny C se shledáváme s modifikovanou formou a u členů skupiny D tato doména chybí (Ichimura *et al.*, 2002).

### 3.2.3 Strukturní motivy interagujících partnerů signální kaskády

Jelikož signální kaskáda MAPK zprostředkovává přenos daného signálu prostřednictvím fosforylace jednotlivých členů kaskády a v posledním kroku fosforylací cílové molekuly, je nesmírně důležité, aby jednotliví členové dané signální dráhy reagovali pouze s odpovídajícími vazebnými partnery. Pokud by tato podmínka nebyla splněna, reakce vazebných partnerů signální dráhy by nebyly dostatečně specifické a signální kaskáda by tak nevyvolala požadovanou buněčnou odpověď. Za situace, že by členové signální kaskády interagovali nespecificky s odlišnými molekulami, by navíc mohlo docházet k nežádoucím výstupům signální kaskády.

Zajištění specifity interakce odpovídajících partnerů je založeno na protein-proteinových interakcích, které využívají řadu specifických motivů a domén (Tanoue *et al.*, 2003). Jedním z nejvýznamnějších je tzv. CD-doména na molekulách MAPK, o které již bylo výše pojednáváno. Důležitým faktem je, že tato doména se nijak nepřekrývá s katalytickou doménou MAPK. Zmíněná interakce při rozpoznání vazebných partnerů tedy není stejnou interakcí jako interakce enzym-substrát, která se odehrává prostřednictvím aktivního místa enzymu (Fukuda *et al.*, 1997). CD-doména neslouží MAPK pouze při interakci s MAP2K, ale také při interakci MAPK s fosfatázami a cílovými molekulami dané signální kaskády. Jedná se tedy o doménu, která je využívána univerzálně při interakci MAPK s vazebnými partnery.

V primární sekvenci cílových molekul, ale také MAP2K a fosfatáz, se nachází tzv. D-doména. Jedná se opět o doménu, která je využívána univerzálně při interakci MAPK s vazebnými partnery. D-doména bývá také označována jako KIM-motiv (z anglického Kinase Interacting Domain). Tato doména je komplementární k CD-doméně u MAPK.



Principem interakce CD-domény a D-domény jsou elektrostatické interakce vznikající mezi negativně nabitými aminokyselinami v CD-doméně a pozitivně nabitými molekulami v D-doméně (Tanoue *et al.*, 2003).

Alternativním motivem k D-doméně, která se nachází na cílových molekulách MAPK, je tzv. DEF doména (z anglického Docking Site for ERK FXF). Tato doména je nejčastěji charakterizována aminokyselinovou sekvencí FXFP (Sheridan *et al.*, 2008). Jedná se tedy o strukturní motiv, který je tvořen dvěma molekulami fenylalaninu, které jsou odděleny jednou libovolnou aminokyselinou, a následuje za nimi jedna molekula prolinu. Tento motiv byl nalezen především u transkripčních faktorů, které jsou známé jako cílové molekuly MAPK (Fantz *et al.*, 2001). Motiv FXFP interaguje s tzv. hydrofobní kapsou („hydrophobic pocket“), která se nachází na molekule MAPK (Sheridan *et al.*, 2008).

Doposud zmiňované strukturní motivy se účastní protein-proteinových interakcí, které jsou nezbytné k dosažení specifity výsledné buněčné odpovědi. K samotné fosforylaci cílových molekul příslušnou MAPK však dochází v odlišném místě, v tzv. SP/TP motivu. Jde o místa, kde se v primární struktuře cílové molekuly nachází serin či threonin, za kterým následuje prolin. Tento dipeptid se v cílových molekulách nachází alespoň jedenkrát, není ovšem výjimkou, že se tyto dipeptidy vyskytují v klastrech (Pitzschke, 2015).

### **3.2.4 Cílové molekuly a buněčná odpověď**

Jak vyplývá z předchozí podkapitoly, aby bylo možné označit určitou molekulu jako cílový substrát MAPK, musí daná molekula obsahovat dva základní sekvenční motivy – D-doménu, eventuelně FXFP motiv, které zajistí specifickou interakci s MAPK a alespoň jeden SP/TP motiv, ve kterém je poté daný substrát fosforylován.

Aktivované MAPK fosforylují širokou škálu cílových molekul. Mezi tyto molekuly se řadí například proteiny asociované s cytoskeletem (Limmongkon *et al.*, 2004), transkripční faktory či jiné kinázy (Popescu *et al.*, 2009). V závislosti na typu fosforylované molekuly se odvíjí také časová závislost odpovídající buněčné odpovědi. Po fosforylaci proteinů asociovaných s cytoskeletem může docházet přímo k poměrně rychlým vnitrobuněčným přestavbám (Šamajová *et al.*, 2013), zatímco po aktivaci transkripčních faktorů naopak

dochází ke změnám založeným na globálnějších změnách genové exprese, odehrávajícím se v delším časovém rámci.

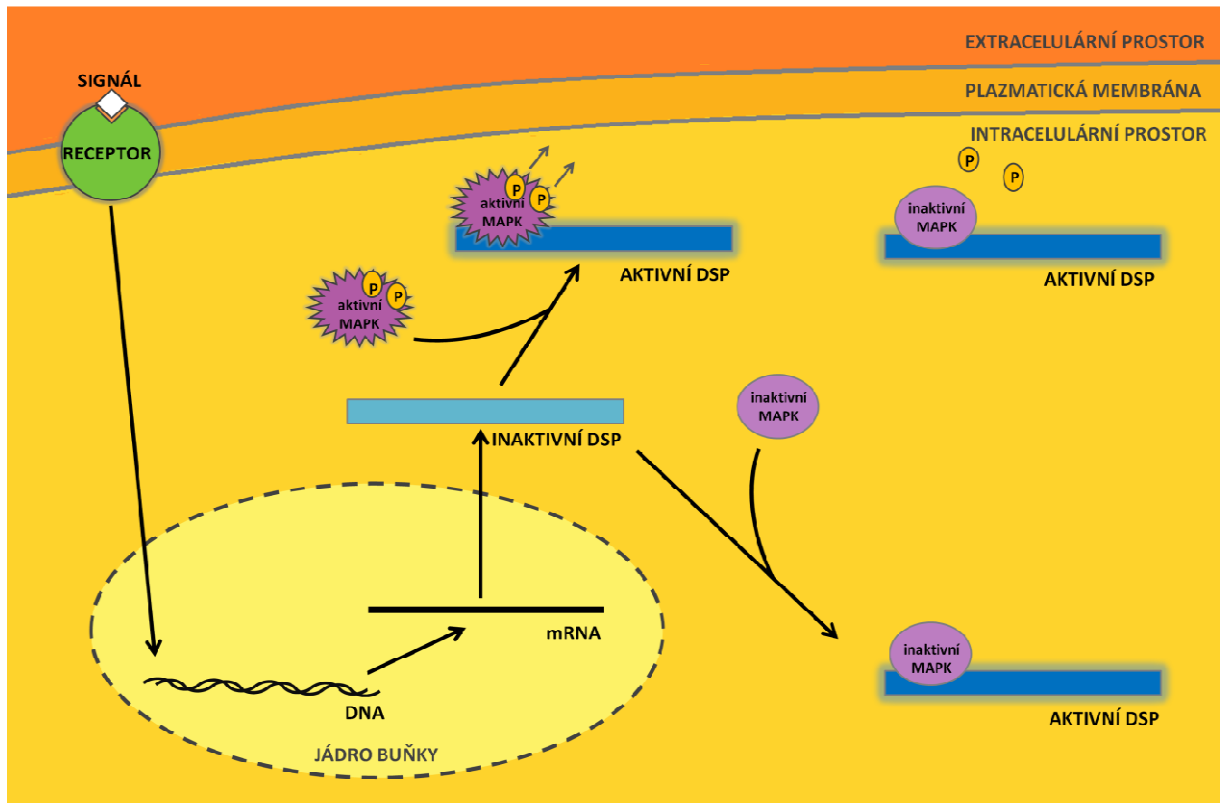
### 3.2.5 Regulace signální kaskády

Pro správnou funkci signálních drah v organismech je stejně jako ve všech ostatních případech fyziologických procesů nutná přesná regulace. Na správné regulaci závisí, zda bude odpověď organismu na daný stimul adekvátní, či ne. V případě přílišného utlumení signální dráhy nebude předávaný signál dostatečně silný k vyvolání odpovědi. Naopak při nedostatečné regulaci může nastat situace, kdy předávaný signál stimuluje neadekvátní, nadměrnou reakci organismu, která může v důsledku vyústit v patologické stavy dané buňky až celého organismu.

Za deaktivaci, a tudíž za ukončení přenosu signálu prostřednictvím kaskády MAPK, jsou zodpovědné fosfatázy. Tyto enzymy defosforylací tyrozinového a threoninového aminokyselinového zbytku v TXY-motivu deaktivují MAPK (Meskiene *et al.*, 1998; Mishra *et al.*, 2006). Nejvýznamnější skupinou fosfatáz zapojených do tohoto procesu je skupina dvojité specifické fosfatáz (DSP), které zajišťují defosforylaci threoninového i tyrozinového zbytku v TXY-motivu příslušné MAPK (Camps *et al.*, 2000). Celkově bylo v genomu *A. thaliana* nalezeno 11 DSP. Příkladem může být AtDsPTP1 (*Arabidopsis thaliana* Dual Specificity Protein Tyrosine Phosphatase), která byla izolována, a bylo dokázáno, že inaktivuje AtMPK4 *in vitro* (Gupta *et al.*, 1998).

Model popisující možný způsob regulace kaskády prostřednictvím DSP (Obr. 2) předpokládá, že v prvním kroku je pomocí příchozího stimulu aktivována zvýšená exprese genu či skupiny genů pro DSP. Vstupní stimul může být přenášen prostřednictvím samotných MAPK, ale je možné, že ho zprostředkovává i jiná signální kaskáda. Přepisem DSP mRNA (mediátorové RNA DSP genů) do molekuly proteinu vzniká enzymaticky inaktivní DSP, která se přesouvá na specifická místa, ve kterých je v rámci buňky lokalizována. Zde se po setkání se svou cílovou MAPK váže na její molekulu a aktivuje se tak její katalytická doména. Je-li cílová MAPK fosforylována, tedy v aktivním stavu, způsobí příslušná DSP její defosforylaci. Tímto krokem se z aktivní MAPK stává neaktivní molekula. DSP je však

schopna navázat i inaktivní MAPK, čímž pravděpodobně zabraňuje její možné aktivaci, což je další možný způsob, jak je kaskáda MAPK regulována (Camps *et al.*, 2000).



**Obr. 2** Předpokládaný sled dějů v průběhu regulace kaskády mitogenem-aktivovaných proteinkináz prostřednictvím dvojité specifických fosfatáz. Upraveno dle Camps *et al.* (2000).

DNA = deoxyribonukleová kyselina, mRNA = mediátorová ribonukleová kyselina, DSP = dvojité specifická fosfatáza, MAPK = mitogenem-aktivovaná proteinkináza, P = fosfátová skupina

### 3.2.6 Lokalizace a prostorové uspořádání signální kaskády

Stejně důležitou roli jako modulace síly a doby trvání signálu sehrává v signální dráze také regulace prostorového uspořádání a lokalizace jednotlivých signálních molekul v rámci buňky. Toto prostorové rozmístění může mít výrazný vliv na specifitu signální dráhy a také na druh výsledné odpovědi na vstupní stimul.

Lokalizace jednotlivých MAPK v rámci buňky není závislá pouze na jednom faktoru, ale může být dána více způsoby. Jedním z faktorů ovlivňujících lokalizaci MAPK je dostupnost cílových molekul substrátu dané MAPK v rámci buňky, která může být omezena jen na některé buněčné kompartmenty. Lokalizaci či relokizaci MAPK mohou ovlivňovat také nadřazené MAP2K (Yoo *et al.*, 2008) či příslušné fosfatázy (Zaïdi *et al.*, 2010). Například jaderná lokalizace některých MAPK tak může být řízena přítomností NLS (Nuclear Localization Signal) ve vlastní molekule MAPK či v molekule jejich vazebných partnerů.

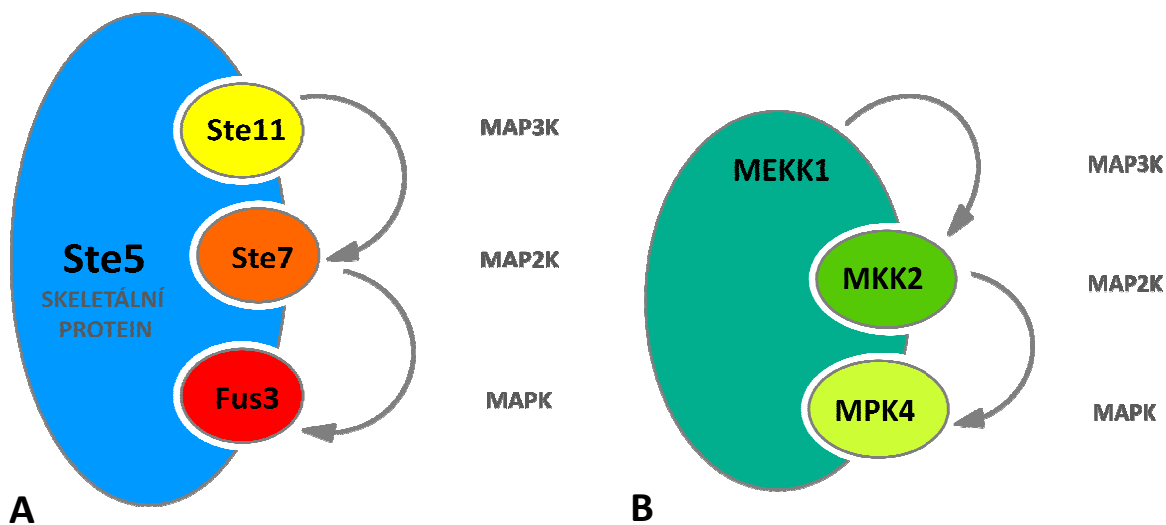
Významným činitelem, který ovlivňuje lokalizaci a specificitu signální kaskády MAPK jsou tzv. skeletální proteiny (anglicky „scaffolds“). Samy o sobě nemají klasické skeletální proteiny žádnou enzymatickou aktivitu, přesto se ukazuje, že sehrávají důležitou roli v řadě signálních drah. Jedná se o různorodou skupinu multidomérových proteinů. Při porovnání již známých skeletálních proteinů nebyla zjištěna žádná zásadní sekvenční podobnost a nebyly objeveny žádné společné motivy. Prozatím se tedy zdá, že se nejedná o skupinu příbuzných proteinů (Zeke *et al.*, 2009). Prvním z dobře charakterizovaných skeletálních proteinů byl protein Ste5, který váže Ste11, Ste7 a Fus3 (Obr. 3A), což jsou komponenty MAPK kaskády u kvasinek (Choi *et al.*, 1994).

Přestože se jedná o různorodou skupinu proteinů, typickou a pro všechny společnou vlastností je jejich schopnost vázat několik členů signální dráhy současně. Signální molekuly se díky této vazbě dostávají do relativní blízkosti. Skeletální proteiny vytváří jakési mikroprostředí v rámci buňky, v jehož prostoru je vyšší koncentrace signálních enzymů a jejich substrátů. Signální molekuly tak spolu mohou reagovat s vyšší rychlostí a pravděpodobností, než kdyby byly volně rozptýleny v prostoru buňky. V případě dráhy MAPK jsou na jeden skeletální protein navázáni všichni členové signální kaskády – MAP3K, MAP2K a MAPK, a vytváří tak multienzymový komplex (Zeke *et al.*, 2009).

Prostorové přiblížení reagujících partnerů není jediným aspektem, který vyplývá ze schopnosti skeletálních proteinů vázat zároveň více signálních molekul. Vazba signálních molekul na skeletální protein umožňuje, aby byly všechny tyto molekuly jako komplex snadno shromažďovány na určitém místě v buňce, což může měnit jejich dostupnost pro další interakce (Brown *et Sacks*, 2009).

Je známo, že signální dráhy sdílí určité své komponenty, tedy, že jedna signální molekula může být zapojena do více signálních drah. Skeletální proteiny jsou schopny vázat různé kombinace signálních molekul a utvářet tak rozličné odlišné moduly, které však mohou mít některou ze signálních molekul společnou.

Překvapivě bylo zjištěno, že funkci skeletálních proteinů nemusí zastávat jen skeletální proteiny jako takové, ale že tuto funkci mohou mít i samotní členové signální kaskády. Vlastnosti skeletálních proteinů byly zjištěny například pro MEKK1, což je MAP3K u *A. thaliana*, která je schopna vázat podřízenou MAP2K MKK2 i MAPK MPK4 (Suarez-Rodriguez *et al.*, 2007). Tyto vztahy jsou schematicky zobrazeny na obrázku 3B. Podrobnější prozkoumání možnosti zapojení molekul MAP3K jako skeletálních proteinů by mohlo pomoci osvětlit, jak může jedna MAP3K aktivovat specificky více signálních kaskád v odlišných procesech.



**Obr. 3** Schematické znázornění vazby signálních molekul na skeletální protein

### 3.2.7 Komplexita signální dráhy

Rostlinné tělo se skládá z velkého počtu buněk, které jsou funkčně specializované. Jednotlivé specializované buňky se shlukují v rostlinné tkáni a orgány, které tvoří strukturovaný celek, pro nějž je klíčové koordinovat činnost jednotlivých složek. K tomu slouží celá síť signálních drah a to jak intercelulárních, tak intracelulárních. Signální dráhy

jako celek, ale rovněž jako samostatné signální jednotky, se vyznačují značnou komplexitou. Rostlinný organismus přijímá nesčetné informace různého charakteru. Signální dráhy mu svou komplexitou umožňují příjem těchto signálů, jejich přenos, amplifikaci a integraci vedoucí k výsledné interpretaci a konečné odpovědi.

Jak již bylo zmíněno, signální kaskáda MAPK se řadí mezi intracelulární signální dráhy a přenáší tedy signál v rámci vnitřního prostředí buňky. Je složena z poměrně velkého množství komponent a v jejím fungování můžeme pozorovat určité jevy. Prvním z nich je tzv. crosstalk, což je označení popisující propojení jednotlivých signálních drah v určitém místě (Mishra *et al.*, 2006). Jedna nebo více složek jedné signální dráhy může ovlivnit jinou signální dráhu. Velmi často k tomu dochází sdílením některých komponent signální kaskády. Některé proteinkinázy tak fosforylují a tím také regulují složky signální dráhy, jíž jsou samy součástí, ale také dalších signálních drah. Tento fakt napomáhá k výměně informací mezi jednotlivými dráhami a k integraci signálů pocházejících z různých zdrojů.

Druhým jevem typickým pro některé MAPK je funkční redundance. Dvě či více odlišných signálních komponent mohou svou aktivitou vyústit v obdobné či stejné účinky. Příkladem této situace je funkční redundance MPK3 a MPK6 v procesu regulace vytváření průduchů u *A. thaliana*. Zatímco rostliny s mutací jednotlivých MAPK se vyvíjí za standardních podmínek normálně, dvojitá mutace *mpk3/mpk6*, jejíž nositelé by neobsahovali funkční MPK3 ani MPK6, je pro embrya rostlin letální (Wang *et al.*, 2007). Dále mohou být některé molekuly kaskády MAPK zapojeny do regulace více odlišných odpovědí, rozdílné MAPK mohou být naopak aktivovány za stejných podmínek prostřednictvím odlišných signálních kaskád a rovněž může být tatáž molekula MAPK aktivována v různorodých situacích s odlišnými výstupy (Šamajová *et al.*, 2013).

### **3.3 Mitogenem-aktivovaná proteinkináza 6**

Mitogenem-aktivovaná proteinkináza 6 (MPK6) patří spolu s mitogenem-aktivovanou proteinkinázou 3 (MPK3) a 4 (MPK4) mezi nejlépe prostudované MAPK u *A. thaliana*. Stejně jako většina ostatních MAPK je MPK6 zapojena do různých signálních drah, ve kterých má odlišné interagující partnery a to jak na úrovni nadřazených MAP3K a MAP2K, tak na úrovni molekul cílových substrátů. K aktivaci těchto drah může docházet

na základě rozdílných podnětů a jednotlivé dráhy tak mohou být zapojeny do řízení procesů provozních, obranných nebo vývojových.

V kontextu reakcí rostlin na stres bylo prokázáno, že MPK6 je aktivována v rostlinách, které byly vystaveny zvýšené koncentraci ozonu (Miles *et al.*, 2005), rovněž v reakci na osmotický stres (Kim *et al.*, 2012), solný a také chladový stres (Teige *et al.*, 2004). Zvýšenou aktivací MPK6 reagovaly také rostliny, které přišly do styku s molekulárními komplexy asociovanými s patogeny (Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMP) (Nühse *et al.*, 2000; Asai *et al.*, 2002) a genotoxickým stresem vyvolaným ultrafialovým zářením UV-B (Ulm *et al.*, 2002). V řadě z výše zmíněných procesů funguje MPK6 redundantně spolu s MPK3 či MPK4.

V oblasti vývojových procesů bylo prokázáno, že MPK6 se účastní procesu regulace při vytváření průduchů. Jako MAP3K, která je v tomto procesu zapojena, funguje protein YODA. U mutantů se ztrátou funkce tohoto proteinu dochází k nadměrné produkci a akumulaci průduchů, zatímco u mutantů se zvýšenou aktivitou proteinu YODA je patrná eliminace průduchů (Bergmann *et al.*, 2004). Obdobný fenotyp vykazovaly také mutantní rostliny podřízených MAP2K MKK4 a MKK5, rovněž i mutantní rostliny MPK3 a MPK6. Bylo prokázáno, že i tyto molekuly jsou zapojeny do procesu regulace tvorby průduchů a že jim nadřazená MAP3K je právě protein YODA (Wang *et al.*, 2007). Jak je z předchozího textu zjevné, proces regulace vytváření průduchů je jedním z příkladů funkční redundance MPK3 a MPK6. Další studie ukazují vliv MPK6 na vývoj embrya, primárních a postranních kořenů a vývoj květenství s projevy snížené samčí fertility (Bush *et al.*, 2007; López-Bucio *et al.*, 2013). V závislosti na pozorovaných fenotypech mutantních linií MPK6 se předpokládá také zapojení této MAPK do procesů účastnících se buněčného dělení (Müller *et al.*, 2010). Obdobné fenotypy byly pozorovány také u mutantů proteinu YODA, což naznačuje, že by YODA v tomto procesu mohl fungovat jako nadřazená MAP3K pro MPK6 (Smékalová *et al.*, 2014).

V rámci buňky byla MPK6 lokalizována v jádře a bylo popsáno její indukovatelné přemísťování mezi jádrem a cytoplazmou (Yoo *et al.*, 2008). Dalšími strukturami v rámci buňky, kde byla popsána lokalizace MPK6 jsou preprofázní svazek (PPB) a fragmotplast, tedy některé mikrotubulární struktury dělicích se buněk, dále „trans-Golgi network“ a plazmatická membrána (Müller *et al.*, 2010).

### 3.4 Buněčné dělení u rostlin

Buněčné dělení je jedním z vývojových procesů, u nichž bylo prokázáno zapojení signální kaskády MAPK. Jedním ze základních specifíků rostlinného typu eukaryotní buňky, projevující se také v procesu buněčného dělení, je přítomnost buněčné stěny. Zatímco u živočichů dochází k oddělení buněk zaškrcením mateřské buňky pomocí kontraktálního prstence, u rostlin vzniká buněčná přepážka *de novo* uvnitř buňky.

Buněčná stěna je poměrně rigidní struktura, která rostlinným buňkám propůjčuje pevnost, odolnost a napomáhá udržení jejich tvaru. Zároveň však rostlinné buňky omezuje v pohybu a také reguluje jejich růst. Poloha buněk v rámci rostlinných pletiv je fixována buněčnou stěnou. Konečný tvar jednotlivých buněčných pletiv a konečný tvar rostliny je tedy určen vzájemným uspořádáním sousedních buněk, které je, jak z předchozího textu vyplývá, dáno polohou nové buněčné přepážky vznikající při buněčném dělení. Jedním z důležitých procesů při vývoji rostlinných organismů se tak stává, kromě jiného, kontrola prostorové orientace roviny buněčného dělení.

Ke vzniku nové buněčné přepážky dochází v průběhu buněčného dělení v procesu zvaném cytokineze, což je proces samotného fyzického oddělení nově vznikajících dceřiných buněk z jedné buňky mateřské. U rostlinných buněk se vyvinuly unikátní specializované cytoskeletální struktury, které jsou zapojeny do buněčného dělení. První z těchto struktur se nazývá preprofázní svazek (PPB) a její hlavní složkou jsou mikrotubuly. PPB vzniká během  $G_2$  fáze buněčného cyklu reorganizací kortikálních mikrotubulů a definuje místo a orientaci roviny buněčného dělení ještě před jeho začátkem (Pickett-Heaps *et Northcote*, 1966). Mikrotubuly spolu s aktinovými filamenti vytvoří prstenec v místě budoucí roviny dělení a následně do takto naznačené roviny putuje také jádro. Struktura PPB je na přechodu profáze a prometafáze rozrušena (Müller *et al.*, 2009).

Po rozdělení jaderné hmoty pomocí mikrotubulární struktury nazývané dělicí vřeténko dochází ke vzniku další specializované struktury rostlinných buněk – fragmoplastu. Fragmoplast je tvořen především mikrotubuly, ale také aktinovými filamenti. Mikrotubuly jsou ve struktuře fragmoplastu uspořádány jako dvě protilehle uložené sady vláken (Jürgens, 2005). Podél těchto vláken jsou do centrální zóny fragmoplastu dopravovány vezikuly obsahující polysacharidy a další stavební látky nezbytné ke stavbě nové buněčné přepážky



(Geldner *et al.*, 2001). V centrální rovině dochází k fúzi těchto váčků, která vede k expanzi nově vznikající buněčné přepážky.

Jak je patrné z předchozího textu, nesmírně důležitou složkou jsou v procesu buněčného dělení mikrotubuly. Jednou z možných variant regulace mikrotubulů a jejich dynamiky je jejich interakce s proteiny asociovanými s mikrotubuly (microtubule associated protein, MAP). Mezi MAP se řadí proteiny, které s mikrotubuly interagují různým způsobem a mohou se také vázat na různá místa. Jedním z příkladů takovéto interakce může být protein MAP65-1 (microtubule associated protein 65-1), který je schopný vázat sousední mikrotubuly a tvořit z nich svazky (Jiang *et al.*, 1993). Tento protein patří mezi cílové molekuly MAPK a je jimi fosforylován. Bylo prokázáno, že je fosforylován například MAPK NRK1, která je posledním členem signální kaskády NACK-PQR u tabáku (Sasabe *et al.*, 2006). Tato signální kaskáda má své příslušné orthology také u *A. thaliana*, mezi které patří ANP 1 (rovněž také ANP2 a ANP3), MKK6 a MPK4 (Krysan *et al.*, 2002; Soyano *et al.*, 2003; Kosetsu *et al.*, 2010). Je známo, že aktivita těchto drah souvisí s dynamikou mikrotubulů ve struktuře fragmoplastu (Nishihama *et al.*, 2001). Protein MAP65-1 je fosforylován také prostřednictvím MPK6 (Smertenko *et al.*, 2006; Hoehenwarter *et al.*, 2013). Mutantní rostliny této MAPK rovněž vykazují poruchy buněčného dělení (Müller *et al.*, 2010; Smékalová *et al.*, 2014).

Je zřejmé, že průběh cytokineze může být mimo jiné ovlivňován také signály zprostředkovanými MAPK. Pokud tedy dojde k narušení některé signální kaskády MAPK zapojené do této regulace je pravděpodobné, že dojde také k narušení samotného procesu buněčného dělení, což se významně projeví i na morfologii rostlinného organismu.

## 4 Experimentální část

### 4.1 Biologický materiál

*Arabidopsis thaliana* divoký typ, ekotyp Columbia (Col-0).

*Arabidopsis thaliana* „knock-out“ mutant *mpk6-4*.

Tento mutant byl vytvořen inzercí T-DNA ve třetím exonu genu pro MPK6 v rostlinách *Arabidopsis thaliana* ekotyp Col-0. Tento mutant byl testován pomocí RT-PCR na přítomnost RNA produktu tohoto genu a byl vyhodnocen jako negativní (Bush *et* Krysan, 2007). U tohoto mutantu tedy nedochází k produkci funkčního proteinového produktu MPK6 genu.

*Arabidopsis thaliana* „dominant-negative“ mutant *mpk6-4 + MPK6AEF*.

Tento mutant byl vytvořen vnesením konstruktů MPK6AEF do mutantních rostlin *mpk6-4* (Bush *et* Krysan, 2007). V konstruktě MPK6AEF byly změněny dva kodony, které se účastní tvorby TEY motivu této MAPK. Změny T221A a Y223F vyústily ve změny motivu TEY na motiv AEF (Bardwell *et al.*, 1998). Proteinový produkt této mutované alely tedy nemůže být fosforylován prostřednictvím MAP2K a zůstává tedy permanentně neaktivní.

### 4.2 Metody

#### 4.2.1 Povrchová sterilizace semen

- Sterilizace semen *A. thaliana* probíhala v mikrozkušnicích, do nichž byla semena jednotlivých studovaných linií předem umístěna. Množství semen bylo voleno tak, aby semena zaplňovala přibližně 0,3 ml. V mikrozkušnicích potom probíhala suspenzace semen v jednotlivých roztocích sterilizačního postupu.
- K semenům byl přidán 1 ml sterilizačního roztoku obsahujícího 1% (v/v) hypochlorid sodný a 0,05% (v/v) Tween 20. Mikrozkušnice byla řádně uzavřena. Obsah mikrozkušnice byl pomocí třepačky důkladně promíchán tak, aby celý povrch jednotlivých semen přišel do styku se sterilizačním roztokem. Za občasného protřepávání byl sterilizační roztok ponechán působit po dobu 10 min.

- Mikrozskumavky spolu se semeny a sterilizačním roztokem byly přeneseny do laminárního boxu. Zde bylo odebráno pomocí automatické pipety co největší množství sterilizačního roztoku tak, aby nedošlo k nasátí semen do plastové špičky.
- Poté byl do mikrozskumavek přidán 1 ml 70% (v/v) ethanolu. Semena byla v ethanolu důkladně suspendována a za občasného protřepávání byl ethanol ponechán působit 1-2 min.
- Po uplynutí předepsané doby působení byl 70% (v/v) ethanol odebrán pomocí automatické pipety a semena byla minimálně 3x promývána sterilizovanou vodou za občasného protřepávání po dobu 2-3 min. Během jednotlivých promývacích cyklů bylo důležité dbát na to, aby nebyla semena nasáta a odebrána spolu s vodou.
- Po posledním promývacím cyklu byl odsát pouze poloviční objem sterilované vody. Následně byla semena spolu se zbylou vodou opatrně nasáta pomocí automatické pipety do plastové špičky a byla přenesena do předem připravených Petriho misek se sterilním filtračním papírem.
- Po odpaření veškeré vody z filtračního papíru byly Petriho misky uzavřeny pomocí Parafilmu a skladovány v lednici při teplotě 4 °C.

#### 4.2.2 Příprava kultivačního média a kultivace rostlin

- Pro kultivaci rostlin sledovaných linií bylo jako zdroj mikroprvků a makroprvků užito komerčně dostupné médium Murashige & Skoog v poloviční koncentraci, která je vhodná pro studovaný organismus *Arabidopsis thaliana*. Jako zdroj uhlíku byla do média přidána sacharóza ve výsledné koncentraci 1 % (w/v). Pro zpevnění média byl užit Phytigel ve výsledné koncentraci 0,8 % ( $8 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a pH média bylo upraveno na hodnotu 5,8.
- Připravené médium bylo k prevenci kontaminace sterilizováno pomocí autoklávu. Po sterilizaci bylo kultivační médium distribuováno do hranatých Petriho misek s rozměrem 120x120 mm v objemu 50 ml a ponecháno v laminárním boxu k solidifikaci.

- Sterilizovaná semena byla pomocí sterilního párátko v prostředí laminárního boxu přenesena na pevné médium. Následně byla semena na kultivačních médiích stratifikována 1-2 dny ve vodorovné poloze při 4 °C, aby bylo dosaženo synchronizace klíčení. Poté byly Petriho misky se semeny umístěny do fytotronové komory, kde byly kultivovány ve vertikální poloze za standardních podmínek (23 °C, 16 h světlo, 8 h tma, 70% relativní vzdušná vlhkost).

### 4.2.3 Příprava preparátů pro pozorování průduchů

- Pro pozorování průduchů byly vybrány 14 dní staré rostliny studovaných linií, které byly kultivovány na pevném médiu za standardních podmínek ve fytotronové komoře.
- Z vybraných rostlin byly velmi opatrně pomocí pinzety odebrány klíčné listy (kotyledony). Z těchto klíčných listů byl extrahován chlorofyl působením směsi etanolu a kyseliny octové v poměru 1:1 po dobu 30 min.
- V průběhu extrakce byl připraven tzv. projasňující roztok. Nejprve bylo naváženo 8 g chloral hydrátu a rozpuštěno ve 3 ml destilované vody. Po dokonalém rozpuštění chloral hydrátu byl přidán 1 ml 98% glycerolu a vzniklý roztok byl důkladně promíchán.
- Po uplynutí doby extrakce byly jednotlivé klíčné listy pinzetou vyjmuty z extrakční směsi, promyty etanolem a umístěny na podložní sklíčko tak, aby spodní stranou listu směřovaly nahoru. Poté byly klíčné listy na podložním sklíčku zakápnuty 1-3 kapkami projasňovacího roztoku, překryty krycím sklíčkem, které bylo upevněno a uzavřeno pomocí průhledného laku na nehty.
- Připravené preparáty byly studovány ve světelném mikroskopu Zeiss Axio Imager.M2 pomocí metody Nomarského diferenciálního interferenčního kontrastu (Nomarski DIC), která umožňuje zvýraznění kontrastu v nebarvených vzorcích. Výsledný obraz pozorovaného objektu se jeví jako kontrastní trojrozměrný optický reliéf objektu.

#### 4.2.4 *In vivo* značení membrán v buňkách kořene

Pro *in vivo* značení membrán buněk kořene semenáčků *A. thaliana* bylo využito barvivo FM4-64. Jedná se o lipofilní barvivo, které je pro buňky netoxické. Ve vodném prostředí jako takovém prakticky žádnou fluorescenci nevykazuje. V preparátech živých buněk se váže do vnější vrstvy membrány. V tomto lipofilním prostředí vykazuje silnou a specifickou fluorescenci. Vzhledem ke specifické vazbě na membrány a neschopností membránou volně procházet je barvivo FM4-64 využíváno pro studium vezikulárního transportu jako marker endocytózy (Bolte *et al.*, 2004).

- Pro tuto metodu byly užity 3-6 dní staré rostliny studovaných linií, které byly kultivovány na pevném médiu za standardních podmínek ve fytotronové komoře.
- Pracovní roztok FM4-64 o koncentraci  $4 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  byl připraven ze zásobního roztoku FM4-64 o koncentraci  $1,6 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  ředěním 1:400 tekutým  $\frac{1}{2}$  MS médiem. Pracovní roztok byl v průběhu přípravy jednotlivých preparátů uchován v alobalu, neboť je citlivý na světlo.
- Pro pozorování kořenů semenáčků byla připravena mikroskopická komora. Na podložní sklo byly upevněny dva tenké proužky Parafilmu vymežující prostor pro sledovanou rostlinu. Takto vytvořená komora zamezila případnému mechanickému poškození struktur sledované rostliny po pozdějším překrytí krycím sklíčkem.
- Následně byla do prostoru komory pomocí pinzety přemístěna sledovaná rostlina. Rostlině byla odstraněna zelená část a byly přidány 1-2 kapky pracovního roztoku FM4-64.
- V dalším kroku byla rostlina překryta krycím sklíčkem, které bylo na krajích upevněno k podložnímu sklíčku pomocí průhledné lepicí pásky.
- Po uplynutí 5-10 min byly preparáty vizualizovány pomocí laserového skenovacího mikroskopu s rotujícím diskem.

#### 4.2.5 Imunofluorescenční značení MPK6 a mikrotubulů metodou „whole mount“

Imunofluorescenční značení je technika, jejíž podstatou je vazba specifické protilátky na antigen, který je předmětem zájmu. Tato primární protilátka může být značena pomocí fluorochromu, častější je ovšem užití sekundární značené protilátky. Po excitaci zářením o příslušné vlnové délce molekula fluorochromu emituje záření o vyšší vlnové délce než mělo excitační záření. Díky této technice je možné vizualizovat jednu či více vybraných buněčných struktur za předpokladu užití různých specifických protilátek značených fluorochromy s odlišnými excitačními a emisními vlnovými délkami.

Postup metody „whole mount“ umožňuje imunofluorescenční značení antigenů protilátkami i ve vnitřních pletivech primárního kořene *Arabidopsis*. Využití laserové mikroskopie dovoluje vizualizaci buněk celého objektu prostřednictvím jednotlivých optických řezů bez nutnosti fyzické separace preparátů na jednotlivé tenké vrstvy řezáním. Z jednotlivých optických řezů nasnímaných laserovým mikroskopem s rotujícím diskem je možné pomocí počítačového programu zpětně rekonstruovat prostorové uspořádání celého objektu s vysokým rozlišením na celulární a subcelulární úrovni.

- Pro tuto metodu byly užity 3-5 dní staré rostliny sledovaných linií, které byly kultivovány na pevném médiu za standardních podmínek ve fytotronové komoře.
- V prvním kroku bylo v digestoři připraveno čerstvé fixační médium. Následně byly přímo z Petriho misek pinzetou odebrány rostliny jednotlivých sledovaných linií a byly přeneseny do plastových košíčků s propustným nylonovým dnem, ve kterých s nimi bylo manipulováno ve všech následujících krocích.
- Rostliny byly v košíčcích přeneseny do fixačního média a poté byly ve vakuu fixovány po dobu 1 h při pokojové teplotě.
- Po fixaci bylo odsáto fixační médium a následně byly rostliny promývány 3x 10 min v ½ MTSB. První cyklus promývání byl prováděn v digestoři. Následující dva cykly již byly prováděny na laboratorním stole.
- V dalším kroku byly rozrušeny buněčné stěny přidáním směsi enzymů obsahující 2% driselázu nebo 1% meicelázu, 1% celulázu a 1% pektolyázu či 1% macerozym v ½ MTSB. Směs enzymů působila po dobu 30 min při pokojové teplotě.

- Po uplynutí inkubační doby byla směs enzymů odsáta a rostliny byly promývány 1 x 10 min v ½ MTSB a 2 x 10 min v PBS.
- Pro redukci aldehydických skupin byl užit redukční roztok, se kterým byly rostliny inkubovány 15 min při pokojové teplotě. Následně byly rostliny promývány minimálně 4 x 5 min v PBS, dokud nevymizely vzduchové bublinky vznikající působením redukčního roztoku.
- Pro zprostupnění buněčných membrán byl využit permeabilizační roztok, se kterým byly rostliny inkubovány po dobu 1 h při pokojové teplotě. Následně byly rostliny promývány minimálně 4 x v PBS, dokud plně nevymizely bubliny vznikající jako důsledek přítomnosti detergentu v permeabilizačním roztoku.
- V následujícím kroku byly rostliny inkubovány s blokovacím roztokem 1 h při pokojové teplotě. Poté byly rostliny inkubovány s primárními protilátkami ředěnými v PBS s obsahem 3% BSA. Jako primární protilátky byly použity monoklonální potkaní protilátka anti- $\alpha$ -tubulin (v ředění 1:200-1:500) a polyklonální králičí protilátka anti-MPK6 (v ředění 1:500-1:750). Inkubace s primárními protilátkami probíhala přes noc při pokojové teplotě.
- Rostliny byly v dalším kroku promyty 6 x 10 min v PBS a následně inkubovány s fluorescenčně značenými sekundárními protilátkami ředěnými v poměru 1:200-1:1000 v PBS s obsahem 3% BSA po dobu 90 min při 37 °C a 90 min při pokojové teplotě. Byly použity sekundární protilátky anti-potkaní IgG značená s Alexa Fluor 488 a anti-králičí IgG značená s Alexa Fluor 546.
- Rostliny byly opět promyty 6 x 10 min v PBS a poté byly inkubovány s fluorescenčním barvivem DAPI, které se váže na A-T bohaté oblasti v DNA. Zásobní roztok DAPI byl ředěn 1:1000 v PBS. Inkubace probíhala 10-15 min při pokojové teplotě.
- V posledním kroku byly rostliny po 2-3 přeneseny na podložní sklíčko s kapkou zalévacího média. Rostliny byly překryty krycím sklíčkem, které bylo upevněno a uzavřeno pomocí průhledného laku na nehty.

- Vzorčky byly vizualizovány pomocí laserového mikroskopu s rotujícím diskem. Detekce probíhala při následujících nastavených parametrech:
  - pro fluorescenční barvivo DAPI excitace při 405 nm, emisní spektrum 410-495 nm
  - pro detekci mikrotubulů značených sekundární protilátkou s Alexa Fluor 488 excitace 488 nm, emisní spektrum 494-552 nm
  - pro detekci MPK6 značené sekundární protilátkou s Alexa Fluor 546 excitace 561 nm a emisní spektrum 566-580 nm

#### 4.2.6 Kolokalizační analýza

Pro kvantitativní hodnocení kolokalizace MPK6 s buněčnými jádry byla provedena počítačová kolokalizační analýza pomocí programu Zen Blue 2012 (Zeiss). Vstupními daty pro analýzu byly obrázky nasnímané pomocí konfokálního laserového skenovacího mikroskopu obsahující informace o jednotlivých kanálech odpovídajících fluorescenčním barvám užitým při imunofluorescenčním značení MPK6 metodou „whole mount“. K analýze byly použity kanály odpovídající sekundární protilátce Alexa Fluor 546 pro detekci MPK6 a fluorescenčnímu barvivu DAPI užitému pro detekci buněčných jader.

Výstupem analýzy byly pro každý obrázek dvě kolokalizační míry – koeficient korelace, označovaný také jako Pearsonův, a Mandersův koeficient. Dalším výstupem byl také tečkový diagram (anglicky scatter plot). Při hodnocení míry kolokalizace v obraze je jako základní přístup užíváno vyčíslení této míry hodnotou koeficientu. Oba výše zmíněné koeficienty jsou v tomto případě standardně užívány.

Pearsonův koeficient nabývá hodnot od -1 do 1. Kladné hodnoty poukazují na přítomnost kolokalizace, přičemž čím je číslo blíže 1, tím je míra kolokalizace vyšší. Nulová hodnota koeficientu značí nepřítomnost kolokalizace. Záporné hodnoty jsou při kolokalizační analýze těžko interpretovatelné. Mandersův koeficient je programem generován jako průměr dvojice Mandersových koeficientů, které vyjadřují zvláště míru kolokalizace pro oba obrázky odpovídající jednotlivým kanálům (Manders *et al.*, 1993). Mandersův koeficient nabývá hodnot od 0 do 1, přičemž 1 značí maximální míru kolokalizace. Tečkový diagram je vizualizací kolokalizační analýzy a uvádí do souvislosti



intenzitu pixelů na dané pozici ve dvojici obrázků včetně počtu dvojic pixelů daných intenzit. Prahová hodnota (anglicky threshold) byla programem nastavena automaticky dle Costes *et al.* (2004). Samotná kolokalizace se v tečkovém diagramu nachází v pravém horním kvadrantu. Jedná se o oblast, která se nachází za prahovými hodnotami obou os.

#### 4.2.7 Vyhodnocení výsledků

Obrázky získané mikroskopickými pozorováními byly vyhodnoceny, zpracovány a exportovány pomocí programu Zen Blue 2012 (Zeiss). Případné grafické úpravy byly prováděny pomocí programu Powerpoint (Microsoft).

### 4.3 Seznam použitých chemikálií

- 2,2,2-trichlorethan-1,1-diol (chloral hydrát) (Penta)
- 4',6-diamin-2-fenylindol (DAPI) (Sigma-Aldrich)
- Celuláza (Serva)
- Dihydrát hydrogenfosforečnanu sodného ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ) (Sigma-Aldrich)
- Dihydrogenfosforečnan draselný ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (Sigma-Aldrich)
- Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma-Aldrich)
- Driseláza (Sigma-Aldrich)
- Ethanol – 70% a 96% roztok (Penta)
- Ethylenglykol-*bis*-(2-aminoethylether)tetraoctová kyselina (EGTA) (Sigma-Aldrich)
- Glutaraldehyd – 25% roztok (Sigma-Aldrich)
- Glycerol (Sigma-Aldrich)
- Heptahydrát síranu hořečnatého ( $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ ) (Sigma-Aldrich)
- Hovězí sérový albumin (BSA) (Sigma-Aldrich)
- Hydroxid draselný (Sigma-Aldrich)
- Chlorid draselný (KCl) (Sigma-Aldrich)
- Chlorid sodný (NaCl) (Sigma-Aldrich)
- Imerzní olej – Immersol 518F (Zeiss)
- Kyselina octová (Sigma-Aldrich)

- Macerozym (Serva)
- Meiceláza (Desert Biologicals)
- Murashige & Skoog médium (Duchefa Biochemie)
- N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(diethylamino)fenyl)hexytrienyl)pyridinium dibromid (FM4-64) (Invitrogen)
- Nonidet P-40 (Sigma-Aldrich)
- Parafenyldiamin (Sigma-Aldrich)
- Paraformaldehyd (Sigma-Aldrich)
- Pektolyáza (Sigma-Aldrich)
- Phytigel (Sigma-Aldrich)
- Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonová kyselina) (PIPES) (Sigma-Aldrich)
- Sacharóza (Sigma-Aldrich)
- Tetrahydroboritan sodný (NaBH<sub>4</sub>) (Sigma-Aldrich)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich)

#### 4.4 Seznam použitých roztoků

##### Sterilizační roztok pro povrchovou sterilizaci semen

1% (v/v) hypochlorid sodný, 0,05% (v/v) Tween 20

10 ml                      10% v/v hypochlorid sodný

90 ml                      dH<sub>2</sub>O

Doplněno do 100 ml s přídavkem pár kapek Tween 20

##### Pevné kultivační ½ MS médium

2,15 g/l                      Murashige and Skoog médium

10,01 g/l                      sacharóza

8,00 g/l                      Phytigel

Doplněno do výsledného objemu 1 l dH<sub>2</sub>O, pH 5,8, sterilizováno autoklávováním

### **Tekuté kultivační ½ MS médium**

2,15 g/l Murashige and Skoog médium

10,01 g/l sacharóza

Doplněno do výsledného objemu 1 l dH<sub>2</sub>O, pH 5,8, sterilizováno autoklávováním

### **Projasňující roztok**

8 g chloral hydrát

3 ml dH<sub>2</sub>O

1 ml 98% (v/v) glycerol

### **0,5mol·l<sup>-1</sup> zásobní roztok EGTA**

3,80 g EGTA

10 ml dH<sub>2</sub>O

pH 8

### **MTSB – pufr stabilizující mikrotubuly**

15,10 g PIPES

1,23 g MgSO<sub>4</sub> × 7 H<sub>2</sub>O

10 ml 0,5mol·l<sup>-1</sup> zásobního roztoku EGTA

Doplněno do výsledného objemu 1 l dH<sub>2</sub>O, pH 6,9

### **PBS – fosfátový pufr**

8,00 g NaCl

0,20 g KCl

1,15 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 2H<sub>2</sub>O

0,20 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Doplněno do výsledného objemu 1 l dH<sub>2</sub>O, pH 7,3

**Fixační roztok**

5,00 ml	MTSB
1,88 ml	8% (w/v) paraformaldehyd
0,20 ml	25% (v/v) glutaraldehyd
2,92 ml	dH <sub>2</sub> O

**Redukční roztok**

50 mg	NaBH <sub>4</sub>
50 ml	PBS

**Permeabilizační roztok**

88 ml	PBS
10 ml	10% (v/v) DMSO
2 ml	2% (v/v) Nonidet P-40

**3% (v/v) BSA v PBS**

3 g	BSA
100 ml	PBS

**Zásobní roztok DAPI**

10mmol·l<sup>-1</sup> DAPI v DMSO

**Zalévací médium na preparáty**

100 mg	paraformaldehyd
100 µl	DMSO
10 ml	PBS (pH 8,2 – 8,6)
90 ml	100% glycerol

## 4.5 Přístrojové vybavení laboratoře

- Analytické váhy (XA 110/2X, RADWAG)
- Digestoř laboratorní (M 1200, MERCI)
- Elektromagnetická míchačka (MSH-420, BOECO)
- Fytotronová komora (Weiss Gallenkamp)
- Chladnička laboratorní (ERB 34633W, Electrolux)
- Laboratorní předvážky (S1502, BEL Engineering)
- Laminární box biohazard (Faster, FERRARA)
- Membránová vývěva (GeneTiCa)
- Mikroskop binokulární – stereomikroskop s operačním programem LAS V 4.0, Leica (M165FC, Leica)
- Mikroskop světelný s operačním programem ZEN Blue 2012 (Axio Imager M2, ZEISS)
- Mikroskop laserový s rotujícím diskem s operačním programem ZEN Blue 2012 (Spinning disk, Axio Observer Z1, ZEISS)
- Mikrovlnná trouba (MGE21, HITACHI)
- Mrazicí box (Liebherr)
- Parní sterilizátor (Sterivap, BMT MMM Group Medical Technology)
- pH metr stolní (PC 2700, Eutech Instruments)
- Třepačka (Labnet)

## **5 Výsledky**































## **6 Diskuze**







## 7 Závěr

V teoretické části práce byly na základě dostupné odborné literatury shrnuty poznatky o problematice signalizace prostřednictvím signálních kaskád mitogenem-aktivovaných proteinkináz s důrazem na jejich funkci v rostlinném organismu. Popsána byla samotná struktura signálních kaskád a průběh signalizace. Pozornost byla věnována také jevům, které tyto signální kaskády ovlivňují. V závěru byly rovněž v kontextu předchozích částí stručně shrnuty poznatky týkající se buněčného dělení u rostlin.

V experimentální části byly studovány rostliny *A. thaliana* s mutací v genu pro MPK6 (*mpk6-4* a *mpk6-4* + *MPK6AEF*) a kontrolní linie *A. thaliana* divoký typ, ekotyp Columbia (Col-0). Pozornost byla věnována uspořádání průduchů v epidermis klíčných listů. Studován byl celkový fenotyp semenáčků, kdy hlavní pozornost byla věnována jejich kořenům. Kořeny byly rovněž pozorovány na buněčné a subbuněčné úrovni. Pomocí lipofilního barviva FM4-64 bylo studováno uspořádání buněk v rámci primárního kořene. Pro studium organizace a orientace mikrotubulů v buňkách primárního kořene bylo užito imunofluorescenční barvení pomocí metody „whole mount“. Tato metoda byla rovněž využita při studiu lokalizace MPK6 v buňkách primárního kořene a její kolokalizace s různými buněčnými strukturami. Prostřednictvím těchto pozorování byly potvrzeny výsledky, které již byly popsány v dřívějších publikacích zabývajících se touto problematikou. V práci bylo rovněž dosaženo nových poznatků týkajících se mutantní linie *mpk6-4* + *MPK6AEF*, které mohou být přínosem pro lepší pochopení úlohy aktivace MPK6 v procesech, do kterých je zapojena.



## 8 Seznam použité literatury

Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M.R., Chiu, W.L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F.M., Sheen, J. (2002): MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature* **415**: 977-983.

Bardwell, L., Cook, J.G., Voora, D., Baggott, D.M., Martinez, A.R., Thorner, J. (1998): Repression of yeast Ste12 transcription factor by direct binding of unphosphorylated Kss1 MAPK and its regulation by the Ste7 MEK. *Genes & Development* **12**: 2887-2898.

Bardwell, L., Thorner, J. (1996): A conserved motif at the amino termini of MEKs might mediate high-affinity interaction with the cognate MAPKs. *Trends in Biochemical Sciences* **21**: 373-374.

Bergmann, D.C., Lukowitz, W., Somerville, C.R. (2004): Stomatal development and pattern controlled by a MAPKK kinase. *Science* **304**: 1494-1497.

Bolte, S., Talbot, C., Boutte, Y., Catrice, O., Read, N.D., Satiat-Jeuemaitre, B. (2004): FM-dyes as experimental probes for dissecting vesicle trafficking in living plant cells. *Journal of Microscopy* **214**: 159-173.

Brown, M.D., Sacks, D.B. (2009): Protein scaffolds in MAP kinase signalling. *Cellular Signalling* **21**: 462-469.

Bush, S. M., Krysan, P.J. (2007): Mutational evidence that the Arabidopsis MAP kinase MPK6 is involved in anther, inflorescence, and embryo development. *Journal of Experimental Botany* **58**: 2181-2191.

Camps, M., Nichols, A., Arkininstall, S. (2000): Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function. *FASEB Journal* **14**: 6-16.

Choi, K., Satterberg, B., Lyons, D.M., Elion, E.A. (1994): Ste5 tethers multiple protein kinases in the MAP kinase cascade required for mating in *S. cerevisiae*. *Cell* **78**: 499-512.

Chuderland, D., Konson, A., Seger, R. (2008): Identification and Characterization of a General Nuclear Translocation Signal in Signaling Proteins. *Molecular Cell* **31**: 850-861.

- Colcombet, J., Hirt, H. (2008): Arabidopsis MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochemical Journal* **413**: 217-226
- Costes, S.V., Daelemans, D., Cho, E.H., Dobbin, Z., Pavlakis, G., Lockett, S. (2004): Automatic and Quantitative Measurement of Protein-Protein Colocalization in Live Cells. *Biophysical Journal* **86**: 3993-4003.
- Fantz, D.A., Jacobs, D., Glossip, D., Kornfeld, K. (2001): Docking Sites on Substrate Proteins Direct Extracellular Signal-regulated Kinase to Phosphorylate Specific Residues. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 27256-27265.
- Fukuda, M., Gotoh, Y., Nishida, E. (1997): Interaction of MAP kinase with MAP kinase kinase: its possible role in the control of nucleocytoplasmic transport of MAP kinase. *The EMBO Journal* **16**:1901-1908.
- Geldner, N., Friml, J., Stierhof, Y.D., Jürgens, G., Palme, K. (2001): Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature* **413**: 425-428.
- Gupta, R., Huang, Y., Kieber, J., Luan, S. (1998): Identification of a dual-specificity protein phosphatase that inactivates a MAP kinase from Arabidopsis. *The Plant Journal* **16**: 581-589.
- Hamel, L.P., Nicole, M.C., Sritubtim, S., Morency, M.J., Ellis, M., Ehltig, J., Beaudoin, N., Barbazuk, B., Klessig, D., Lee, J., Martin, G., Mundy, J., Ohashi, Y., Scheel, D., Sheen, J., Xing, T., Zhang, S., Seguin, A., Ellis, B.E. (2006): Ancient signals: comparative genomics of plant MAPK and MAPKK gene families. *Trends in Plant Science* **11**: 192-198.
- Hoehenwarter, W., Thomas, M., Nukarinen, E., Egelhofer, V., Rohrig, 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.
- Ichimura, K., Shinozaki, K., Tena, G., Sheen, J., Henry, Y., Champion, A., Kreis, M., Zhang, S., Hirt, H., Wilson, C., Heberle-Bors, E., Ellis, B.E., Morris, P.C., Innes, R.W., Ecker, J.R., Scheel, D., Klessig, D.F., Machida, Y., Mundy, J., Ohashi, Y., Walker, J.C. (2002): Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends in Plant Science* **7**: 301-308.

- Jiang, C.J., Sonobe, S. (1993): Identification and preliminary characterization of a 65 kDa higher-plant microtubule-associated protein. *Journal of Cell Science* **105**: 891-901.
- Jürgens, G. (2005): Cytokinesis in Higher Plants. *Annual Review of Plant Biology* **56**: 281-299.
- Kim, J.M., Woo, D.H., Kim, S.H., Lee, S.Y., PARK, H.Y., Seok, H.Y., Chung, W.S., Moon, Y.H. (2012): Arabidopsis MKKK20 is involved in osmotic stress response via regulation of MPK6 activity. *Plant Cell Reports* **31**: 217-224.
- Kosetsu, K., Matsunaga, S., Nakagami, H., Colcombet, J., Sasabe, M., Soyano, T., Takahashi, Y., Hirt, H., Machida, Y. (2010): The MAP Kinase MPK4 Is Required for Cytokinesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* **22**: 3778-3790.
- Krysan, P.J., Jester, P.J., Gottwald, J.R., Sussman, M.R. (2002): An Arabidopsis Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase Gene Family Encodes Essential Positive Regulators of Cytokinesis. *The Plant Cell* **14**: 1109-1120.
- Laibach, F. (1943): *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyhn. als Object für Genetische und Entwicklungs-Physiologische Untersuchungen. *Botanisches Archiv* **44**: 439-455.
- Li, Q., Zhang, N., Zhang, D., Wang, Y., Lin, T., Wang, Y., Zhou, H., Ye, Z., Zhang, F., Lin, S.C., Han, J. (2008): Determinants That Control the Distinct Subcellular Localization of p38 -PRAK and p38 -PRAK Complexes. *Journal of Biological Chemistry* **283**: 11014-11023.
- Limmongkon, A., Giuliani, C., Valenta, R., Mittermann, I., Heberle-Bors E., Wilson, C. (2004): MAP kinase phosphorylation of plant profilin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **324**: 382-386.
- López-Bucio, J. S., Dubrovsky, J.G., Raya-Gonzalez, J., Ugartechea-Chirino, Y., Lopez-Bucio, J., de Luna-Valdez, L.A., Ramos-Vega, M., Leon, P., Guevara-Garcia, A.A. (2013): *Arabidopsis thaliana* mitogen-activated protein kinase 6 is involved in seed formation and modulation of primary and lateral root development. *Journal of Experimental Botany* **65**: 169-183.
- Manders, E.M.M., Verbeek, F.J., Aten, J.A. (1993): Measurement of co-localization of objects in dual-color confocal images. *Journal of Microscopy* **169**: 375-382.

- Meskiene, I., Bogre, L. , Glaser, W., Balog, J., Brandstotter, M., Zwerger, K., Ammerer, G., Hirt, H. (1998): MP2C, a plant protein phosphatase 2C, functions as a negative regulator of mitogen-activated protein kinase pathways in yeast and plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 1938-1943.
- Meyerowitz, E.M. (2001): Prehistory and History of Arabidopsis Research. *Plant Physiology* **125**: 2203-2209.
- Miles, G.P., Samuel, M.A., Zhang, Y., Ellis, B.E. (2005): RNAinterference-based (RNAi) suppression of AtMPK6, an Arabidopsis mitogen-activated protein kinase, results in hypersensitivity to ozone and misregulation of AtMPK3. *Environmental Pollution* **138**: 230-237.
- Mishra, N.S., Tuteja, R., Tuteja, N. (2006): Signaling through MAP kinase networks in plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **452**: 55-68.
- 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* **61**: 234-248.
- Müller, S., Wright, A.J., Smith, L.G. (2009): Division plane control in plants: new players in the band. *Trends in Cell Biology* **19**: 180-188.
- Nishihama, R., Ishikawa, M., Araki, S., Soyano, T., Asada, T., Machida, Y. (2001): The NPK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase is a regulator of cell-plate formation in plant cytokinesis. *Genes & Development* **15**: 352-363.
- Nühse, T.S., Peck, S.C., Hirt, H., Boller, T. (2000): Microbial Elicitors Induce Activation and Dual Phosphorylation of the Arabidopsis thaliana MAPK 6. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 7521-7526.
- Pickett-Heaps, J.D., Northcote, D.H. (1966): Organization of microtubules and endoplasmic reticulum during mitosis and cytokinesis in wheat meristems. *Journal of Cell Science* **1**: 109-120.

- Pitzschke, A., Schikora, A., Hirt, H. (2009): MAPK cascade signalling networks in plant defence. *Current Opinion in Plant Biology* **12**: 421-426.
- Pitzschke, A. (2015): Modes of MAPK substrate recognition and control. *Trends in Plant Science* **20**: 49-55.
- 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.
- Rodriguez, M.C., Petersen, M., Mundy, J. (2010): Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling in Plants. *Annual Review of Plant Biology* **61**: 621-649.
- Rossomando, E.F., Hadjimichael, J., Varnum-Finney, B., Soll, D.R. (1987): HLAMP – a conjugate of hippuryllysine and AMP which contains a phosphoamide bond – stimulates chemotaxis in *Dictyostelium discoideum*. *Differentiation* **35**: 88-93.
- Sasabe, M., Soyano, T., Takahashi, Y., Sonobe, S., Igarashi, H., Itoh, T.J., Hidaka, M., Machida, Y. (2006): Phosphorylation of NtMAP65-1 by a MAP kinase down-regulates its activity of microtubule bundling and stimulates progression of cytokinesis of tobacco cells. *Genes & Development* **20**: 1004-1014.
- Sheridan, D. L., Kong, Y., Parker, S.A., Dalby, K.N., Turk, B.E. (2008): Substrate Discrimination among Mitogen-activated Protein Kinases through Distinct Docking Sequence Motifs. *Journal of Biological Chemistry* **283**: 19511-19520.
- Smékalová, V., Luptovčíak, I., Komis, G., Šamajová, O., Ovečka, M., Doskočilová, A., Takáč, T., Vadovič, P., Novák, O., Pechan, T., Ziemann, A., Košútová, P., Šamaj, J. (2014): Involvement of YODA and mitogen activated protein kinase 6 in *Arabidopsis* post-embryonic root development through auxin up-regulation and cell division plane orientation. *New Phytologist* **203**: 1175-1193.
- Smertenko, A. P., Chang, H.Y., Sonobe, S., Fenyk, S.I., Weingartner, M., Bögre, L., Hussey, P.J. (2006): Control of the AtMAP65-1 interaction with microtubules through the cell cycle. *Journal of Cell Science* **119**: 3227-3237.

- Soyano, T., Nishihama, R., Morikiyo, K., Ishikawa, M., Machida, Y. (2003): NQK1/NtMEK1 is a MAPKK that acts in the NPK1 MAPKKK-mediated MAPK cascade and is required for plant cytokinesis. *Genes & Development* **17**: 1055-1067.
- Sturgill, T.W., Ray, L.B. (1986): Muscle proteins related to microtubule associated protein-2 are substrates for an insulin-stimulatable kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **134**: 565-571.
- Suarez-Rodriguez, M.C., Adams-Phillips, L., Liu, Y., Wang, H., Su, S.-H., Jester, P.J., Zhang, S., Bent, A. F., Krysan, P.J. (2007): MEKK1 Is Required for flg22-Induced MPK4 Activation in Arabidopsis Plants. *Plant physiology* **143**: 661-669.
- Šamajová, O., Komis, G., Šamaj, J. (2013): Emerging topics in the cell biology of mitogen-activated protein kinases. *Trends in Plant Science* **18**: 140-148.
- Tanoue, T., Adachi, M., Moriguchi, T., Nishida, E. (2000): A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nature Cell Biology* **2**: 110-116.
- Tanoue, T., Nishida, E. (2003): Molecular recognitions in the MAP kinase cascades. *Cellular Signalling* **15**: 455-462.
- Teige, M., Scheikl, E., Eulgem, T., Dóczi, R., Ichimura, K., Shinozaki, K., Dangl, J.L., Hirt, H. (2004): The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in Arabidopsis. *Molecular Cell* **15**: 141-152.
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000): Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796-815.
- Ulm, R., Ichimura, K., Mizoguchi, T., Peck, S.C., Zhu, T., Wang, X., Shinozaki, K., Paszkowski, J. (2002): Distinct regulation of salinity and genotoxic stress responses by *Arabidopsis* MAP kinase phosphatase 1. *The EMBO Journal* **21**: 6483-6493.
- 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.

Yoo, S.D., Cho, Y.H., Tena, G., Xiong, Y., Sheen, J. (2008): Dual control of nuclear EIN3 by bifurcate MAPK cascades in C2H4 signalling. *Nature* **451**: 789-795.

Zaïdi, I., Ebel, C., Touzri, M, Herzog, E., Evrard, J.L., Schmit, A.C., Masmoudi, K., Hanin, M. (2010): TMKP1 is a novel wheat stress responsive MAP kinase phosphatase localized in the nucleus. *Plant Molecular Biology* **73**: 325-338.

Zeke, A., Lukács, M., Lim, W.A., Reményi, A. (2009): Scaffolds: interaction platforms for cellular signalling circuits. *Trends in Cell Biology* **19**: 364-374.

## 9 Seznam použitých symbolů a zkratek

A	alanin
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ADP	adenosindifosfát
AtDsPTP1	dvojitě specifická fosfatáza u <i>Arabidopsis thaliana</i> (z anglického <i>Arabidopsis thaliana</i> Dual Specificity Protein Tyrosine Phosphatase)
AtMPK4	mitogenem-aktivovaná protein kináza 4 u <i>Arabidopsis thaliana</i> (z anglického <i>Arabidopsis thaliana</i> Mitogen-Activated Protein Kinase 4)
ANP 1/2/3	mitogenem-aktivovaná proteinkináza kináza kináza ANP 1/2/3 (z anglického <i>Arabidopsis</i> Homolog of Nucleus- and Phragmoplast-Localized Protein Kinase 1/2/3)
AT oblasti	oblasti DNA bohaté na adenin a thymin
ATP	adenosintrifosfát
BCK1	mitogenem-aktivovaná proteinkináza kináza kináza u kvasinek (z anglického Bypass of C Kinase 1)
BSA	hovězí sérový albumin (z anglického Bovine Serum Albumine)
D	kyselina asparagová
DAPI	4',6-diamin-2-fenylindol
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DSP	dvojitě specifické fosfatázy (z anglického Dual Specificity Phosphatases)
E	kyselina glutamová
EGTA	ethylenglykol- <i>bis</i> -(2-aminoethylether)tetraoctová kyselina



F	fenylalanin
FM4-64	N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(diethylamino)fenyl)hexytrienyl)pyridinium dibromid
Fus3	mitogenem-aktivovaná proteinkináza u kvasinek (z anglického Cell Fusion)
H	histidin
I	izoleucin
IgG	imunoglobulin třídy G
K	lysin
kys.	kyselina
L	leucin
P	prolin
PBS	fosfátový pufr (z anglického Phosphate Buffered Saline)
PIPES	piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonová kyselina)
MAP	protein asociovaný s mikrotubuly (z anglického Microtubule-Associated Protein)
MAP-2	protein asociovaný s mikrotubuly 2 (z anglického Microtubule-Associated Protein 2)
MAP65-1	protein asociovaný s mikrotubuly 65-1 (z anglického Microtubule-Associated Protein 65-1)
MAP3K, MAPKKK, MEKK	mitogenem-aktivovaná proteinkináza kináza kináza (z anglického Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase)
MAP2K, MKK, MEK	mitogenem-aktivovaná proteinkináza kináza (z anglického Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase)
MAPK, MPK	mitogenem-aktivovaná proteinkináza (z anglického Mitogen-Activated Protein Kinase), dle kontextu všeobecně užíváno rovněž pro celou signální kaskádu

MEKK1	mitogenem-aktivovaná proteinkináza kináza kináza 1
MKK2, 4, 5, 6	mitogenem-aktivovaná proteinkináza kináza 2, 4, 5, 6
MPK3, 4, 6	mitogenem-aktivovaná protein kináza 3, 4, 6
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
MS médium	Murashige & Skoog médium
MTSB	pufr stabilizující mikrotubuly (z anglického Microtubules Stabilizing Buffer)
NACK-PQR	kaskáda mitogenem-aktivovaných proteinkináz u tabáku aktivovaná prostřednictvím NACK1 (z anglického NPK1-Activating Kinesin-1), skládající se z <u>N</u> PK1/ <u>N</u> QK1/ <u>N</u> RK1
NLS	jaderný lokalizační signál (z anglického Nuclear Localizing Signal)
NPK1	mitogenem-aktivovaná proteinkináza kináza kináza u tabáku (z anglického Nucleus and Phragmoplast-Localized Protein Kinase 1)
NQK1	mitogenem-aktivovaná proteinkináza kináza u tabáku (aktivována NPK1, Q následuje v abecedě po P)
NRK1	mitogenem-aktivovaná proteinkináza u tabáku (aktivována NQK1, R následuje v abecedě po Q)
NTF	jaderný transportní faktor (z anglického Nuclear transport factor)
Obr.	obrázek
PAMP	molekulární komplexy asociované s patogeny (z anglického Pathogen-Associated Molecular Patterns)
PPB	preprofázní svazek (z anglického Preprophase Band)
R	arginin
RAF	mitogenem-aktivovaná proteinkináza kináza kináza RAF (z anglického Rapidly Accelerated Fibrosarcoma)
RAF1	mitogenem-aktivovaná proteinkináza kináza kináza RAF1 (z anglického Rapidly Accelerated Fibrosarcoma 1)

RNA	ribonukleová kyselina
RT-PCR	zpětná polymerázová řetězová reakce (z anglického Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)
S	serin
Ste5	mitogenem-aktivovaná proteinkináza u kvasinek (z anglického Sterile)
Ste7	mitogenem-aktivovaná proteinkináza kináza u kvasinek (z anglického Sterile)
Ste11	mitogenem-aktivovaná proteinkináza kináza kináza u kvasinek (z anglického Sterile)
T	threonin
T-DNA	transferová DNA (z anglického Transferred DNA)
UV-B	středněvlnné ultrafialové záření
X	libovolná aminokyselina
Y	tyrosin
YODA	mitogenem-aktivovaná proteinkináza kináza kináza 4