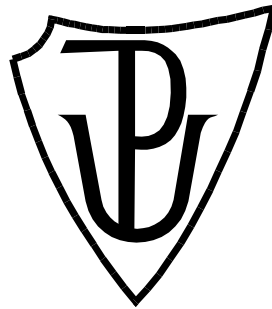


# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



## Organizácia cytoskeletu u vybraného dvojitého mutanta MAPK počas abiotického stresu

### BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	<b>Daša Wernerová</b>
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. Olga Šamajová, Dr.</b>
Rok:	2018

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

V Olomouci dne .....

.....

Daša Wernerová

Rada by som poďakovala vedúcej mojej práce, Mgr. Olge Šamajovej, Dr. za odborné vedenie a cenné rady pri tvorbe tejto práce. Poďakovanie patrí aj Mgr. Michaele Škoríkovej za pripomienky pri uskutočňovaní experimentov a Georgiovi Komisovi, PhD., za rady pri spracovaní práce. Ďakujem aj celému kolektívu Oddelenia bunkovej biológie CRH za poskytnutie možnosti práce v laboratóriu.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Daša Wernerová
Název práce	Organizácia cytoskeletu u vybraného dvojitého mutantu MAPK počas abiotického stresu
Typ práce	Bakalárska
Pracovišťa	Oddelenie bunecnej biológie CRH
Vedoucí práce	Mgr. Olga Šamajová, Dr.
Rok obhajoby práce	2018

### Abstrakt

Teoretická časť tejto bakalárskej práce popisuje *Arabidopsis thaliana* ako modelový organizmus pre dvojkľúčolistové rastliny. Práca sa ďalej venuje mitogénom aktivovaným proteín kinázam (MAPK), ktoré zohrávajú dôležitú úlohu v signalizácii a tiež adaptácii rastlín na neustále sa meniace podmienky prostredia. Podrobnejšie sú popísané kaskády MAPK a ich úloha v podmienkach abiotického stresu, hlavne pri pôsobení soľného stresu. Následne je charakterizovaný rastlinný cytoskelet a jeho jednotlivé komponenty – mikrotubuly a aktínové filameny. Táto časť práce sa ďalej venuje problematike kondicionálneho fenotypu u rastlín a príprave dvojitéch mutantov na štúdium funkcie génov.

Experimentálna časť práce sa zaoberá optimalizáciou kultivácie rastlín v *in vitro* podmienkach a ich následnému podrobeniu soľnému stresu. Bola vykonaná imunocytochemická lokalizácia mikrotubulov u rastlín divokého typu Col-0 a mutantov *mpk4*, *mpk5*, *mpk4 mpk5* kultivovaných v kontrolných a krátkodobých stresových podmienkach. Sledoval sa vplyv soľného stresu na organizáciu mikrotubulov. V poslednej časti je popísané kríženie dvojitého mutantu *mpk4 mpk5* s transgénnymi líniami exprimujúcimi cytoskeletálne markery.

Z výsledkov našich experimentov vyplýva, že dvojité mutant *mpk4 mpk5* je citlivejší na pôsobenie soľného stresu navodeného NaCl než ostatné rastlinné línie použité v tomto experimente.

Kľúčová slova	MAPK signalizácia, cytoskelet, mikrotubuly, soľný stres
Počet stran	62
Počet príloh	0
Jazyk	Slovenský

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Daša Wernerová
Title	Cytoskeleton organization of selected MAPK double mutant during abiotic stress
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of cell biology CRH
Supervisor	Mgr. Olga Šamajová, Dr.
The year of presentation	2018

### Abstract

The theoretical part of the bachelor thesis defines *Arabidopsis thaliana* as a model dicotyledonous plant. The role of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) as an important player in plant signalling during adaptation of plants to ever-changing environment is also introduced. In addition, MAPK cascades and their role in response to abiotic stresses are described, with main focus on the salt stress. The next part of thesis defines the cytoskeleton and its components, namely the microtubules and the actin filaments. Additionally, the problematics of conditional plant phenotype as well as double mutant production as a tool for investigation of gene functions was described.

The experimental part is dedicated to optimization of *in vitro* plant cultivation and subsequent salt treatment. Immunocytochemical localization of microtubules in wild type Col-0 and mutants *mpk4*, *mpk5* and *mpk4 mpk5* was performed under control and salt stress conditions. The last part describes crossing of the *mpk4 mpk5* double mutant with transgenic plants expressing cytoskeletal markers.

The results from our experiments show that cortical microtubules of double mutant *mpk4 mpk5* are more sensitive to the salt stress caused by NaCl than the other plant lines used in this experiment.

Keywords	MAPK signaling, cytoskeleton, microtubules, salt stress
Number of pages	62
Number of appendices	0
Language	Slovak

# OBSAH

<b>1 ÚVOD</b> .....	<b>8</b>
<b>2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY</b> .....	<b>10</b>
2.1 Modelový organizmus <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	10
2.2 Mitogénom aktivované proteín kinázy - MAPK .....	10
2.2.1 Jednotliví členovia MAPK signálnej dráhy .....	13
2.2.1.1 Mitogénom aktivované proteín kinázy kinázy kinázy (MAP3K)....	13
2.2.1.2 Mitogénom aktivované proteín kinázy kinázy (MAP2K) .....	13
2.2.1.3 Mitogénom aktivované proteín kinázy (MAPK) .....	14
2.2.2 Charakteristika MAPK mutantov .....	15
2.2.2.1 Mutant <i>mpk4</i> .....	15
2.2.2.2 Mutant <i>mpk5</i> .....	16
2.2.2.3 Dvojitý mutant <i>mpk4 mpk5</i> .....	16
2.3 Redundancia signálnych dráh a kondicionálny fenotyp .....	18
2.4 Odpovede rastlín na stres .....	19
2.4.1 Abiotický stres .....	19
2.4.1.1 Soľný stres .....	20
2.5 Cytoskelet .....	22
2.5.1 Aktínové filamenty.....	22
2.5.1.1 Aktín viažúce proteíny.....	23
2.5.2 Mikrotubuly .....	24
2.5.2.1 Mikrotubuly viažúce proteíny.....	26
2.6 Bunkové delenie .....	27
<b>3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ</b> .....	<b>29</b>
3.1 Materiál .....	29
3.1.1 Biologický materiál.....	29
3.1.2 Chemikálie .....	29
3.1.2.1 Roztoky a médiá .....	30
3.1.3 Prístroje .....	32
3.1.4 Software .....	33
3.2 Metódy.....	33
3.2.1 Povrchová sterilizácia semien .....	33
3.2.2 Príprava kultivačných médií .....	34
3.2.3 Optimalizácia podmienok <i>in vitro</i> kultivácie rastlín .....	34
3.2.4 Selekcia rastlín na imunocytochemickú lokalizáciu .....	34
3.2.5 Indukcia soľného tresu .....	35
3.2.6 Imunocytochemická lokalizácia metódou „whole mount“ .....	35
3.2.7 Kríženie <i>mpk4 mpk5</i> s markermi cytoskeletu .....	36
3.2.7.1 Selekcia rastlín.....	36
3.2.7.2 Genotypizácia PCR a agarózová elektroforéza .....	36
3.2.7.3 Kríženie rastlín.....	38

<b>4 VÝSLEDKY .....</b>	<b>39</b>
4.1 Optimalizácia podmienok <i>in vitro</i> kultivácie rastlín v podmienkach abiotického stresu.....	39
4.2 Imunocytochemická lokalizácia cytoskeletu u vybraného dvojitého mutanta metódou „whole mount“ v kontrolných a stresových podmienkach.....	40
4.2.1 Organizácia mikrotubulov v epidermálnych bunkách koreňov v kontrolných podmienkach.....	40
4.2.2 Organizácia mikrotubulov v epidermálnych bunkách koreňov premývaných v ½ MS médiu .....	45
4.2.3 Vplyv soľného stresu navodeného 150 mmol·l <sup>-1</sup> NaCl na organizáciu mikrotubulov v epidermálnych bunkách koreňov .....	47
4.2.4 Vplyv soľného stresu navodeného 150 mmol·l <sup>-1</sup> KCl na organizáciu mikrotubulov v epidermálnych bunkách koreňov .....	49
4.3 Kríženie vybraného dvojitého mutanta MAPK s transgénnymi líniami nesúcimi molekulárne markery cytoskeletu.....	51
4.3.1 Genotypizácia PCR a agarózová elektroforéza.....	51
4.3.2 Kríženie <i>mpk4 mpk5</i> s transgénnymi líniami nesúcimi molekulárne markery cytoskeletu .....	52
<b>5 DISKUSIA .....</b>	<b>53</b>
<b>6 ZÁVER .....</b>	<b>55</b>
<b>7 LITERATÚRA.....</b>	<b>56</b>
<b>8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK.....</b>	<b>62</b>

# 1 ÚVOD

Rastliny si počas evolúcie vyvinuli mechanizmy obrany voči stresu, keďže žijú fixovane na jednom mieste a pred nevhodnými podmienkami prostredia nemôžu uniknúť. Bunky menia svoje vnútorné usporiadanie počas bunkového delenia, rastu, či pri biotickom alebo abiotickom strese, v čom im pomáha veľmi dynamický cytoskelet. Rastlinný cytoskelet pozostáva z aktínových filamentov a mikrotubulov, ktoré tvoria v bunke komplexnú štruktúru.

Podnety z prostredia sú prenášané signalizačnými dráhami a aktiváciou ich jednotlivých komponentov dôjde k adekvátnej bunkovej odpovedi. Jednou z najlepšie preskúmaných signalizačných dráh je multienzymatická kaskáda mitogénom aktivovaných proteín kináz (MAPK). Prenos signálu prostredníctvom tejto dráhy spočíva vo fosforylácii podriadených substrátov a následnej fosforylácii konečného substrátu, napríklad transkripčného faktora. MAPK kaskáda špecificky prenáša podnety spojené s biotickým aj abiotickým stresom. Pochopenie vzájomných interakcií MAPK, sekundárnych poslov a hormónov vedie odhaleniu mechanizmov obrany bunky (Smékalová *et al.*, 2014). MAPK interagujú s cytoskeletom prostredníctvom asociovaných proteínov a usmerňujú tak organizáciu bunky v odpovedi na meniace sa podmienky prostredia.

Na štúdium interakcií možno použiť mutantov s jedným alebo viacerými génmi vyradenými z funkcie. Skúmanie reakcií takýchto tzv. „knock out“ dvojitéch mutantov môže viesť k odhaleniu funkcie vyradených génov v prípade, že jednoduché mutanty za normálnych kultivačných podmienok nevykazujú odlišný fenotyp (Su a Krysan, 2016).



## **CIELE PRÁCE**

### **Teoretická časť**

- 1) Spracovanie literárnej rešerše na tému MAPK signaling a organizácia cytoskeletu v odpovedi rastlinných buniek na abiotický stres.

### **Experimentálna časť**

- 1) Optimalizácia podmienok *in vitro* kultivácie rastlín v podmienkach abiotického stresu.
- 2) Imunocytochemická lokalizácia cytoskeletu u vybraného dvojitého mutanta metódou „whole mount“ v kontrolných a stresových podmienkach.
- 3) Kríženie vybraného dvojitého mutanta MAPK s transgennými líniami nesúcimi molekulárne markery cytoskeletu.

## 2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

### 2.1 Modelový organizmus *Arabidopsis thaliana*

*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, po slovensky arábkovka Thalova, je dvojkľúčolistová rastlina z čeľade *Brassicaceae*. V molekulárnej biológii je používaná ako modelový organizmus dvojkľúčolistových rastlín (Müller a Grossniklaus, 2010). *A. thaliana* je rastlina malého vzrastu a je nenáročná na kultivačné podmienky, čo umožňuje jej pestovanie v laboratóriách v *in vitro*, ako aj v *in vivo*. Navyše má krátky životný cyklus, je samoopelivá a produkuje veľké množstvo semien (Koornneef a Meinke, 2010).

*A. thaliana* sa v roku 2000 stala prvou rastlinou s osekvenovaným genómom. Bolo zistené, že obsahuje 125 000 báz a viac než 11 000 génových rodín kóduje 25 498 génov na 5 chromozómoch (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000).

Nepriamou mutagenézou *A. thaliana* s pomocou *Agrobacterium tumefaciens* boli vytvorené rastliny s cielene nefunkčnými génmi, tzv. „knock out“ mutanty s vloženým T-DNA inzertom. Skúmanie „knock out“ mutantov umožňuje získavanie poznatkov o funkcii jednotlivých génov.

### 2.2 Mitogénom aktivované proteín kinázy - MAPK

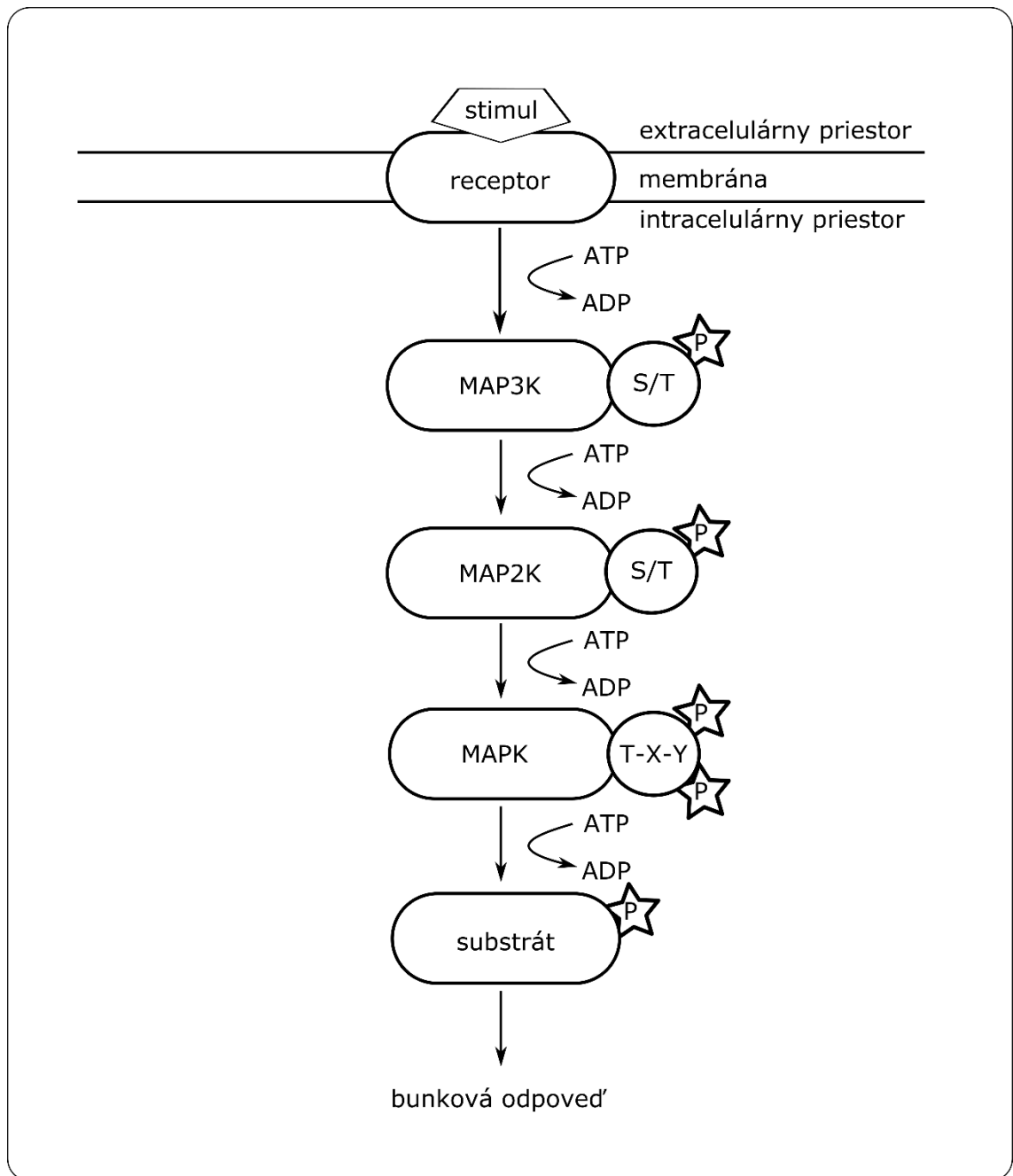
Mitogénom aktivované proteín kinázy (MAPK) sú enzýmy o veľkosti 40-45 kDa z triedy serín-threonín proteínkináz, ktoré možno aktivovať fosforyláciou (Mizoguchi *et al.*, 1994). U všetkých eukaryotických organizmov vytvárajú MAPK vysoko konzervované multienzýmové komplexy (Colcombet a Hirt, 2008; Suarez-Rodriguez *et al.*, 2010).

MAPK tvoria v organizme signalizačné fosforylačné kaskády, ktoré prenášajú a zosilňujú širokú škálu extracelulárnych biotických a abiotických signálov (Sasabe a Machida, 2012; Šamajová *et al.*, 2013a; Smékalová *et al.*, 2014). Signály sú prenášané do cieľových subcelulárnych kompartmentov ako napríklad jadro, Golgiho aparát či endoplazmatické retikulum. Prenesenie signálu na substrát vyvolá vhodnú odpoveď bunky. MAPK tak regulujú rôzne procesy ako sú odpoveď rastlín na stres, hormonálne regulácie a imunitné reakcie, čím zohrávajú nenahraditeľnú úlohu pri organizácii bunky a vývine rastlín (Suarez-Rodriguez *et al.*, 2010; Šamajová *et al.*, 2013a, b; Komis *et al.*, 2018). MAPK signálne dráhy môžu byť aktivované rastlinnými hormónmi, biotickými a abiotickými stresovými faktormi (Šamajová *et al.*, 2013a; Smékalová *et al.*, 2014).

Odozva na stresový stimul je vďaka rýchlemu prenosu signálu cez jednotlivé komponenty MAPK kaskády prostredníctvom fosforylácie veľmi rýchla, dochádza k nej

v priebehu desiatok minút (Křenek a Smékalová, 2014). Fosforylácia je kovalentná modifikácia proteínu, ktorá však, ako jedna z mála, môže byť reverzibilná. Je to jedna z najčastejších posttraslačných modifikácií proteínov u všetkých organizmov (Colcombet a Hirt, 2008; Khoury *et al.*, 2011). MAPK sú aktivované fosforyláciou kinázami a deaktivované defosforyláciou fosfatázami (Hunter, 1995; Bigeard a Hirt, 2018). Kinázy katalyzujú presun  $\gamma$  fosfátu z ATP na tyrozínové zvyšky substrátových proteínov. Takto tvoria väzobné miesta pre nasledujúce signálne proteíny v kaskáde (Hubbard a Till, 2000).

Extracelulárny signál je prostredníctvom receptoru na plazmatickej membráne buď priamo, alebo prostredníctvom inej molekuly prenesený na MAPK kinázu kinázu (MAP3K), ktorú aktivuje fosforyláciou (Obr. 1). Aktivovaná MAP3K fosforyluje ďalší komponent kaskády, MAPK kinázu (MAP2K), na serín/threonínových zvyškoch. Fosforylovaná MAP2K následne prenesie signál na MAPK a dvojitou fosforyláciou threonínových a tyrozínových reziduí na TXY motíve (sekvencia obsahujúca threonín, ľubovoľnú aminokyselinu a následne tyrozín) ju aktivuje. Každá kináza je tak aktivovaná fosforyláciou predchádzajúcou kinázou v MAPK kaskáde (Widmann *et al.*, 1999; Kiegerl *et al.*, 2000; Colcombet a Hirt, 2008; Šamajová *et al.*, 2013b). Aktivovaná MAPK, posledný člen MAPK dráhy, sa po fosforylácii uvoľní z kostrového proteínu a presunie sa do jadra, kde usmerňuje transkripciu génov, či už reguláciou proteínov zapojených do transkripcie alebo priamou reguláciou transkripčných faktorov. V jadre ovplyvňuje expresiu génov, čím reguluje odpoveď na stres (Šamajová *et al.*, 2013b).



Obr. 1 Schéma MAPK kaskády pozostávajúcej z MAP3K, MAP2K a MAPK. Receptor na plazmatickej membráne zachytí signál. Prenesením signálu sa MAP3K aktivuje. Postupným prenosom signálu cez komponenty MAPK kaskády až na substrát je vyvolaná bunková odpoveď. P je fosfát.

Kostrové proteíny hrajú kľúčovú úlohu v organizácii komponentov signálnej dráhy a regulácii prenosu signálu (Šamajová *et al.*, 2013a). Spolu s kompartmentalizáciou MAPK dráh napomáhajú špecifickému a efektívnemu prenosu signálu. Zároveň zabráňujú nežiadúcim interakciám s inými signálnymi dráhami. Mnoho členov MAPK dráhy priamo interaguje s kostrovými proteínmi (Šamaj *et al.*, 2004).

Rôzne funkčné MAPK dráhy iniciované prenosom signálu z rôznych receptorov často zdieľajú rovnaké komponenty MAPK alebo aj úplne kompletnú MAPK kaskádu (Xu a Zhang, 2015). Zároveň býva jedna kináza často zapojená do rôznych fyziologických procesov (Colcombet a Hirt, 2008, Popescu *et al.*, 2009).

Osekvencovanie genómu *A. thaliana* odhalilo, že genóm kóduje 20 MAPK, 10 MAP2K a 80 MAP3K (Ichimura *et al.*, 2002, Menges *et al.*, 2008). Počet jednotlivých génov kódujúcich MAPK v *A. thaliana* naznačuje veľkú funkčnú redundanciu a vzájomné interakcie v MAPK signalizácii (Smékalová *et al.*, 2014).

## 2.2.1 Jednotliví členovia MAPK signálnej dráhy

### 2.2.1.1 Mitogénom aktivované proteín kinázy kinázy kinázy (MAP3K)

MAP3K sú prvé komponenty MAPK signálnej kaskády. Sú to serín/threonínové kinázy, ktoré následne fosforylujú dva aminokyselinové zvyšky v Ser/Thr-X<sub>3-5</sub>-Ser/Thr motíve MAP2K (Colcombet a Hirt, 2008).

MAP3K možno rozdeliť do 3 skupín: A, B a C. Do skupiny A patria MAP3K, ktoré sú podobné typickým MAP3K ako MEKK, STE11 alebo BCK1 (Ichimura *et al.*, 2002). Kinázová doména MAP3K v tejto skupine je veľmi podobná.

Skupiny B a C tvoria RAF-podobné MAP3K so špecifickou sekvenciou, ktorá ich odlišuje od MAP3K skupiny A do takej miery, že možno predpokladať, že nemajú spoločného predka s ostatnými MAP3K a vznikli konvergenciou rôznych proteínkináz (Jouannic *et al.*, 1999; Suarez-Rodriguez *et al.*, 2010). V porovnaní s MAPK a MAP2K majú MAP3K oveľa viac členov a väčšiu variabilitu v primárnej štruktúre a type domény (Ichimura *et al.*, 2002).

### 2.2.1.2 Mitogénom aktivované proteín kinázy kinázy (MAP2K)

MAP2K sú aktivované MAP3K fosforyláciou konzervovaných Ser/Thr reziduí. Sekvencia rastlinných MAP2K je S/TxxxxxS/T, na rozdiel od cicavčej sekvencie S/TxxxS/T (Ichimura *et al.*, 2002). Sú to duálne špecifické kinázy, ktoré aktivujú MAPK dvojitou fosforyláciou v Thr-X-Tyr motíve, kde X predstavuje kyselinu glutamovú, kyselinu asparágovú, glycín alebo prolín (Zhang a Klessig, 2001, Colcombet a Hirt, 2008).

MAP2K môžu aktivovať viacero MAPK, keďže genóm *Arabidopsis* kóduje iba 10 génov pre MAP2K a 20 génov pre MAPK (Ichimura *et al.*, 2002, Menges *et al.*, 2008).

MAP2K sa delia do 4 skupín: A, B, C a D. Skupina A zahŕňa MKK1, MKK2 a MKK6, pričom MKK1 a MKK2 pri strese fosforylujú MPK4 (Ichimura *et al.*, 1998, Mizoguchi *et al.*, 1998, Huang *et al.*, 2000). MKK1 je aktivovaná pri poranení alebo počas abiotického stresu ako chlad, sucho, či soľný stres (Matsuoka *et al.*, 2002).

Skupinu B tvorí iba jeden člen, MKK3, ktorá je zapojená do signalizácie pri napadnutí rastliny patogénmi (Dóczi *et al.*, 2007). Na 3' konci kóduje MKK3 doménu jadrového transferového faktora (nuclear transfer factor, NTF) (Hamel *et al.*, 2006). NTF je proteín, ktorý sa v cytoplazme viaže na Ran-GDP a následne ju importuje do jadra (Steggerda a Paschal, 2002). Tento fakt naznačuje, že MAP2K s NTF doménou sú zapojené do transportu medzi cytoplazmou a jadrom (Ichimura *et al.*, 2002).

MAPKK4 a MAPKK5 patriace do skupiny C aktivujú MPK3 a MPK6 pri odpovedi na patogénom indukovaný stres (Asai *et al.*, 2002).

Skupiny MAP2K génov C a D sú charakteristické tým, že neobsahujú intróny (Ichimura *et al.*, 2002).

### **2.2.1.3 Mitogénom aktivované proteín kinázy (MAPK)**

MAPK, posledná kináza v kaskáde, je aktivovaná dvojitou fosforyláciou Thr a Tyr reziduí na tripeptidovom motíve v aktivačnej T-slučke medzi poddoménami VI a VIII v kinázovej katalytickej doméne (Zhang a Klessig, 2001). Fosforylované MAPK prenášajú signál na molekuly, čím ovplyvňujú ich aktivitu, funkciu a lokalizáciu.

Genóm *A. thaliana* kóduje 20 génov pre MAPK (Ichimura *et al.*, 2002; Menges *et al.*, 2008). Podľa aminokyseliny v konzervovanom motíve T-X-Y ich môžeme rozdeliť do dvoch podskupín. Podskupina TEY obsahuje v sekvencii kyselinu glutámovú a podskupina TDY obsahuje kyselinu asparágovú. Podskupinu TEY možno ďalej rozdeliť do skupín A, B a C. Podskupina TDY obsahuje iba jednu skupinu D (Ichimura *et al.*, 2002; Suarez-Rodriguez *et al.*, 2010).

MPK4 a MPK5 patria do B podskupiny TEY MAPK. Táto skupina je zapojená do odpovede na environmentálny stres a do regulácie bunkového delenia. Mutant *mpk4* má poruchy v tvorení preprofázneho zväzku (preprophase band, PPB) a bunkovej prepážky (Beck *et al.*, 2011). Mutant *mpk5* nemá za normálnych kultivačných podmienok odlišný fenotyp od divokého typu (Su a Krysan, 2016).

MAPK zo skupín A a B majú v blízkosti C-terminálneho konca konzervovanú CD doménu, ktorá slúži ako miesto na interakciu s MAP2K, fosfatázami a proteínovými substrátmi. CD doména obsahuje aminokyselinovú sekvenciu s dvoma prilahlými

kyslými reziduami kyseliny asparágovej a kyseliny glutámovej, ktoré umožňujú interakciu so zásaditými aminokyselinami MAP2K. Ukotvenie enzýmu a substrátu zvyšuje účinnosť všetkých enzymatických reakcií (Tanoue *et al.*, 2000).

## 2.2.2 Charakteristika MAPK mutantov

### 2.2.2.1 Mutant *mpk4*

Homozygótny recesívny mutant *mpk4* má voľným okom pozorovateľný špecifický fenotyp: zakrpatený vzrast a zdeformovaný koreň (Beck *et al.*, 2010; Kosetsu *et al.*, 2010). Koreňové vlásky homozygótného mutantu *mpk4* sú častokrát rozvetvené a až 75 % všetkých koreňových vláskov v *mpk4* je abnormálnych (Beck *et al.*, 2010). Miesta vyrastania koreňových vláskov z trichoblastov sú značne napuchnuté a celkovo majú väčší priemer než u rastlín divokého typu ekotypu Columbia (Col-0). Mutant má aj mnoho ektopických vláskov. Epidermálne bunky koreňa sú napuchnuté a organizácia buniek v koreni je narušená (Beck *et al.*, 2010).

K expresii *MPK4* dochádza v listoch, koreňoch, stonkách a kvetoch. Histochemická analýza  $\beta$ -glukuronidázového (GUS) reportérového génu spojeného s promotorom pre *MPK4* odhalila expresiu *MPK4* v napuchnutých epidermálnych bunkách koreňa, ako aj v mladých koreňových vláskoch.

K obzvlášť silnému GUS sfarbeniu dochádzalo v meristematických bunkách koreňových špičiek. Tento experiment poukazuje na úlohu *MPK4* vo vývoji koreňa a zahŕňa vývoj a rast koreňových vláskov, rovnako, ako aj epidermálnych buniek koreňa (Beck *et al.*, 2011).

Vetvenie koreňových vláskov, rovnako, ako aj výskyt ektopických koreňových vláskov, spolu s radiálnym zväčšením buniek naznačuje, že v rastlinách *mpk4* dochádza k zásadným zmenám v organizácii mikrotubulov. Kortikálne mikrotubuly v meristematickej oblasti koreňa u *mpk4* mutantu sú zväzované a v napuchnutých epidermálnych bunkách sú náhodne usporiadané. V epidermálnych bunkách hypokotylu u tohto mutantu sú kortikálne mikrotubuly neusporiadané a tvoria nepravidelné siete. K zväzkovaniu mikrotubulov dochádza aj v koreňových epidermálnych bunkách a dlaždicových epidermálnych bunkách kľúčnych listov. V obidvoch typoch buniek možno pozorovať aj nedokonale rozdelené bunky. Bunková prepážka je v týchto bunkách vytvorená iba čiastočne, čo potvrdzuje, že rastliny *mpk4* majú značné cytokinetické

defekty. Zvýšená rezistencia voči herbicídu oryzalínu, ktorý depolymerizuje mikrotubuly, bola pozorovaná v epidermálnych bunkách hypokotylu (Beck *et al.*, 2010).

MPK4 ovplyvňuje rovinu bunkového delenia a je kľúčovým komponentom regulácie cytokinézy (Kosetsu *et al.*, 2010). Spolu s proteínom asociujúcim s mikrotubulmi (MAP) MAP65-1 je zapojená do organizácie mikrotubulov pri raste bunky (Beck *et al.*, 2010).

Defekty buniek mutanta *mpk4* súvisia s organizáciou mikrotubulov (Beck *et al.*, 2011). Bunky koreňa divokého typu Col-0 sú pravidelne usporiadané v radoch, na rozdiel od buniek *mpk4*, v ktorých sa vyskytujú nedokončené bunkové prepážky a nekompletné bunkové steny. Značenie pomocou 4',6-diamidin-2-fenylyndolu (DAPI) odhalilo, že väčšina napuchnutých buniek má dve a viac jadier.

### **2.2.2.2 Mutant *mpk5***

*MPK5* spolu s *MPK4* patria do rovnakej podskupiny TEY MAPK, majú podobnú evolučnú dráhu a sú s najväčšou pravdepodobnosťou redundantné (Ichimura *et al.*, 2002). Mutant *mpk5* však za normálnych kultivačných podmienok nevykazuje abnormálny fenotyp a nebol ďalej podrobne skúmaný.

Kvantitatívna PCR analýza stonkových vrcholov u *mpk4* mutanta neodhalila významný rozdiel v transkripcii *MPK5*, *MPK12* a *MPK13* v porovnaní s divým typom. Konštitutívne aktívna forma MKK6, patriaca medzi MAP2K, v *in vitro* podmienkach fosforyluje *MPK5* a *MPK13*. Zároveň je však MKK6 nadriadená v signalizačnej kaskáde voči *MPK4* pri regulácii cytokinézy. Tieto výsledky naznačujú, že *MPK4*, *MPK5* a *MPK13* sú podriadené pod MKK6 pri regulácii cytokinézy (Kosetsu *et al.*, 2010).

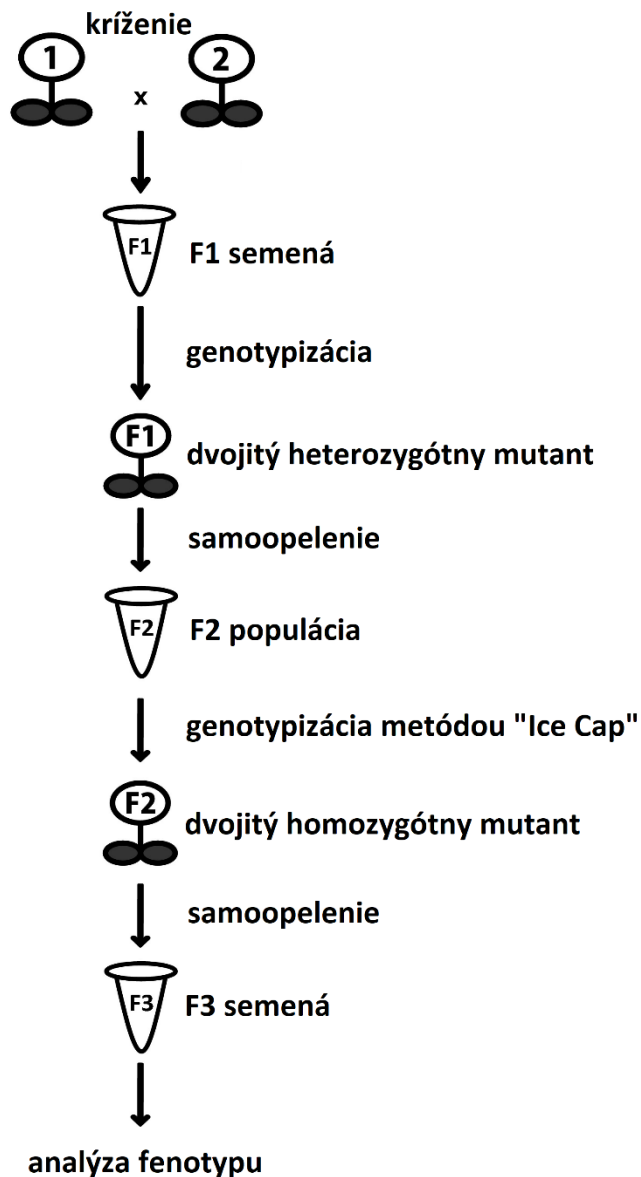
### **2.2.2.3 Dvojitý mutant *mpk4 mpk5***

Na odhalenie génových interakcií bola pripravená kolekcia dvojitých mutantov z T-DNA inzerčných jednoduchých mutantov (Su a Krysan, 2016). Na kríženie bol vždy použitý mutant defektný v géne, ku ktorému bolo žiadúce nájsť interagujúce gény. Druhý mutant bol defektný v géne, u ktorého sa predpokladá interakcia s génom prvého mutanta. Na tento účel boli teda zvolené mutanty v génoch, ktoré súvisia s MAPK signalizáciou.

Podľa Wanga (2008) až 78 % inzercií nachádzajúcich sa 501-1000 párov báz (base pairs, bp) pred štart kodónom smerom k 5' koncu DNA má za následok úplné vypnutie alebo potlačenie transkripcie génu. Preto boli na kríženie z dostupných T-DNA inzerčných mutantov v požadovaných génoch vybrané mutanty s veľkosťou inzertu 650 bp v mieste začiatku transkripcie (Su a Krysan, 2016).



Na kríženie boli vždy vybrané rastliny homozygótne recesívne v danom gène. Krížením dvoch jednoduchých mutantov boli získané rastliny F1 (Obr.2). Následným samoopelením F1 rastlín boli získané rastliny F2. Po genotypizácii F2 rastlín metódou „Ice Cap“ boli vyselektované rastliny homozygótne v oboch znakoch. Samoopelením rastlín F2 boli získané rastliny generácie F3, ktoré boli následne použité na fenotypovú analýzu.



Obr. 2 Postup tvorby dvojitých mutantov z dvoch jednoduchých mutantov pomocou kríženia. Čísla 1 a 2 označujú dvoch jednoduchých inzerčných mutantov použitých na kríženie (upravené podľa Su a Krysan, 2016).

V prípade tvorby dvojítých mutantov z jednoduchého mutantu *mpk4* boli na kríženie použité heterozygótne rastliny, keďže recesívne homozygótne rastliny v *mpk4* neprodukurujú semená (Petersen *et al.*, 2000).

Krížením bolo vytvorených 275 dvojítých mutantov. Semená z vytvorenej kolekcie dvojítých mutantov sú verejne dostupné z Arabidopsis Biological Research Center ([www.abrc.osu.edu](http://www.abrc.osu.edu)). Následná analýza fenotypu získaných mutantov odhalila génové interakcie v štyroch dvojítých mutantoch: *mpk4 anp2*, *mpk4 anp3*, *mpk4 mpk5*, a *mpk4 mpk13* (Su a Krysan, 2016).

Korene rastlín *mpk4 mpk5* sú o 30% kratšie než korene rastlín *mpk4*. Na overenie tohto pozorovania bol vytvorený dvojítý mutant, ktorý pochádzal z nezávislej línie *mpk5*. Dĺžka koreňov v oboch líniach *mpk4 mpk5* bola porovnateľná, čo potvrdzuje existenciu génovej interakcie (Su a Krysan, 2016).

### 2.3 Redundancia signálnych dráh a kondicionálny fenotyp

Priama genetická analýza (od fenotypu ku génu) a spätná genetická analýza (od génu k fenotypu) sú využívané na objasnenie funkcií všetkých génov. Spätná genetická analýza spočíva v štúdiu narušenia prirodzenej génovej aktivity (Bouché a Bouchez, 2001).

Priamou genetickou analýzou mutantov rastlín s abnormálnym fenotypom boli charakterizované gény zodpovedné za konkrétne funkcie. Po osekvenovaní genómu *A. thaliana* sa začala používať spätná genetická analýza, ktorá umožňuje priamu analýzu špecifických génov mutantov a ich možný vplyv na biologické funkcie rastliny.

Pomocou *Agrobacterium tumefaciens* boli vytvorení T-DNA inzerční „knock out“ mutanti s presne zmapovanými genetickými inzerciami spôsobujúcimi narušenie génov. (Clough a Bent, 1998; O'Malley *et al.*, 2015)

Väčšina „knock out“ inzerčných mutantov *A. thaliana* však nemá odlišný fenotyp, ktorý by odhalil funkciu vyradeného génu za štandardných kultivačných podmienok (Bouché a Bouchez, 2001, Bolle *et al.*, 2011). Je možné, že rastliny majú tzv. kondicionálny fenotyp, teda odlišný fenotyp, ktorý by sa prejavil iba pri určitých stresových podmienkach.

Rastliny ako sesilné organizmy celkovo znášajú vyššie genetické zaťaženie v porovnaní s inými eukaryotickými organizmami a sú schopné adaptovať svoju fyziológiu pri pôsobení rôznych stresov bez badateľnej zmeny morfológie. Ďalším možným vysvetlením, prečo nemajú „knock out“ mutanty odlišný fenotyp, je redundancia génov a ich funkcií, čo znamená, že viac génov v organizme má rovnakú alebo podobnú

funkciu. V genóme *A. thaliana* je približne jedna šestina všetkých génov prítomná vo viacerých kópiách, ktoré môžu mať podobné, ale aj úplne rovnaké funkcie (Bolle *et al.*, 2013).

Genetická redundancia je situácia, pri ktorej je narušenie génu selektívne neutrálne a nemá vplyv na celkovú životaschopnosť organizmu. Preto nedochádza k selekčnému tlaku voči nahromadeniu škodlivých mutácií v redundantných génoch (Bouché a Bouchez, 2001).

Ďalším možným vysvetlením je prekrývanie signalizačných dráh (Su a Krysan, 2016).

V MAPK signalizačnej dráhe v odpovedi na abiotický stres dochádza k značnému prekrývaniu dráh jednotlivých komponentov (Smékalová *et al.*, 2014).

Génová interakcia je jav, pri ktorom fenotyp dvojitého mutantu nemožno vysvetliť ako aditívny efekt fenotypov oboch jednoduchých mutantov (Phillips, 2008).

Táto genetická interakcia vždy zahŕňala zvýšenie počtu defektov vývinu a rastu koreňa pozorovaných u jednoduchého mutantu *mpk4*. Tieto dvojité mutanty boli heterozygótne v *MPK4* a homozygótne v druhej mutácii, keďže jednoduché aj dvojité mutanty homozygótne v *MPK4* sú sterilné. Pri množení týchto dvojitých mutantov samoopelením dôjde k vyštípeniu približne 25% rastlín, ktoré sú homozygótne v oboch znakoch a majú voľným okom rozpoznateľný fenotyp, vďaka čomu ich možno jednoducho vyselektovať a použiť na experimenty (Weigel a Glazebrook, 2002).

## 2.4 Odpovede rastlín na stres

### 2.4.1 Abiotický stres

Rastliny žijú v neustále meniacich sa podmienkach prostredia. Musia sa tak vysporiadať so širokou škálou stresov. Medzi najzásadnejšie abiotické stresy patrí sucho, soľný stres a extrémne teploty (Zhu, 2016). Vylepšenie adaptácie poľnohospodársky významných rastlín na takéto zmeny vedie k vyšším výnosom.

Rastliny reagujú na biotický a abiotický stres mnohými spôsobmi, pričom regulácia MAPK dráh je v oboch prípadoch jedným z najvýznamnejších obranných mechanizmov (Smékalová *et al.*, 2014).

MAPK signalizačné dráhy spúšťa chlad, sucho, teplo, pôsobenie ťažkých kovov, UV žiarenie, soľný, oxidatívny a osmotický stres, poranenie, ozón, či vietor. Najčastejšie aktivovanými kinázami v odpovedi na abiotický stres sú MPK3, MPK4 a MPK6 (Ichimura *et al.*, 2000; Teige *et al.*, 2004; Colcombet a Hirt, 2008).

Genetickou modifikáciou aktivity komponentov MAPK možno dosiahnuť lepšiu adaptáciu na stres u *A. thaliana*, ale aj u poľnohospodársky významných rastlín. Komponenty MAPK dráhy sú zahrnuté do odpovede na stres, no podieľajú sa aj na vývinových procesoch, z čoho možno usúdiť, že tieto procesy v rastlinách spolu úzko súvisia (Šamajová *et al.*, 2013b).

Mnohé signálne dráhy spustené rôznymi stresmi často zdieľajú rovnaké komponenty MAPK dráhy alebo dokonca celé kaskády (Xu a Zhang, 2015). Je možné, že odpoveď rastliny na každý z týchto stresov, je rovnaká alebo aspoň zahŕňa spoločné prvky. Napríklad, rastlina sa musí chrániť pred dehydratáciou pri suchu, ale aj v mraze (Knight a Knight, 2001).

MKK2 je aktivovaná pri soľnom strese a chlade, nie je však aktivovaná teplom ani  $H_2O_2$ . MPK4 a MPK6 sú fosforylované a aktivované MKK2 v *in vitro* ako aj v *in vivo* podmienkach (Teige *et al.*, 2004). MKK2 je fosforylovaná MEKK1.

Reaktívne formy kyslíka (reaktívne oxygen species, ROS) sú dôležitým vedľajším produktom aeróbnych organizmov (Mittler *et al.*, 2011). Tvoria súčasť signalizácie a sú dôležité v udržiavaní homeostázy bunky (Smékalová *et al.*, 2014). Rýchlu deaktiváciu ROS zabezpečujú enzýmy superoxid dismutáza a kataláza. MAPK signifikácia pri strese spôsobenom ROS a ozónom u *A. thaliana* zahŕňa aktiváciu MPK3 a MPK6 (Lee a Ellis, 2007; Lumberras *et al.*, 2010). RNAi potlačenie MKK5 v rastlinách vedie k potlačeniu odpovede MPK3 a MPK6 na ozónom spôsobený stres (Miles *et al.*, 2009).

K strate vody dochádza hlavne cez prieduchy, preto jedným zo spôsobov ochrany rastliny proti suchu je uzatvorenie prieduchov. Fosfolipáza  $\alpha 1$  (PLDa1) začne po aktivácii kyselinou abscisovou (ABA) produkovať kyselinu fosfatidovú (PA). Pri strese zo sucha sa zvýši obsah ABA v bunkách, čo má za následok uzatvorenie prieduchov. Rastliny *A. thaliana* s mutáciou PLDa1 vykazujú vyššiu stratu vody v porovnaní s rastlinami divokého typu (Hong *et al.*, 2010). RT-PCR analýza preukázala, že dochádza k vysokej expresii *MPK9* a *MPK12* v zatváracích bunkách prieduchu v porovnaní s bunkami mezofylu (Jammes *et al.*, 2009).

#### **2.4.1.1 Soľný stres**

Soľný stres spôsobuje nerovnováhu v koncentrácii  $Na^+$ ,  $Cl^-$  a ďalších iónov. Taktiež dochádza k narušeniu homeostázy minerálov, najčastejšie  $Ca^+$  a  $K^+$ . Vysoké koncentrácie  $Na^+$  a  $Cl^-$  v pôde bránia koreňom absorbovať vodu a zároveň je vysoká koncentrácia týchto iónov v rastlinách toxická (Munns, 2005). *A. thaliana*, spolu s väčšinou

poľnohospodársky významných rastlín patrí do skupiny glykofytov, čo sú rastliny, ktoré sú schopné rásť iba v prostredí s nízkou koncentráciou solí (Isayenkov, 2012).

Medzi hlavné mechanizmy obrany rastlín voči vysokým koncentráciám solí patrí zabránenie absorpcie toxických iónov a cieľená akumulácia iónov do fotosynteticky neaktívnych častí rastliny (Munns a Tester, 2008). S vysokou koncentráciou  $\text{Na}^+$  a  $\text{Cl}^-$  sa môže rastlina vysporiadať akumuláciou týchto iónov v centrálnej vakuole (Munns, 2005).

Kanály draslíka regulujú optimálny pomer  $\text{K}^+$  a  $\text{Na}^+$  iónov v bunkách.  $\text{Na}^+$  konkuruje  $\text{K}^+$  v metabolických procesoch buniek. Vysoký obsah  $\text{K}^+$  iónov v bunkách zlepšuje toleranciu rastlín voči soľnému stresu (Isayenkov, 2012).

Transportéry  $\text{Na}^+$  a  $\text{K}^+$  spolu s kanálmi na príjem  $\text{Na}^+$  a  $\text{K}^+$  hrajú dôležitú úlohu v adaptácii glykofytov aj halofytov. Na rozdielnej tolerancii glykofytov a halofytov na soľ sa podieľajú rozdiely v génovej expresii, rozdiely v štruktúre proteínov a posttranslačné modifikácie (Assaha *et al.*, 2017).

Ako už bolo spomenuté, chlad a soľný stres aktivujú signálnu dráhu MEKK1-MKK2-MPK4/MPK6, kde MEKK1 je MAP3K, ktorá ďalej v kaskáde aktivuje MKK2 (MAP2K), a tá následne aktivuje MPK4 a MPK6 (MAPK) (Teige *et al.*, 2004, Smékalová *et al.*, 2014).

Hypersenzitívna odpoveď na chlad a soľný stres bola pozorovaná u mutanta *mkk2*, ktorý nedokáže aktivovať MPK4 a MPK6. Transgénne línie nadexprimujúce *MKK2* sú schopné vysporiadať sa s mrazivými podmienkami na rozdiel od *mkk2* a rastlín divokého typu. Rastliny tejto nadexpresnej línie dosahujú na médiu s prídavkom NaCl vyššiu klíčivosť než divoký typ. Naopak, klíčivosť rastlín *mkk2* je na takomto médiu veľmi nízka (Teige *et al.*, 2004).

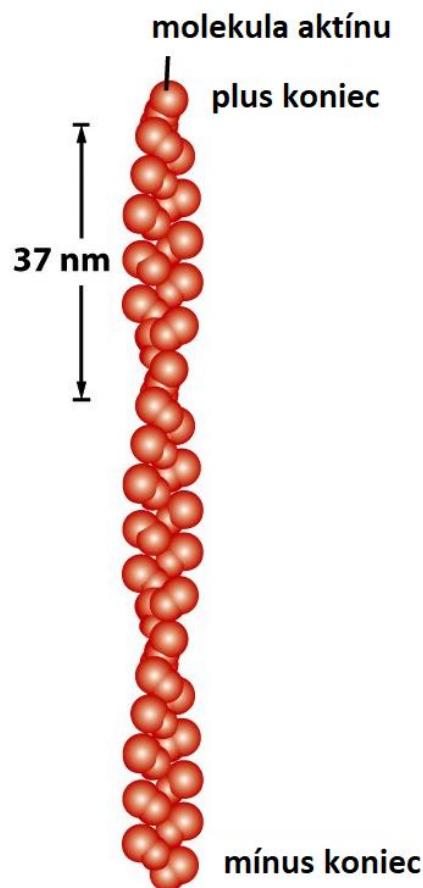
MKKK20 je zapojená do odpovede na abiotické stresy prostredníctvom aktivácie MPK6. K aktivácii MKKK20 (MAP3K) dôjde v prípade, že koncentrácia solí v rastline je dostatočne vysoká na to, aby vyvolala hyperosmotický stres. Mutanty *mkkk20* sú veľmi citlivé na vysokú koncentráciu solí a pri dehydratácii rýchlejšie strácajú vodu než rastliny divokého typu v rovnakých podmienkach. Pri pôsobení soľného stresu možno v týchto mutantoch pozorovať zvýšenú koncentráciu superoxidu v porovnaní s rastlinami divokého typu. Transgénne rastliny s nadexpresiou MKKK20 vykazovali toleranciu na soľný stres. Podrobnejšie štúdium tohto mutantu naznačuje, že MKKK20 je taktiež zapojená do odpovede na chlad, osmotický stres a ROS. MKKK20 reguluje aktivitu MPK6 po ošetrení rastlín  $\text{H}_2\text{O}_2$ , NaCl a pôsobením chladu (Kim *et al.*, 2012).

## 2.5 Cytoskelet

Rastlinný cytoskelet zabezpečuje oporu bunky, reguluje jej intracelulárnu organizáciu a vezikulárny transport a zohráva dôležitú úlohu v bunkovom delení a následnej diferenciácii (Kamal a Goldstein, 2000; Li *et al.*, 2015; Komis *et al.*, 2015; Smertenko *et al.*, 2017). Cytoskelet rastlín je zapojený do prenosu signálov z okolia a do odpovedí rastlín na vonkajšie podnety (Staiger, 2000). Cytoskelet rastlín tvoria aktínové filamenty a mikrotubuly.

### 2.5.1 Aktínové filamenty

Aktínové filamenty, taktiež nazývané aj mikrofilamenty, sú polyméry tvorené globulárnym proteínom aktínom (Obr.3). Molekula aktínu má väzobné miesto pre adenosíntrifosfát (ATP). Aktín sa v bunke nachádza buď ako voľný monomér, tzv. globulárny aktín (G-aktín), alebo ako súčasť polymérneho vlákna, tzv. filamentový aktín (F-aktín) (Allwood *et al.*, 2001).



Obr. 3 Štruktúra aktínového filamentu (upravené podľa Alberts *et al.*, 2008).

Aktínový filament pozostáva z dvoch paralelných protofilamentov, ktoré sú medzi sebou obvinuté do pravotočivej závitnice s priemerom 5-9 nm. Aktínové filamenty sú preto flexibilnejšie v porovnaní s dutou valcovitou štruktúrou mikrotubulov. Celková dĺžka aktínových filamentov dosahuje iba niekoľko desiatok mikrometrov, no v bunkách sú jednotlivé filamenty spájané a zväzokované do rozsiahlejších sietí/štruktúr (Alberts *et al.*, 2008).

Pri tvorbe nového vlákna sa spoja tri monoméry aktínu do triméru, čím vytvoria jadro, na ktoré sa začnú pridávať ďalšie podjednotky. Pri vysokej koncentrácii voľných monomérov rastie filament na oboch koncoch vlákna, avšak rýchlejšie na ostnatom konci (Lee a Dominguez, 2010). Pri poklese koncentrácie voľných monomérov sa ostnatý koniec predlžuje, ale ostrý koniec sa začne skracovať. Tento jav sa nazýva „threadmilling“. Aktínové monoméry pridávané na ostnatý koniec filamentu majú naviazanú molekulu ATP, ktorá však krátko po polymerizácii aktínu hydrolyzuje na ADP. Aktín s naviazanou molekulou ADP disociuje z filamentu ľahšie než aktín s naviazaným ATP (Cooper a Hausmann, 2007).

V génome *A. thaliana* je 10 vysoko konzervovaných génov kódujúcich jednotlivé izoformy aktínu, ktoré sa nachádzajú na chromozómoch 1, 2, 3 a 5 (McKinney a Meagher, 1998; McKinney *et al.*, 2002), pričom osem týchto génov sa v rastline preukázateľne exprimuje. Vo vegetatívnych pletivách dochádza k expresii génov ACT2, ACT7 and ACT8 (Vaškebová *et al.*, 2017), pričom gény ACT1, ACT3, ACT4, ACT11 a ACT12 sa exprimujú v reprodukčných pletivách. Gény ACT5 a ACT9 zrejme kódujú nefunkčné proteíny (McDowell *et al.*, 1996, Šlajcherová *et al.*, 2012).

### **2.5.1.1 Aktín viažuce proteíny**

Dynamiku aktínového cytoskeletu ovplyvňujú proteíny (actin-binding proteins, ABP), ktoré sa viažu buď na aktínové monoméry, tzv. G-aktín viažuce proteíny, alebo na už vzniknuté mikrofilamenty, tzv. F-aktín viažuce proteíny. Interakciou s aktínom regulujú nukleáciu, rýchlosť polymerizácie a depolymerizácie alebo spôsobujú zväzkovanie mikrofilamentov. Medzi najdôležitejšie ABP patria profilín, aktín depolymerizujúci faktor a formín. (Ayscough, 1998; Winder a Ayscough, 2005).

Profilín zabraňuje spontánnej nukleácii G-aktínu, katalyzuje výmenu ADP naviazaného na aktín za ATP, čím urýchľuje polymerizáciu (Krishnan a Moens, 2009).

Členovia génovej rodiny kofilínov (actin depolymerizing factor, ADF) stimulujú dezintegráciu aktínových filamentov. Dosahujú to dvoma rôznymi spôsobmi:

preseknutím mikrofilamentov a zároveň aj urýchľovaním oddeľovania monomérov z ostnatého konca mikrofilamentov. Genóm *A. thaliana* obsahuje 12 rôznych sekvencií pre rodinu kofilínov, i keď nie všetky gény sú funkčné (Maciver a Hussey, 2002).

Čiapočkové proteíny (capping protein, CP) majú vysokú afinitu k rýchlo rastúcemu ostnatému koncu aktínových filamentov (Hussey a Hashimoto, 2008). Zabraňujú strate aktínových podjednotiek z ostatého konca, a tak podporujú ich stabilitu (Ayscough, 1998).

Génová rodina formínov má v genóme *Arabidopsis* viac než 20 sekvencií. Kóduje dimérne proteíny. Každá podjednotka má väzobné miesto pre monomér aktínu, naviazaním dvoch monomérov predlžuje aktínové filamenty (Alberts *et al.*, 2008).

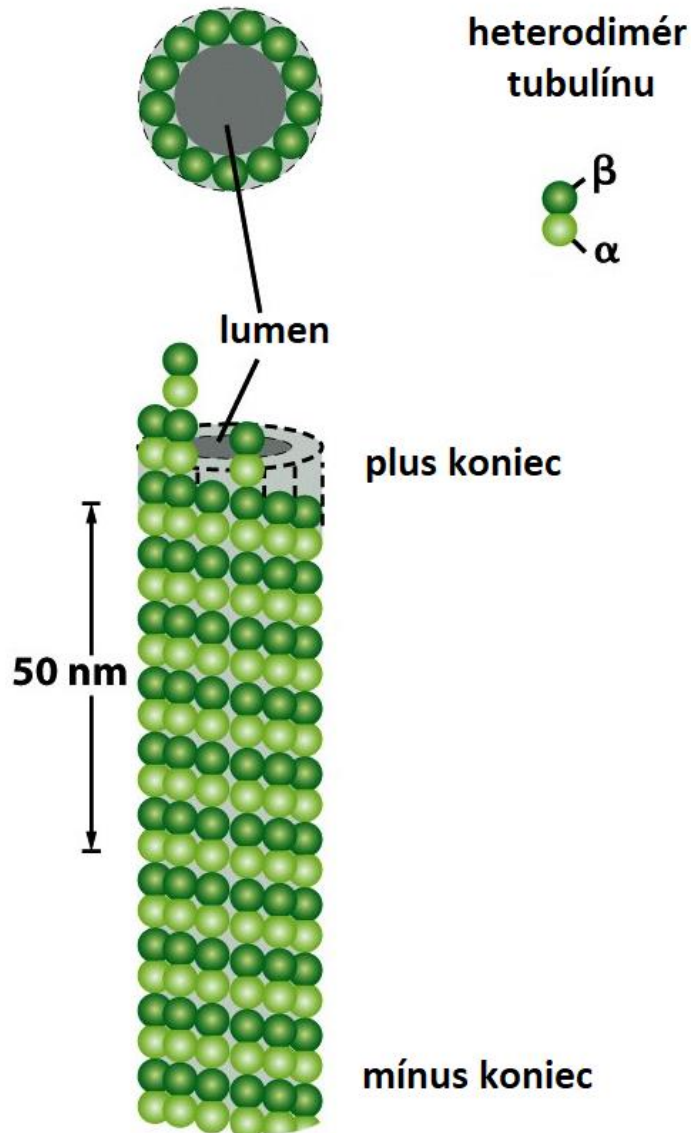
## 2.5.2 Mikrotubuly

Génovú rodinu kódujúcu  $\alpha$ -tubulíny a  $\beta$ -tubulíny u *A. thaliana* tvorí šesť génov kódujúcich štyri rôzne izoformy  $\alpha$ -tubulínu (Kopczak *et al.*, 1992) a deväť génov kódujúcich osem rôznych izoforiem  $\beta$ -tubulínu (Snustad *et al.*, 1992). Genóm kóduje aj dve  $\gamma$ -tubulínové izoformy (Liu *et al.*, 1994). Rôznorodosť tubulínových izoforiem zvyšujú aj následné posttranslačné modifikácie (Magiera a Janke, 2014).

Mikrotubuly sú dlhé duté valcovité štruktúry s vonkajším priemerom 25 nm, ktorý ich robí odolnejšími než aktínové filamenty (Wade, 2009). Vnútorňý priemer mikrotubulov je 14 nm. Mikrotubuly bývajú rovné a dlhé, jeden z koncov býva pripojený na mikrotubuly-organizujúce centrum (MTOC) a predlžujú sa na plus konci smerom k cytoplazmatickej membráne (Wade, 2009).

Mikrotubuly sú tvorené heterodimérmi. Heterodiméry mikrotubulov sa skladajú z dvoch globulárnych proteínov,  $\alpha$ -tubulínu a  $\beta$ -tubulínu (Obr.4), spojených nekovalentnou väzbou. (Nogales *et al.*, 1999). Každá podjednotka heterodiméru viaže jednu molekulu guanozíntrifosfátu (GTP), takže heterodimér má dve väzobné miesta pre GTP. N-miesto (non-exchangeable) je v  $\alpha$ -tubulíne nedostupné, preto nedochádza k hydrolyze naviazaného GTP. Molekula GTP tak tvorí integrálnu časť heterodiméru. Naopak, GTP na E-mieste (exchangeable) v  $\beta$ -tubulíne je prístupný na konci nepolymerizovaného diméru (Hyman *et al.*, 1992).





Obr. 4 Štruktúra mikrotubulov (upravené podľa Alberts *et al.*, 2008).

Pri zostavovaní mikrotubulov je koniec s  $\beta$ -tubulínom s naviazaným GTP pripojený k  $\alpha$ -tubulínu ďalšej molekuly heterodiméru, a tak sa postupne vytvorí protofilament (Hussey a Hashimoto, 2015). Molekula GTP naviazaná na  $\beta$ -tubulíne je po polymerizácii hydrolyzovaná na GDP.

Charakteristická je štruktúrna polarita mikrotubulov. Dynamickejší koniec mikrotubulov, na ktorom dochádza k rýchlejšej polymerizácii a depolymerizácii, je označovaný ako plus koniec. Opačný koniec je označovaný ako mínus koniec. Pri väzbe ďalšieho heterodiméru na predlžujúci sa plus koniec  $\alpha$ -tubulínová podjednotka interaguje s E-miestom GTP na koncovej  $\beta$ -tubulínovej podjednotke, čím spustí hydrolýzu GTP. Podjednotka  $\alpha$ -tubulínu pôsobí ako aktivačný proteín GTPázy (GTPase-activating protein, GAP) v E-mieste.

Protofilamenty sa združujú paralelne k sebe, pričom bývajú pri sebe pripojené rovnaké podjednotky ( $\alpha$ - $\alpha$  a  $\beta$ - $\beta$ ). Laterálne väzby však bývajú neporovnateľne slabšie než longitudinálne väzby. Charakteristickú dutú štruktúru mikrotubulov tvorí spolu 13 spojených protofilamentov (Tilney *et al.*, 1973, Cooper a Hausmann, 2007).

Mikrotubuly tak tvoria veľkú a pevnú štruktúru, k rozpadu či oddeleniu molekúl dochádza spravidla iba z koncov mikrotubulov.

Dynamická nestabilita mikrotubulov je spôsobená súčasnou polymerizáciou a depolymerizáciou na rovnakom mikrotubulovom vlákne. Z mínus konca disociujú diméry s naviazaným GDP. Zároveň sa mikrotubuly predlžujú na plus konci väzbou dimérov s GTP. K tomuto procesu označovanému ako „threadmilling“ dochádza aj v aktínových filamentoch. Ak polymerizácia prebieha rýchlejšie než depolymerizácia, dochádza ku kontinuálnemu rastu vlákna, v opačnom prípade sa mikrotubuly skracujú (Rodionov a Borisy, 1997; Cooper a Hausmann, 2007).

### **2.5.2.1 Mikrotubuly viažúce proteíny**

Dynamika mikrotubulov je regulovaná proteínmi, ktoré s nimi asociujú (microtubule-associated proteins, MAPs), rozkladajú ich, prípadne zrýchľujú depolymerizáciu na koncoch mikrotubulov. Ďalšie proteíny z tejto triedy naviazaním sa na mikrotubuly zvyšujú ich stabilitu. Interakcie stabilizujúcich proteínov s mikrotubulmi tvoria dôležitý mechanizmus na určenie tvaru a polaritu bunky (Cooper a Hausmann, 2007). Interakcie s MAPs umožňujú tvorbu komplexnej siete mikrotubulov v rastlinnej bunke (Gardiner, 2013).

Rastlinné MAPs možno rozdeliť do piatich skupín: mikrotubulové crosslinkery, motorové proteíny, regulátory tvorby a dynamiky mikrotubulov, proteíny viažúce sa na plus koniec mikrotubulov a regulátory skladania tubulínu, tzv. prefoldíny (Gu *et al.*, 2008).

K najlepšie preskúmaným génovým rodinám v rámci mikrotubulových crosslinkerov patria proteíny MAP65, ktoré spájajú mikrotubuly medzi sebou a spôsobujú ich zväzkovanie.

Genóm *A. thaliana* kóduje 9 génov z rodiny MAP, označovaných AtMAP65-1 až AtMAP65-9 (Smertenko *et al.*, 2008).

Sekvencia týchto génov preukazuje 28 % zhodu medzi MAP65-4 a MAP65-8, a až 78% zhodu medzi MAP65-1 a MAP65-2 (Hussey *et al.*, 2002).

MAP65-1 spôsobuje zväzkovanie mikrotubulov tvorbou mostíkov medzi paralelnými mikrotubulmi, avšak nepodporuje polymerizáciu proteínov. Zväzkovaním mikrotubulov sa zvyšuje stabilita mikrotubulov, zabraňuje sa katastrofe, a tým sa redukuje depolymerizácia mikrotubulov (Smertenko *et al.*, 2004). MAP65-1 spolu s MAP65-2 hrá dôležitú úlohu pri raste koreňa, podporuje bunkové delenie a axiálne predlžovanie (Lucas a Shaw, 2012). V *in vitro* podmienkach sú MAP65-1 a MAP65-2 fosforylované MPK4 (Sasabe *et al.*, 2011). Expresia konštruktu *MAP65-1:GFP* a *MAP65-2:GFP* v suspenznej kultúre tabaku BY-2 odhalila, že oba proteíny sú počas cytokinézy lokalizované vo fragmoplaste (Sasabe *et al.*, 2011).

MAP65-3 je dôležitý pri organizácii mikrotubulov počas mitózy a cytokinézy. Udržiava integritu prekrývajúcich sa mikrotubulov vo fragmoplaste (Müller *et al.*, 2004). Taktiež hrá dôležitú úlohu pri infekcii patogénmi *Hyaloperonospora arabidopsidis* a *Erysiphe cruciferarum* (Quentin *et al.*, 2016). Mutant *map65-3* je menej náchylný na infekciu, pretože veľké bunky v koreňoch, ktoré využíva patogén na výživu sa bez funkčného proteínu MAP65-3 nediferencujú úplne a nie sú životaschopné (Caillaud *et al.*, 2008).

MAP65-4 asociuje s deliacim vretienkom počas profázy a s kinetochorickými vláknami od prometafázy až do konca anafázy. Tvorba mostíkov medzi priľahlými mikrotubulmi v *in vitro* podmienkach spôsobuje zväzkovanie mikrotubulov a sprevádza ich predlžovanie (Fache *et al.*, 2010).

MAP65-5 zväzkovaním antiparalelných mikrotubulov podporuje tvorbu dvojdimenzionálnej siete. V *in vivo* podmienkach sa MAP65-5 viaže na PPB a na mikrotubuly deliaceho vretienka počas profázy (Gaillard *et al.*, 2008).

MAP65-6 kolokalizuje s mitochondriami a spôsobuje reorganizáciu mikrotubulov do sieťovitej štruktúry, pričom však mikrotubuly nezväzkuje (Mao *et al.*, 2005).

Imunolokalizácia MAP65-8 a MAP65-9 nepreukázala prítomnosť týchto proteínov v kortikálnych mikrotubuloch, PPB alebo fragmoplaste (Smertenko *et al.*, 2008). Funkcia a lokalizácia MAP65-7 zatiaľ nebola preskúmaná.

## 2.6 Bunkové delenie

Cytokinéza rastlinných buniek je regulovaná fragmoplastom, mikrotubulmi, aktínovými filamentmi a asociovanými molekulami, ktoré tvoria konštrukciu pre vytvorenie novej bunkovej steny (Otegui *et al.*, 2005). Počas bunkového cyklu dochádza k reorganizácii

mikrotubulov. Ako bolo spomenuté, proteín MAP65 zväzkuje mikrotubuly. Je kľúčový pre integritu vretienka počas anafázy a pri bunkovom delení.

PPB určuje rovinu bunkového delenia ešte pred začiatkom mitózy (Verma, 2001). PPB je prstenec, ktorý pozostáva z nahusto uložených kortikálnych mikrotubulov a aktínových filamentov. Tvorí sa po replikácii DNA v G<sub>2</sub> fáze bunkového cyklu ešte pred začatím profázy. Následne sa jadro bunky presunie do stredu PPB. Nasleduje karyokinéza, keď sa deliace vretienko v metafáze napojí na skondenzované chromozómy a počas anafázy rozdelí sesterské chromatídy na opačné póly bunky. Medzi dvoma sesterskými novovzniknutými jadrami začne vznikať fragmoplast zo zvyškov mikrotubulov deliaceho vretienka. Fragmoplast pozostáva z aktínových filamentov, dvoch antiparalelných sád mikrotubulov a rôznych proteínov. Mikrotubuly vo fragmoplaste sú orientované plus koncom k rovine bunkového delenia (Otegui a Staehelin, 2000). V miestach, kde bol predtým vytvorený PPB, sa z fragmoplastu následne vytvorí bunková prepážka, ktorá sa postupne rozširuje centrifugálne a splýva s plazmatickou membránou materskej bunky (Lucas *et al.*, 2006). Kalóza a ďalšie polysacharidy potrebné na rast bunkovej prepážky sa tvoria v Golgiho aparáte a sú transportované pomocou mikrotubulov. Vezikuly z Golgiho aparátu obsahujúce kalózu splývajú s okrajom bunkovej prepážky (Otegui *et al.*, 2005), a tak ju rozširujú, až pokým nedosiahnu bunkovú stenu materskej bunky (Nishihama a Machida, 2001).

Celulózu možno detekovať v bunkovej prepážke, keď začne splývať s materskou bunkovou stenou a dozrievať. Pri dozrievaní celulóza nahrádza kalózu. Tento fakt naznačuje, že celulózasyntáza je dopravená k bunkovej prepážke pomocou vezikúl z Golgiho aparátu (Verma, 2001).

## 3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

### 3.1 Materiál

#### 3.1.1 Biologický materiál

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

*Arabidopsis thaliana* T-DNA inzerčný „knock out“ mutant *mpk4* (SALK\_056245), ekotyp Col-0.

*Arabidopsis thaliana* T-DNA inzerčný „knock out“ mutant *mpk5* (WiscDsLox430A12), ekotyp Col-0.

*Arabidopsis thaliana* „knock out“ mutant *mpk4 mpk5* vytvorený krížením línií mutantu *mpk4* (SALK\_056245) a mutantu *mpk5* (WiscDsLox430A12) (Su a Krysan, 2016).

*Arabidopsis thaliana* exprimujúci marker aktínového cytoskeletu (*35S::GFP:FABD2*), ekotyp Col-0.

*Arabidopsis thaliana* exprimujúci marker tubulínového cytoskeletu (*35S::TUA6:GFP*), ekotyp Col 0.

#### 3.1.2 Chemikálie

Alfa Aesar: Gellan Gum

BioRad: monoklonálna protilátka anti- $\alpha$ -tubulín YOL1/34

Desert Biological: meiceláza

Duchefa Biochemie: Murashige & Skoog Medium Basal Salt Mixture,

Invitrogen: 6x DNA Loading Dye, marker molekulárnej veľkosti GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, súprava na genotypizáciu Phire Plant Direct PCR Kit, konjugovaná sekundárna protilátka (kozia anti-potkania) Alexa Fluor 488 Goat anti-rat IgG (H+L)

Nippon Genetics: Midori Green fluorescenčné farbivo

Polysciences: paraformaldehyd

Serva: celuláza, macerozým

Sigma Aldrich: 4',6-diamidín-2-fenylindol (DAPI), agaróza, dimethylsulfoxid (DMSO), ethylendiaminotetraoctová kyselina (EDTA), glutaraldehyd, glycerol, hovädzí sérový albumín (BSA), chlorid draselný (KCl), chlorid sodný (NaCl), kyselina octová, MES monohydrát, Nonidet P-40, parafenyléndiamín, sacharóza,

tetrahydroboritan sodný (NaBH<sub>4</sub>), tris(hydroxymetyl)aminometán (TRIS)

Zeiss: Imerzný olej 518F

### **3.1.2.1 Roztoky a médiá**

#### Pevné kultivačné ½ MS médium

2,15 g·l<sup>-1</sup> Murashige & Skoog Medium Basal Salt Mixture  
10 g·l<sup>-1</sup> sacharóza  
6 g·l<sup>-1</sup> Gellan Gum  
1 g·l<sup>-1</sup> MES  
1 l miliQ H<sub>2</sub>O  
pH 5,8  
sterilizácia autoklávaním

#### Tekuté ½ MS médium

2,15 g·l<sup>-1</sup> Murashige & Skoog Medium Basal Salt Mixture  
10 g·l<sup>-1</sup> sacharóza  
1 g·l<sup>-1</sup> MES  
1 l miliQ H<sub>2</sub>O  
pH 5,8  
sterilizácia autoklávaním

#### Tekuté ½ MS médium s obsahom 150 mmol·l<sup>-1</sup> NaCl

2,15 g·l<sup>-1</sup> Murashige & Skoog Medium Basal Salt Mixture  
10 g·l<sup>-1</sup> sacharóza  
1 g·l<sup>-1</sup> MES  
1 l miliQ H<sub>2</sub>O  
pH 5,8  
sterilizácia autoklávaním  
8,766 g·l<sup>-1</sup> NaCl

Tekuté ½ MS médium s obsahom 150 mmol·l<sup>-1</sup> KCl

2,15 g·l <sup>-1</sup>	Murashige & Skoog Medium Basal Salt Mixture
10 g·l <sup>-1</sup>	sacharóza
1 g·l <sup>-1</sup>	MES
1 l	miliQ H <sub>2</sub> O
	pH 5,8
	sterilizácia autoklávovaním
11,183 g·l <sup>-1</sup>	KCl

PBS (fosfátom tlmený sol'ný roztok)

0,14 mmol·l <sup>-1</sup>	NaCl
2,7 mmol·l <sup>-1</sup>	KCl
6,5 mmol·l <sup>-1</sup>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O
1,5 mmol·l <sup>-1</sup>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	miliQ H <sub>2</sub> O
	pH 7,3

MTSB (pufor stabilizujúci mikrotubuly)

50 mmol·l <sup>-1</sup>	PIPES
5 mmol·l <sup>-1</sup>	MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O
5 mmol·l <sup>-1</sup>	EGTA
	pevný KOH
	miliQH <sub>2</sub> O
	pH 6,9

Fixačný roztok

12,5 ml	MTSB
2,35 ml	paraformaldehyd (16%)
0,5 ml	glutaraldehyd (25%)
9,65 ml	miliQ
25 µl	Triton X-100

Redukčný roztok

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

#### Enzymatický roztok

15 ml	PBS
0,15 g	meiceláza
0,15 g	celuláza
0,15 g	macerozým

#### Permeabilizačný roztok

30,8 ml	PBS
3,5 ml	DMSO (10%)
0,7 ml	Nonidet P-40 (2%)

#### Zalievacie médium

15 mg	parafenyléndiamín
30 $\mu$ l	DMSO (10%)
14 ml	glycerol
1 ml	1,5 mol $\cdot$ l <sup>-1</sup> TRIS HCl pufor, pH 8,8

#### 1% agarózový separačný gél

0,9 g	agaróza
90 ml	1x TAE pufor
4,75 $\mu$ l	fluorescenčné farbivo Midori

#### TAE pufor

121 g	trishydroxymetylaminometán (TRIS)
50 ml	kyselina etyléndiamíntetraoctová (EDTA)
422 ml	miliQ H <sub>2</sub> O
28,55 ml	kyselina octová (99,5%)

### **3.1.3 Prístroje**

laboratórne predvážky S1502 (Bel Engineering)

analytické váhy XA110/2X (Radwag)

pH meter Cyberscan 310 (Eurotech Instruments)

elektromagnetická miešačka MSH-420 (Boeco)

vortex (Labnet)

flowbox (Faster)

digestor (Merci)



fytotron (Weiss Gallenkamp)  
trepačka nastaviteľnou teplotou inkubácie ES-20 (Biosan)  
skener ImageScanner III (Epson)  
konfokálny laserový skenovací mikroskop LSM 710 (Zeiss)  
stereomikroskop MSZ 5000 (Krüss)  
binokulárna lupa M165FC s CCD kamerou (Leica Microsystem)  
PCR thermocyklier MyCycler™ Thermal Cycler (BioRad)  
vizualizátor na gély Gel Doc™ EZ Imager (BioRad)

### **3.1.4 Software**

Inkscape 0.92.3, Leica Application Suite, Microsoft Office Excel 2016, Microsoft Office PowerPoint 2016, EPSON Scan, Zeiss ZEN Blue 2011, Zeiss ZEN Black 2011

## **3.2 Metódy**

### **3.2.1 Povrchová sterilizácia semien**

Semená boli sterilizované v mikroskúmavke s objemom 1,5 ml; pričom semená zaplnili maximálne objem 0,2 ml. Sterilizácia prebehla za sterilných podmienok v laminárnom boxe nasledujúcim postupom:

- 1) premytie semien v 1 ml 70% etanolu po dobu 5 minút,
- 2) odpipetovanie 70% etanolu z mikroskúmavky,
- 3) premytie semien v 1 ml 96% etanolu po dobu 3 minút v prípade semien mutantných línií a 4 minúty v prípade semien divokého typu,
- 4) odpipetovanie 96% etanolu z mikroskúmavky,
- 5) dvakrát premytie semien v sterilnej destilovanej vode po dobu 2 minút a odpipetovanie vody,
- 6) premytie semien v sterilnej destilovanej vode po dobu 5 minút,
- 7) odpipetovanie polovičného objemu vody.

Následne bola suspenzia semien a vody prenesená pipetou so špičkou s odstrihnutým koncom na Petriho misku s filtračným papierom. Po vyschnutí filtračného papiera bola miska uzatvorená parafilmom. Takto sterilizované semená boli skladované v chladničke pri teplote 4 °C.

### 3.2.2 Príprava kultivačných médií

Na kultiváciu bolo použité pevné  $\frac{1}{2}$  MS médium. V 1 l destilovanej vody bolo za neustáleho miešania rozpustených 2,15 g MS Salts Basal Salts Mixture, 10 g sacharózy a 1 g MES. Do každej zo štyroch fliaš s objemom 500 ml bolo pridaných 1,5 g Gellan Gum. Hodnota pH bola upravená na 5,8 pomocou  $10 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a následne  $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  KOH. Do každej fľaše bolo naliatych 250 ml média. Fľaše boli sterilizované autoklávaním.

Tekuté  $\frac{1}{2}$  MS médium použité na vyvolanie stresu bolo pripravené rovnako ako pevné  $\frac{1}{2}$  MS médium s tým rozdielom, že do fliaš nebol pridaný Gellan Gum. Na vyvolanie stresu boli použité médiá s obsahom solí, konkrétne  $150 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  KCl a  $150 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaCl. Soli boli za neustáleho miešania pridané do sterilizovaného média bezprostredne pred ošetrovaním rastlín.

### 3.2.3 Optimalizácia podmienok *in vitro* kultivácie rastlín

Sterilizované médium bolo rozpustené a do štvorcových Petriho misiek bolo naliatych 50 ml média. Po stuhnutí média boli na povrch média vysiate sterilizované semená *A. thaliana*.

Vo flowboxe boli sterilizované semená vysiate na Petriho misku s pevným  $\frac{1}{2}$  MS médium. Následne boli misky uzatvorené parafilmom a chirurgickou páskou. Misky s vysiatymi semenami boli ponechané 72 hodín v chladničke pri  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , aby prešli procesom stratifikácie. Počas uskladnenia v tme, chlade a vlhku semená absorbujú vlhkosť a živiny. Následné klíčenie všetkých semien je synchronizované.

Po 72 hodinách v chladničke boli misky so semenami premiestnené do fytotronu, kde boli kultivované vertikálne, pri teplote  $21 \text{ }^\circ\text{C}$ , vlhkosti 70% a fotoperióde 16 h svetlo, 8 h tma.

### 3.2.4 Selekcia rastlín na imunocytochemickú lokalizáciu

Ako už bolo spomenuté, rastliny *mpk4* a *mpk4 mpk5* vykazujú abnormálny fenotyp iba v prípade, že obe alely *MPK4* sú vyradené z funkcie, teda, že rastlina je v danom znaku homozygót. Tento fenotyp možno pozorovať už na rastlinách starých 2 dni.

Po 72 hodinách kultivácie vo fytotrone boli selektované rastliny *mpk4* a *mpk4 mpk5*. Na selekcii bol použitý stereomikroskop. Rastliny, ktoré vykazovali normálny rast, dĺžku koreňa a štruktúru koreňových vláskov, boli z misky odstránené a neboli použité na experimenty.

Rastliny *mpk5* a rastliny divokého typu neboli selektované, na experimenty boli použité všetky.

### 3.2.5 Indukcia soľného stresu

Petriho misky s rastlinami boli umiestnené na kývačky pri 15 otáčkach za minútu (revolutions per minute, RPM) a následne boli zaliate 10 ml 150 mmol·l<sup>-1</sup> NaCl alebo KCl v ½ MS médiu. Rastliny boli premývané po dobu 30 minút.

### 3.2.6 Imunocytochemická lokalizácia metódou „whole mount“

Na imunocytochemickú lokalizáciu  $\alpha$ -tubulínu bol použitý protokol podľa Šamajovej *et al.* (2014), mierne upravený podľa potrieb tohto experimentu.

Petriho misky s vysadenými semenami línií *mpk4*, *mpk5*, *mpk4 mpk5* a divokým typom Col-0 boli uložené do chladničky na 72 hodín pri teplote 4 °C. Následne boli kultivované 3 dni vo fytotrone pri teplote 21 °C, 70% vlhkosti a fotoperióde 16 h svetlo, 8 h tma, vo vertikálnej polohe.

Po navodení soľného stresu opísaného v predchádzajúcej podkapitole boli rastliny prenesené do plastových košíkov s membránou, ktoré boli umiestnené do jamiek kultivačnej doštičky s napipetovaným fixačným roztokom. Kultivačná doštička bola vložená do exsikátora a rastliny vo fixačnom roztoku boli vystavené vákuu dva razy po dobu 3 minút. Následne boli rastliny ponechané 1 hod vo fixačnom roztoku pri izbovej teplote (room temperature, RT). Takto zafixované rastliny boli dvakrát premyté po dobu 10 min v ½ MTSB a dvakrát premyté v PBS po dobu 10 minút. Rastliny boli prenesené do redukčného roztoku, kde prebiehala redukcia trikrát po dobu 5 minút. Redukčný roztok bol vymývaný päťkrát v PBS. Nasledovalo enzymatické natrávenie bunkovej steny enzymatickým roztokom v inkubátore pri 30 °C po dobu 30 min. Následne boli rastliny premyté štyrikrát v PBS po dobu 5 minút. Nasledovalo ošetrovanie permeabilizačným roztokom počas 60 min. Potom boli rastliny štyrikrát premyté v PBS po dobu 10 min. Na blokovanie bol použitý 5% roztok BSA v PBS, inkubácia trvala 60 min. Primárna protilátka anti- $\alpha$ -tubulín (YOL1/34) bola zriedená v 2,5% roztoku BSA v PBS v pomere 1:300. Rastliny boli inkubované v primárnej protilátke počas noci pri 4°C.

Na druhý deň boli vzorky šesťkrát premyté v 5% roztoku BSA v PBS. Nasledovala inkubácia koziou anti-krysou sekundárnou protilátkou Alexa Fluor 488 rozriedenou v 2,5% roztoku BSA v PBS v pomere 1:500. Inkubácia prebiehala 90 min v inkubátore pri 37 °C a následne 90 min pri RT. Vzorky boli trikrát premyté v PBS po dobu 10 min.

Nasledovalo značenie jadier fluorescenčným farbivom DAPI po dobu 10 min, pričom bol použitý 10 mmol·l<sup>-1</sup> zásobný roztok DAPI zriedený v PBS v pomere 1:1000. Nasledovalo trojnásobné premytie v PBS, vždy počas 10 min.

Rastliny boli prenesené na podložné sklíčko do kvapky zalievacieho média, prekryté krycím sklíčkom a okraje boli utesnené lakom na nechty.

Vzorky boli pozorované konfokálnym laserovým skenovacím mikroskopom LSM 710 (Zeiss). Na excitáciu fluorescenčného farbiva DAPI bol použitý laser s vlnovou dĺžkou 405 nm, emisný filter prepúšťal žiarenie s vlnovou dĺžkou 410-503 nm. Fluorescenčné farbivo Alexa Fluor 488 bolo excitované laserom s vlnovou dĺžkou 488 nm a emisný filter prepúšťal žiarenie s vlnovou dĺžkou 490-547 nm.

### **3.2.7 Kríženie *mpk4 mpk5* s markermi cytoskeletu**

#### **3.2.7.1 Selekcia rastlín**

Semená *mpk4* a *mpk4 mpk5* boli vysiate do Petriho misiek vo flowboxe v sterilných podmienkach na ½ MS pevné médium a boli uložené do chladničky na dva dni pri teplote 4 °C. Potom boli kultivované vo fytotrone pri teplote 21 °C, 70% vlhkosti a fotoperióde 16 h svetlo, 8 h tma vo vertikálnej polohe. Po štyroch dňoch boli rastliny selektované podľa charakteristického fenotypu, pričom boli z Petriho misiek odstránené zakrpatené rastliny s deformovaným koreňom vykazujúce fenotyp mutanta, ktorý je recesívne homozygótny v *MPK4*. Ako už bolo spomenuté, mutant *mpk4 mpk5* recesívne homozygótny v *MPK4* neprodukuje semená. Selekcia prebehla vo flowboxe.

Z rastlín, ktoré nevykazovali neobvyklý fenotyp, bol odobratý list, ktorý bol následne rozsuspenzovaný v extrakčnom pufre v mikroskúmvke pomocou pipetovej špičky. Mikroskúmvky boli ponechané na ľade 60 min, neskôr boli uskladnené v mrazničke pri -20 °C. Vzorky boli použité na genotypizáciu.

#### **3.2.7.2 Genotypizácia PCR a agarózová elektroforéza**

Genotypizácia bola uskutočnená s použitím Phire Plant Direct PCR Kit (Tab. 1). Na amplifikáciu cieľovej sekvencie boli použité príslušné kombinácie primerov (Tab. 2), s komplementárnou sekvenciou k amplifikovanému úseku DNA vlákna (Tab. 3). Priebeh reakcií je zhrnutý nižšie (Tab. 4).

Tab. 1 Zloženie a objemy 1 reakcie PCR mixu

	<b>objem 1 reakcie (spolu 15 <math>\mu</math>l)</b>
dH <sub>2</sub> O	5,7 $\mu$ l
2x PCR pufor	7,5 $\mu$ l
primer forward (koncentrácia 0,5 $\mu$ mol $\cdot$ l <sup>-1</sup> )	0,375 $\mu$ l
primer reverse (koncentrácia 0,5 $\mu$ mol $\cdot$ l <sup>-1</sup> )	0,375 $\mu$ l
Phire Polymeráza	0,3 $\mu$ l
DNA templát	0,75 $\mu$ l

Tab. 2 Použité kombinácie primerov

<b>sada primerov</b>	<b>amplifikovaná alela</b>
MPK4 FW + MPK4 Rev	divoký typ <i>MPK4</i>
MPK4 Rev + MLB1	mutantná alela <i>MPK4</i>
MPK5 FW + MPK5 Rev	divoký typ <i>MPK5</i>
MPK5 FW + p745	mutantná alela <i>MPK5</i>

Tab. 3 Sekvencie použitých primerov

<b>primer</b>	<b>sekvencia primeru 5'→3'</b>
MPK4 FW	CGGTGAAACAATGACACGAGA
MPK4 Rev	CCGCTTCAACAGATGGTTACG
MPK5 FW	GTTAAGGAGCTACCTAAGTTCCCAAG
MPK5 Rev	CATGAGATGAAGGAGAAACAGAGCT
p745	AACGTCCGCAATGTGTTATTAAGTTGTC
MLB1	GTGGACTCTTGTTCCAAACTG

Tab. 4 Reakčné podmienky PCR

<b>fáza reakcie</b>	<b>čas</b>	<b>teplota</b>	<b>počet opakovaní</b>
počiatočná denaturácia	30 s	98 °C	1
denaturácia	5 s	98 °C	35
nasadenie primerov	5 s	67 °C	35
elongácia	20 s	72 °C	35
konečná elongácia	5 min	72 °C	1

Po prevedení PCR reakcie boli vzorky v thermocykleri zachladené a udržiavané pri teplote 4 °C. Do každej vzorky boli pridané 3 µl nanášacieho pufru 6x Loading Dye. Do jamiek v 1% agarózovom separačnom géli umiestnenom v elektroforézovej vaničke bolo z každej vaničky nanesených 13 µl vzorky. Do okrajových jamiek gélu bol na porovnanie veľkosti produktov po separácii napipetovaný marker molekulárnej veľkosti GeneRuler. Gél bol zaliaty 1x TAE pufrom. Separácia prebiehala 35 min, pričom bolo použité napätie 85 V a elektrický prúd 400 mA. Po ukončení elektroforézy bol gél analyzovaný vo vizualizátore.

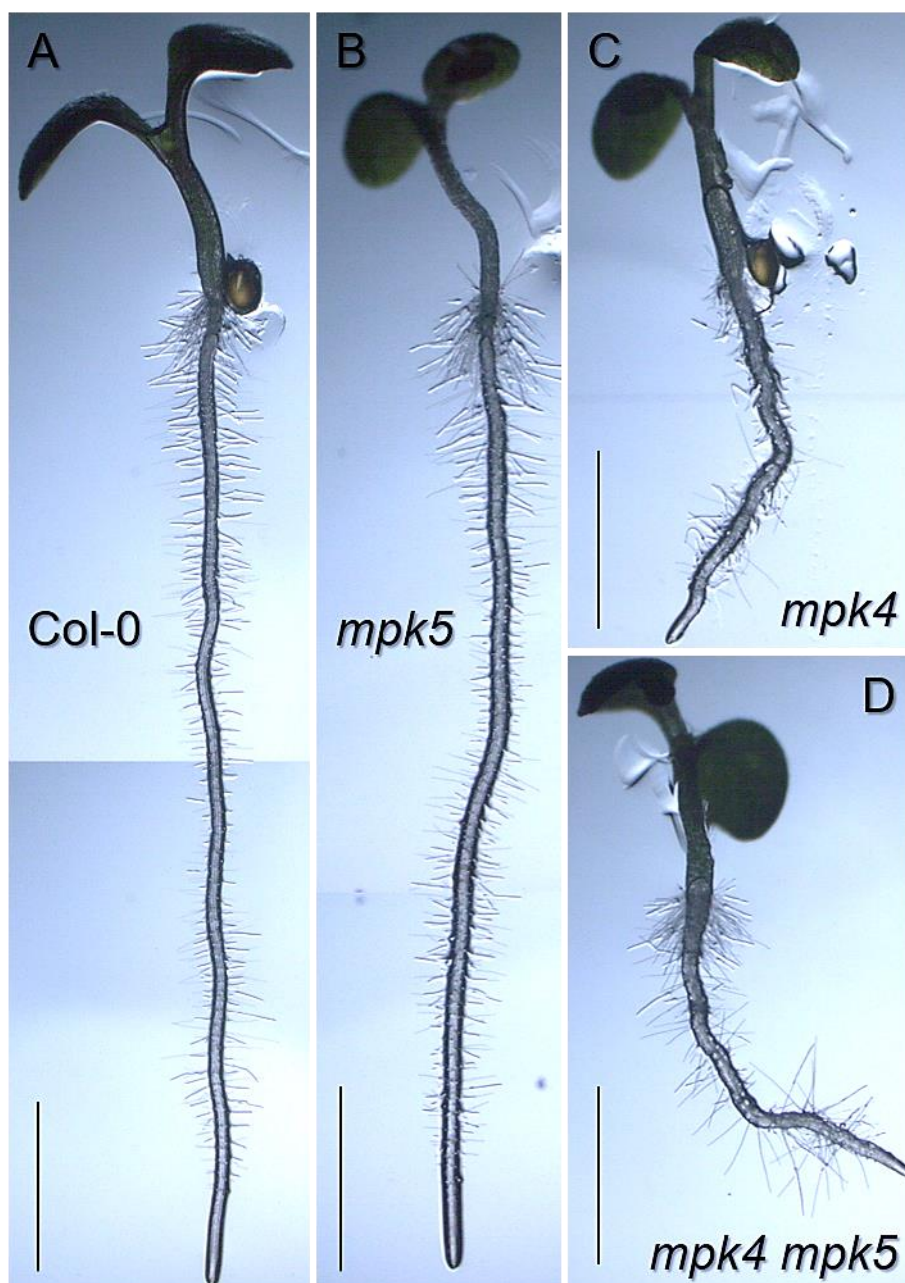
### 3.2.7.3 Kríženie rastlín

Rastliny, u ktorých genotypizácia preukázala, že sú heterozygótne v *MPK4* a homozygótne v *MPK5*, boli po 2 týždňoch kultivácie v *in vitro* podmienkach presadené z Petriho misiek do kvetináčov s pôdou a ďalej boli kultivované vo fytotrone pri 21 °C, 60% vlhkosti a fotoperióde 16 h svetlo, 8 h tma. Samotné kríženie prebehlo po tom, ako sa začali vyvíjať kvetné púčiky na rastlinách. Kvetné púčiky na rastlinách *mpk4 mpk5*, ktoré ešte neboli rozvinuté a nezačali produkovať peľ, boli pomocou pinzety otvorené a z kvetu boli odstránené všetky peľnice. Na bliznu piestika takto upravených kvetov bol prenesený peľ z rastlín Col-0 exprimujúcich markery cytoskeletu (*35S::GFP:FABD2* a *35S::TUA6:GFP*). Kvetné púčiky boli následne opatrne uzatvorené a označené.

## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Optimalizácia podmienok *in vitro* kultivácie rastlín v podmienkach abiotického stresu

Na experiment boli použité línie *mpk4*, *mpk5* a *mpk4 mpk5*, ako kontrola boli použité semená divokého typu Col-0 (Obr. 5).



Obr. 5 Rastliny po 4 dňoch kultivácie na  $\frac{1}{2}$  MS médiu. Mierka 2 mm.  
A Fenotyp rastliny divokého typu Col-0. Fotka je zložená z dvoch snímok.  
B Fenotyp mutanta *mpk5*. Fotka je zložená z dvoch snímok.  
C Fenotyp mutanta *mpk4*.  
D Fenotyp mutanta *mpk4 mpk5*.

Po troch dňoch kultivácie boli rastliny na Petriho miskách zaliate 10 ml tekutého  $\frac{1}{2}$  MS média s obsahom  $150 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaCl alebo  $150 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  KCl. Misky boli 30 minút premývané na kývačkách pri 15 RPM. Ako kontrola boli použité rastliny, ktoré boli premývané iba čistým  $\frac{1}{2}$  MS médiom a rastliny, ktoré neboli premývané vôbec.

Následne boli rastliny podrobené imunocytochemickej lokalizácii metódou „whole mount“.

## **4.2 Imunocytochemická lokalizácia cytoskeletu u vybraného dvojitého mutanta metódou „whole mount“ v kontrolných a stresových podmienkach**

Metódou „whole mount“ bola uskutočnená imunocytochemická lokalizácia cytoskeletu v epidermálnych bunkách koreňa. Použitá primárna potkania protilátka sa naviazala na  $\alpha$ -tubulín. Na primárnu protilátku bola naviazaná konjugovaná sekundárna protilátka s fluoroforom. Jadrá boli kontrastne sfarbené DAPI.

### **4.2.1 Organizácia mikrotubulov v epidermálnych bunkách koreňov v kontrolných podmienkach**

Vizualizáciou mikrotubulov imunohistochemicky bolo možné sledovať anatomickú organizáciu buniek koreňovej špičky (Obr. 6). V koreni rastlín divokého typu Col-0 sú bunky usporiadané do pravidelných radov (Obr. 6 A). Bunky v meristematickej oblasti mali približne rovnakú veľkosť. K deleniu buniek dochádza v rovine delenia kolmo na smer rastu koreňa. Farbenie DAPI preukázalo, že každá bunka obsahuje iba jedno jadro. Kortikálne mikrotubuly sú paralelne a rovnomerne usporiadané kolmo na pozdĺžnu os koreňa (Obr. 7 A).

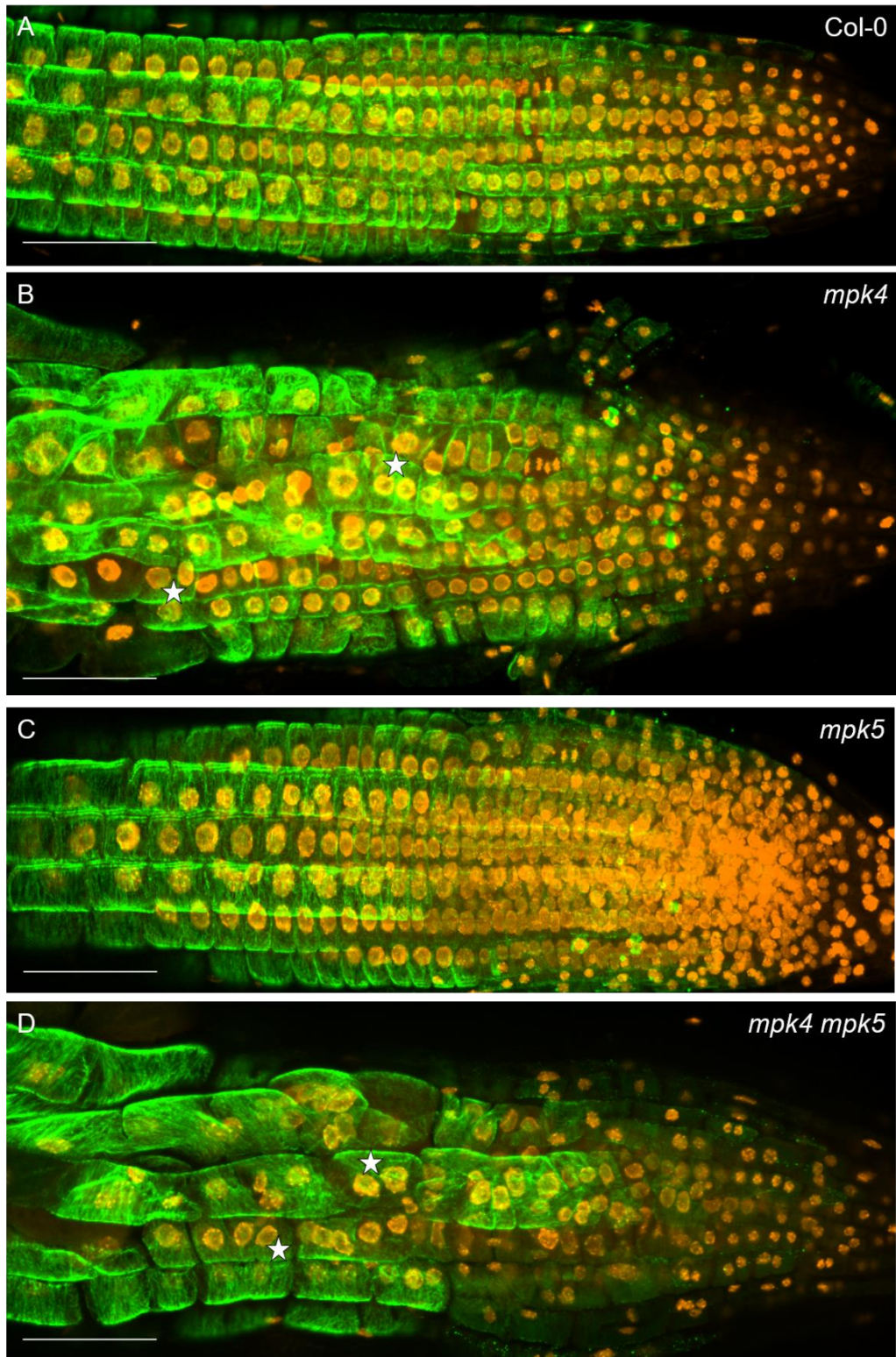
Pozorovanie ukázalo, že koreň *mpk4* je deformovaný (Obr. 6 B). V koreni sa vyskytovali abnormálne veľké bunky, rovnako ako aj nedokončené bunkové prepážky a viacjadrové bunky. Bunky v koreni nie sú usporiadané do pravidelných radov, čo sa prejavuje na celkovej stavbe a štruktúre koreňa. Rovina delenia buniek býva rôzna, často šikmá (Obr. 8 A), čo môže viesť k nerovnomernému rozdeleniu bunky. Dochádza tak k narušeniu prirodzenej organizácie buniek koreňa. V detaile buniek možno pozorovať nedokončené bunkové prepážky charakteristické pre *mpk4*, ktoré umožňujú vznik veľkých mnohojadrových buniek (Obr. 7 B).

Bunky koreňa *mpk5* sú usporiadané do radov podobne ako bolo pozorované u divého typu Col-0. Veľkosť susediacich buniek je porovnateľná (Obr. 6 C). Neboli pozorované



žiadne abnormálne veľké bunky s viacerými jadrami alebo šikmo rozdelené bunky. Organizácia kortikálnych mikrotubulov je porovnateľná s mikrotubulmi v koreňových bunkách divokého typu (Obr. 7 C).

Koreň mutanta *mpk4 mpk5* je deformovaný, možno pozorovať abnormálne veľké členité bunky, ktoré sú nepravidelne usporiadané (Obr. 6 D). V koreni sa nachádzajú bunky s viacerými jadrami a organizácia koreňa je narušená, dochádza k šikmému rozdeleniu buniek (Obr. 8 B a C). Podobne ako u *mpk4* aj v koreňových bunkách *mpk4 mpk5* často dochádza k vytvoreniu neúplných bunkových prepážok, čo je príčinou vzniku mnohjadrových buniek (Obr. 6 D, Obr. 7 D).



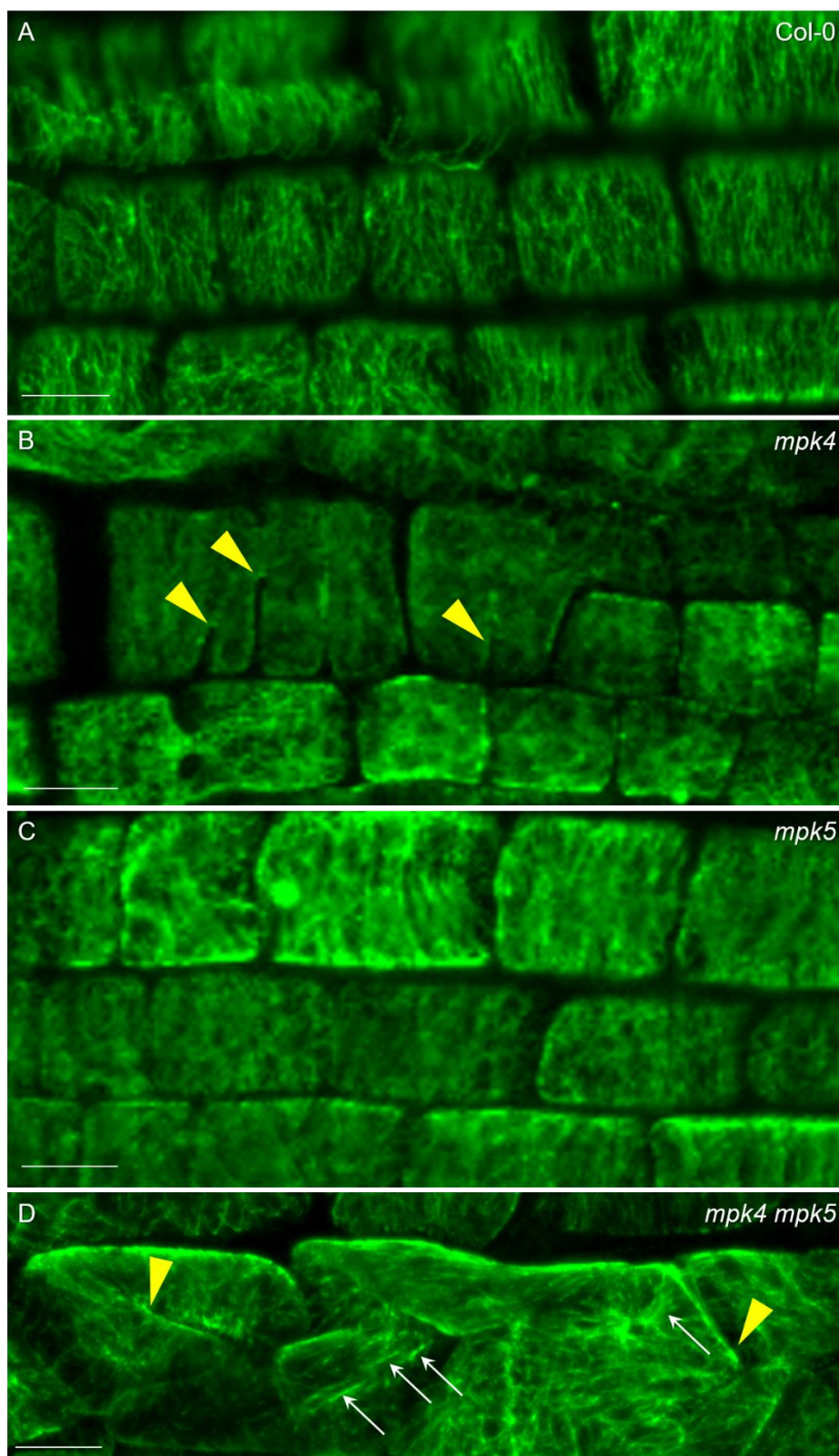
Obr. 6 Imunofluorescenčná lokalizácia mikrotubulov (zelené) a DAPI farbenie (oranžové) v kontrolných podmienkach. Farba DAPI bola upravená v programe ZEN Blue z modrej na oranžovú pre lepšiu názornosť. Mierka 50  $\mu\text{m}$ .

**A** Koreň divokého typu Col-0.

**B** Koreň *mpk4* mutanta. Hviezdičky označujú bunky s dvoma jadrami.

**C** Koreň *mpk5* mutanta.

**D** Koreň *mpk4 mpk5* mutanta. Hviezdičky označujú bunky s viacerými jadrami.



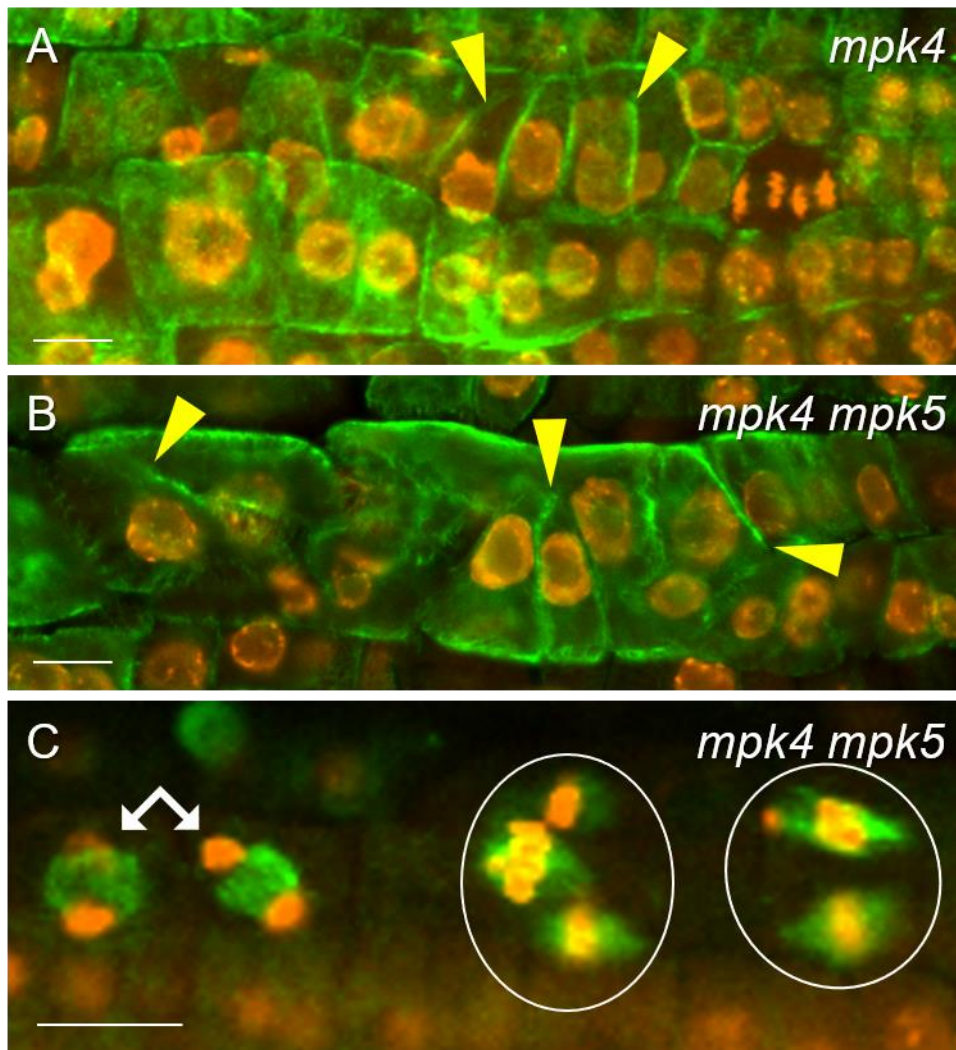
Obr. 7 Imunofluorescenčná lokalizácia mikrotubulov rastlín v kontrolných podmienkach. Mierka 10  $\mu\text{m}$ .

**A** Detail koreňa divokého typu Col-0.

**B** Detail koreňa *mpk4* mutanta. Trojuholníky ukazujú nedokončené bunkové prepážky.

**C** Detail koreňa *mpk5* mutanta.

**D** Detail koreňa *mpk4 mpk5* mutanta. Trojuholníky ukazujú nedokončené bunkové prepážky.



Obr. 8 Cytokinetické defekty v bunkách koreňa u *mpk4* a *mpk4 mpk5* kultivovaných v kontrolných podmienkach.. Mierka 10  $\mu\text{m}$ .

**A** Bunky so šikmou rovinou delenia v *mpk4*. Trojuholníky ukazujú nedokončené bunkové prepážky.

**B** Bunky so šikmou rovinou delenia v *mpk4 mpk5*. Trojuholníky ukazujú nedokončené bunkové prepážky.

**C** Deliace sa bunky v *mpk4 mpk5*. Dvojitá šípka ukazuje skoré fragmoplasty so šikmou orientáciou. Kruhy označujú bunky s viacerými mitotickými vretienkami.

#### **4.2.2 Organizácia mikrotubulov v epidermálnych bunkách koreňov premývaných v ½ MS médiu**

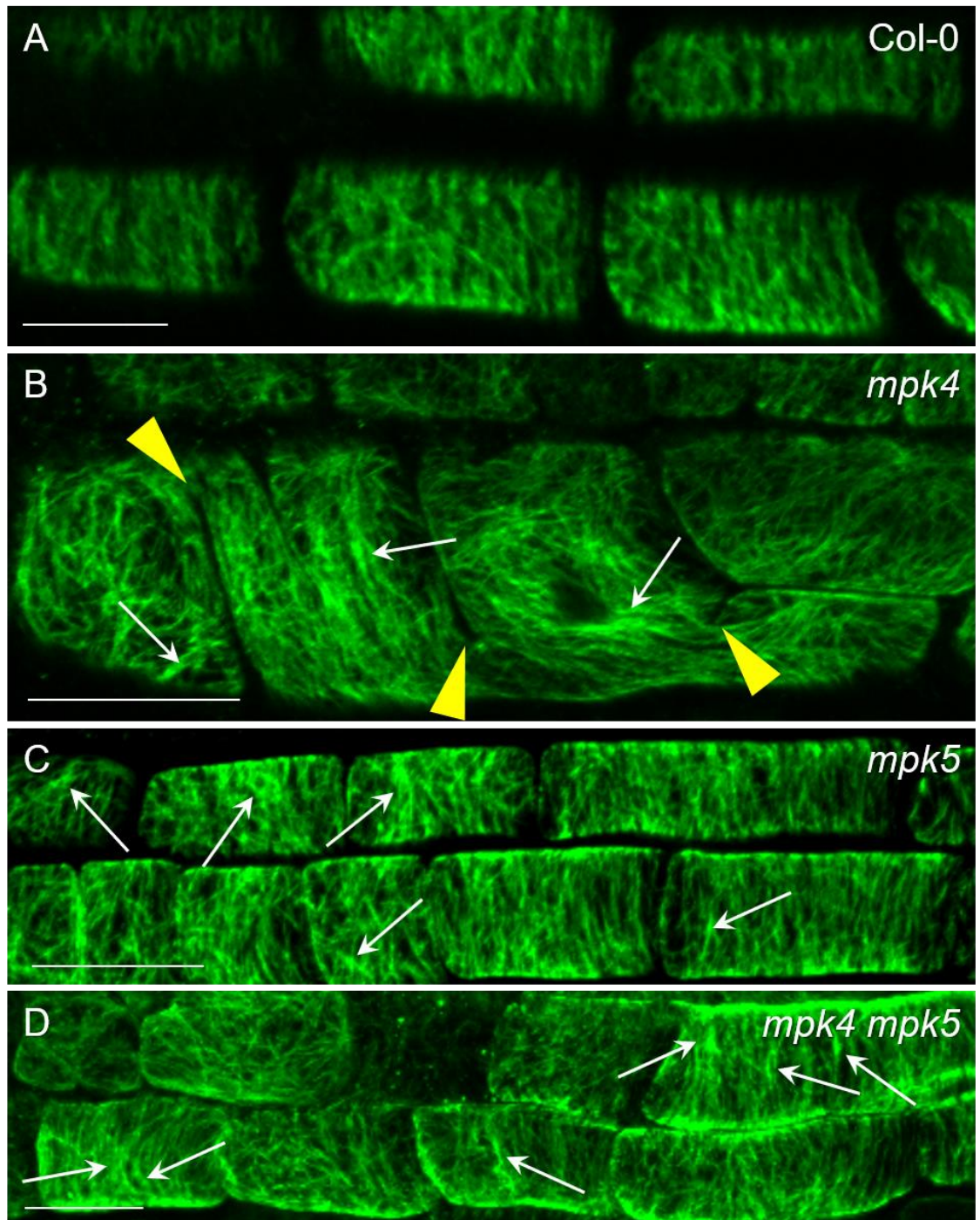
V nasledujúcich experimentoch bola pozornosť zameraná hlavne na organizáciu kortikálnych mikrotubulov epidermálnych buniek koreňa u rastlín vystavených krátkodobému abiotického stresu.

Ako kontrola boli použité rastliny premývané v ½ MS médiu bez prídavku NaCl a KCl. Organizácia kortikálnych mikrotubulov divokého typu Col-0 nevykazovala zmeny v porovnaní s nestresovanými rastlinami (Obr. 9 A).

V epidermálnych bunkách *mpk4* možno pozorovať výraznejšie zväzkovanie kortikálnych mikrotubulov (Obr. 9 B).

U *mpk5* dochádzalo po premývaní rastlín v ½ MS médiu k miernemu zväzkovaniu kortikálnych mikrotubulov v porovnaní s ich organizáciou v nepremývaných koreňoch (Obr. 9 C).

V bunkách *mpk4 mpk5* podobne ako u *mpk4* mutanta pri premývaní s ½ MS médiom dochádzalo k výraznejšiemu zväzkovaniu mikrotubulov v porovnaní s kortikálnymi mikrotubulmi nevystavenými premývaniu (Obr. 9 D).



Obr. 9 Imunofluorescenčná lokalizácia mikrotubulov rastlín premývaných 30 min v  $\frac{1}{2}$  MS médiu. Mierka 10  $\mu\text{m}$  (A) a 20  $\mu\text{m}$  (B,C,D).

**A** Detail koreňa divokého typu Col-0.

**B** Detail koreňa *mpk4* mutanta. Šípky ukazujú zväzované mikrotubuly po premývaní v  $\frac{1}{2}$  MS médiu. Trojuholníky ukazujú nedokončené bunkové prepážky.

**C** Detail koreňa *mpk5* mutanta. Šípky ukazujú zväzované mikrotubuly po premývaní v  $\frac{1}{2}$  MS médiu.

**D** Detail koreňa *mpk4 mpk5* mutanta. Šípky ukazujú zväzované mikrotubuly po premývaní v  $\frac{1}{2}$  MS médiu.

### 4.2.3 Vplyv soľného stresu navodeného 150 mmol·l<sup>-1</sup> NaCl na organizáciu mikrotubulov v epidermálnych bunkách koreňov

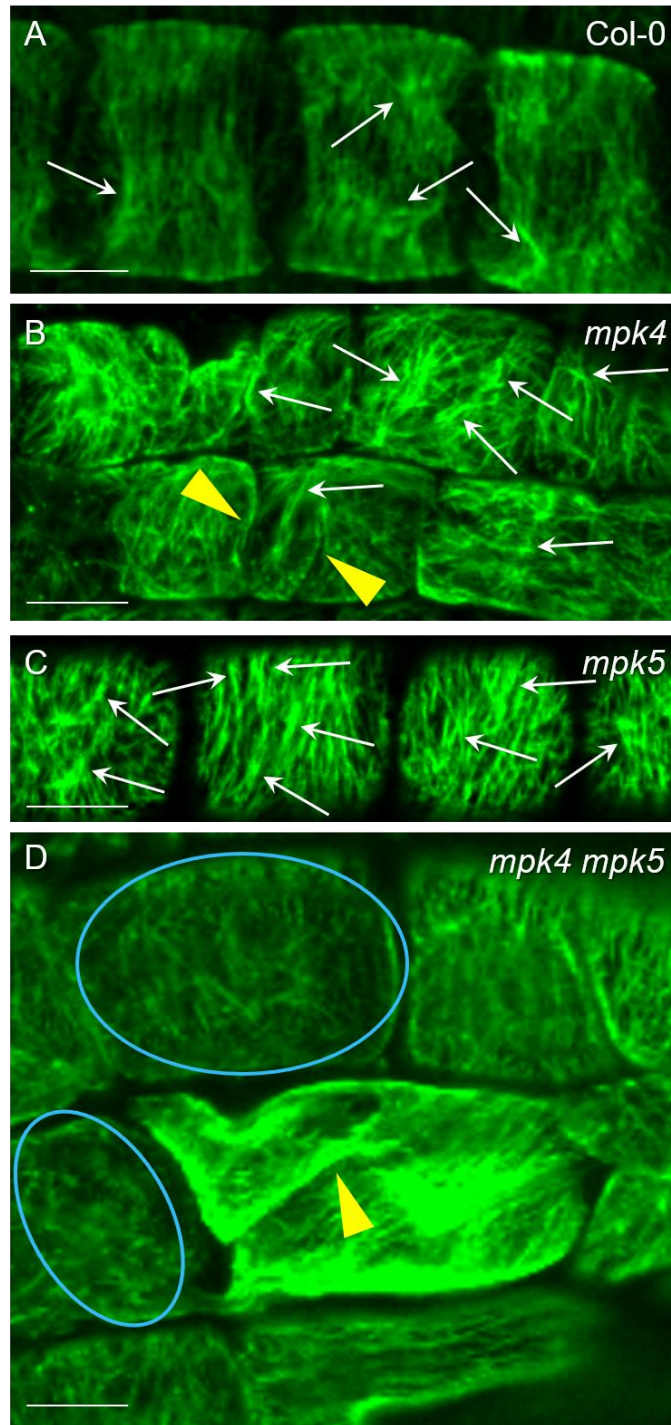
Na štúdium vplyvu soľného stresu boli rastliny vystavené pôsobeniu 150 mmol·l<sup>-1</sup> NaCl po dobu 30 min.

Kortikálne mikrotubuly v koreňových bunkách divokého typu Col-0 sa v podmienkach soľného stresu začínajú zväzkovať (Obr. 10 A).

Bunky *mpk4* reagujú na stres masívnym zväzkovaním a chaotickým usporiadaním mikrotubulov (Obr. 10.B).

Mikrotubuly mutanta *mpk5* sa zväzkujú výraznejšie v soľou indukovanom strese než v bunkách rastlín ošetrovaných iba ½ MS médiom bez prídavku solí (Obr. 10 C). Napriek tomu zostáva paralelné usporiadanie výrazných zväzkov mikrotubulov v bunkách *mpk5* zachované. V kontrolných podmienkach bez premývania bola organizácia mikrotubulov u Col-0 a *mpk5* porovnateľná, no mutant *mpk5* reaguje na stres z NaCl citlivejšie než divoký typ.

Mikrotubuly v bunkách *mpk4 mpk5* sú chaoticky usporiadané a dochádza k čiastočnému rozpadu mikrotubulov (Obr. 10 D).



Obr. 10 Imunofluorescenčná lokalizácia mikrotubulov po ošetrení  $150 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NaCl}$ .

Mierka  $10 \mu\text{m}$ .

**A** Epidermálne bunky koreňa divokého typu Col-0. Šípky ukazujú zväzované mikrotubuly po ošetrení NaCl.

**B** Epidermálne bunky koreňa *mpk4* mutanta. Šípky ukazujú zväzované mikrotubuly po ošetrení NaCl. Trojuholníky ukazujú nedokončené bunkové prepážky.

**C** Epidermálne bunky koreňa *mpk5* mutanta. Šípky ukazujú zväzované mikrotubuly po ošetrení NaCl.

**D** Epidermálne bunky koreňa *mpk4 mpk5* mutanta. Šípky ukazujú zväzované mikrotubuly po ošetrení NaCl. Trojuholníky ukazujú nedokončenú bunkovú prepážku. Modré elipsy zobrazujú rozpadávajúce sa mikrotubuly.



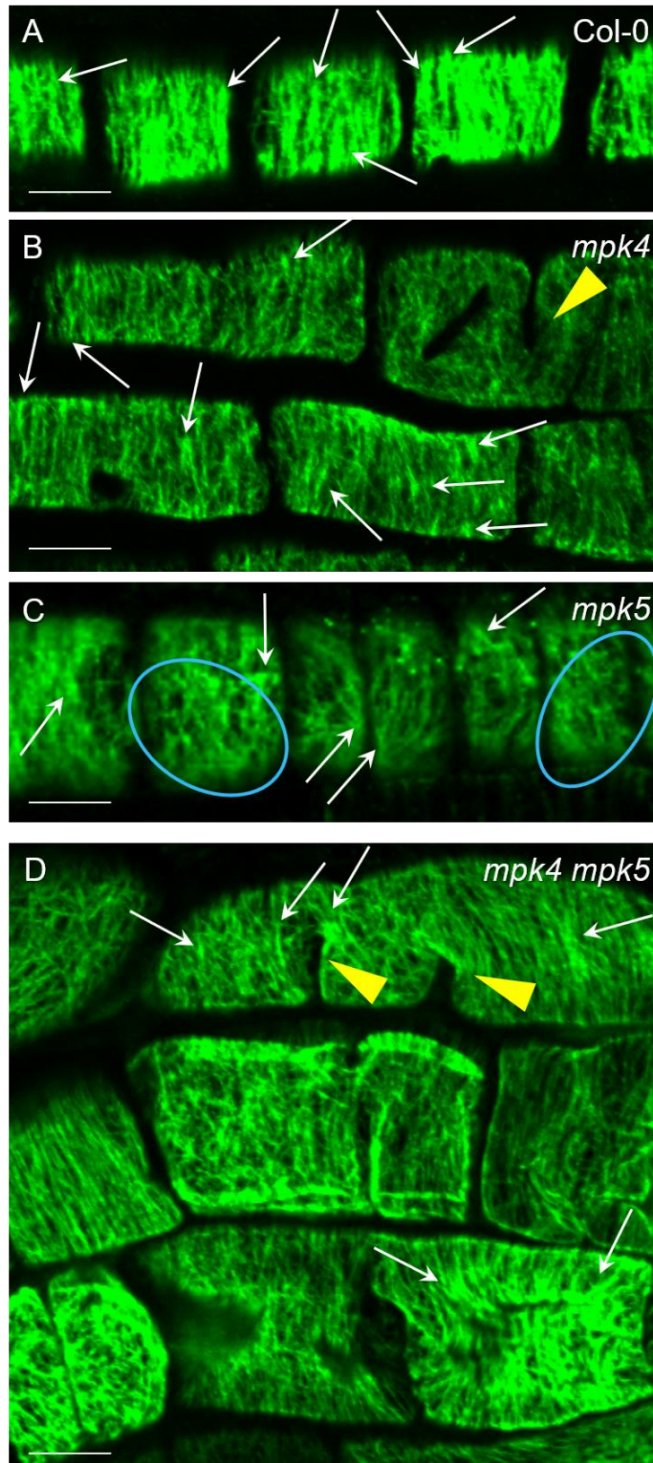
#### **4.2.4 Vplyv soľného stresu navodeného $150 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl na organizáciu mikrotubulov v epidermálnych bunkách koreňov**

V koreňových bunkách divokého typu Col-0 dochádza k veľmi výraznému zväzkovaniu mikrotubulov (Obr. 11 A), rastliny Col-0 reagujú na stres z KCl výrazne citlivejšie než pri ošetrovaní NaCl (Obr. 10 A).

Bunky *mpk4* mutanta po ošetrovaní KCl vykazujú mierne zväzkovanie (Obr. 11 B), sú teda menej citlivé na KCl než na NaCl.

Mutant *mpk5* taktiež reaguje na stres zväzkovaním, v bunkách však možno pozorovať aj rozpad mikrotubulov následkom pôsobenia stresu (Obr. 11 C). Mutant teda na stres z KCl reaguje citlivejšie než na stres z NaCl, keď sice dochádza k tvorbe veľmi hrubých zväzkov, ale mikrotubuly sa nerozpadávajú (Obr. 10 C).

V bunkách *mpk4 mpk5* pri pôsobení KCl dochádza k výraznému zväzkovaniu (Obr. 11 D). V bunkách však nedochádza k rozpadu mikrotubulov ako pri pôsobení NaCl (Obr. 10 A). Mutant *mpk4 mpk5* má na pôsobenie KCl podobnú odpoveď ako jednoduchý mutant *mpk4*.



Obr. 11 Imunofluorescenčná lokalizácia mikrotubulov po ošetrení  $150 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  KCl.

Mierka  $10 \mu\text{m}$  (A, B, C) a  $20 \mu\text{m}$  (D).

**A** Epidermálne bunky koreňa divokého typu Col-0. Šípky ukazujú zväzkané mikrotubuly po ošetrení KCl.

**B** Epidermálne bunky koreňa *mpk4* mutanta. Šípky ukazujú zväzkané mikrotubuly po ošetrení KCl. Trojuholník ukazuje nedokončenú bunkovú prepážku.

**C** Epidermálne bunky koreňa *mpk5* mutanta. Šípky ukazujú zväzkané mikrotubuly po ošetrení KCl. Modré elipsy zobrazujú rozpadávajúce sa mikrotubuly.

**D** Epidermálne bunky koreňa *mpk4 mpk5* mutanta. Šípky ukazujú zväzkané mikrotubuly po ošetrení KCl. Trojuholníky ukazujú nedokončené bunkové prepážky.

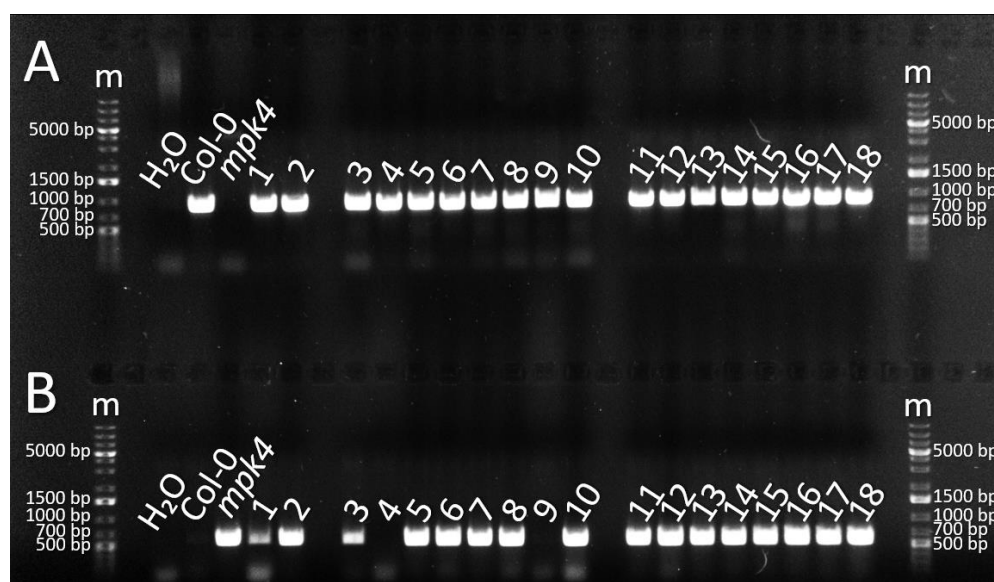
### 4.3 Kríženie vybraného dvojitého mutanta *MPK4* s transgénnyimi líniami nesúcimi molekulárne markery cytoskeletu

#### 4.3.1 Genotypizácia PCR a agarózová elektroforéza

Bolo dôležité si vyselektovať heterozygótne rastliny v *MPK4*, keďže iba z nich možno vypestovať semená homozygótne recesívnych mutantov. Selekcia recesívne homozygótnych *mpk4* a *mpk4 mpk5* bola prevedená vizuálne, avšak bolo potrebné odlišiť rastliny heterozygótne v *MPK4* od rastlín, v ktorých sa nenachádza ani jedna mutaná alela *MPK4*.

Pri genotypizácii boli hľadané produkty PCR s veľkosťou charakteristickou pre konkrétne páry primerov. V prípade, že je použitá sada primerov na nemutantnú alelu bez inzertu v mieste *MPK4*, po PCR reakcii možno obdržať produkty s veľkosťou približne 889 bp. Sada primerov na alelu s inzertom v mieste *MPK4* naamplifikuje produkty s veľkosťou približne 802 bp. Primer MLB1 je navrhnutý špecificky tak, aby bol komplementárny na úsek inzerčnej T-DNA v SALK mutantoch, a teda v kombinácii s *MPK4* Rev primerom vytvoril produkt iba na *mpk4* alele.

Genotypizáciou boli odlišené rastliny bez *mpk4* alely od rastlín heterozygótnych v *MPK4* (Obr. 12), ktoré boli následne použité na kríženie.



Obr. 12 Fotografie gélu genotypizácie *MPK4* po agarózovej elektroforéze rastlín dvojitého mutanta *mpk4mpk5*.

**A** Produkty vytvorené sadou primerov *MPK4* FW a *MPK4* Rev.

**B** Produkty vytvorené kombináciou primerov *MPK4* Rev a MLB1. Písmeno „m“ označuje mierku na určenie molekulárnej veľkosti DNA. Ako negatívna kontrola bola použitá voda. Pozitívnou kontrolou bola *Col-0* a *mpk4*. Genotypizácia preukázala, že vzorky 4 a 9 pochádzajú z rastlín bez mutantnej *mpk4* alely. Zvyšné vzorky v tomto experimente sú z rastlín heterozygótnych v *MPK4*.

Genotypizácia bola použitá aj na overenie, že mutanty *mpk5* a *mpk4 mpk5* sú skutočne recesívne homozygótne v *MPK5*. Primery *MPK5 FW* a *MPK5 Rev* vytvárajú produkt s veľkosťou 464 bp iba v prítomnosti alely bez inzertu v mieste *MPK5*. Primer p745 je taktiež navrhnutý komplementárne na T-DNA inzert a spolu s primerom *MPK5 FW* vytvárajú produkt iba na *mpk5* alele. Genotypizáciou bolo potvrdené, že všetky použité rastliny sú homozygótne recesívne v *MPK5*.

#### **4.3.2 Kríženie *mpk4 mpk5* s transgennými líniami nesúcimi molekulárne markery cytoskeletu**

Kríženie rastlín prebiehalo počas viacerých dní, aby bolo opelených čo najviac kvetov dvojitého mutanta peľom rastlín s markerom aktínového cytoskeletu (*35S::GFP:FABD2*) alebo peľom rastlín s markerom tubulínového cytoskeletu (*35S::TUA6:GFP*). Uzatvorené kvetné púčiky dvojitého mutanta *mpk4 mpk5* boli otvorené a z kvetu boli odstránené peľnice. Na bliznu piestikov mutanta *mpk4 mpk5* bol prenesený peľ z kvetov transgenných línii nesúcich markery cytoskeletu. Kvety jednej rastliny dvojitého mutanta boli vždy opelené peľom iba jednej rastliny s markerom cytoskeletu. Kvetné stonky s umelo opelenými kvetmi boli označené. V súčasnosti sa z umelo opelených kvetov vyvíjajú šesule so semenami F1 generácie. Po ich dozretí a vyklíčení budú z nich vyselektované rastliny exprimujúce cytoskeletálne markery. Z vyklíčených semien F2 generácie budú vyselektované homozygótne rastliny v *MPK4* a *MPK5* exprimujúce markery cytoskeletu. Semená F3 generácie homozygótného *mpk4 mpk5* budú použité na mikroskopické štúdie cytoskeletu.

## 5 DISKUSIA

Práca bola zameraná na zmeny v organizácii cytoskeletu *A. thaliana* v odpovedi na soľný stres navodený NaCl a KCl. Na experimenty boli použité línie ekotypu Columbia divokého typu, jednoduché mutanty *mpk4* a *mpk5* spolu s dvojitým mutantom *mpk4 mpk5*.

Gény *MPK4* a *MPK5* patria do podskupiny MAPK zapojených do regulácie bunkového delenia (Ichimura *et al.*, 2002). V jednoduchom recesívne homozygótnom mutantovi *mpk4* dochádza k cytokinetickým defektom, ktoré sa prejavujú hlavne na fenotype koreňa (Beck *et al.*, 2010; Beck *et al.*, 2011).

Pôsobením soľného stresu dochádzalo v epidermálnych bunkách koreňa *mpk4* k zväzkovaniu mikrotubulov, rovnako ako aj pri premývaní kontrolným ½ MS médiom (Obr. 9 B, 10 B, 11 B). Pre mutantu *mpk4* je charakteristické zväzkovanie mikrotubulov, ktoré vedie k zvýšenej rezistencii voči oryzalínu, ktorý spôsobuje depolymerizáciu mikrotubulov (Beck *et al.*, 2010).

Fenotyp *mpk5* za normálnych kultivačných podmienok nie je na prvý pohľad odlišný od divokého typu Col-0 (Su a Krysan., 2016). Taktiež je porovnateľná organizácia buniek v koreni a štruktúra mikrotubulov, čo bolo potvrdené aj v tejto bakalárskej práci (Obr. 6 A a 6 C, 7 A a 7 C). Pri pôsobení soľného stresu, ale aj pri premývaní kontrolným ½ MS médiom však dochádza v epidermálnych bunkách koreňa *mpk5* mutantu k zväzkovaniu mikrotubulov a pri pôsobení KCl dokonca k ich rozpadu. Divoký typ na premývanie kontrolným ½ MS médiom nereaguje zväzkovaním (Obr. 9 A). Pri pôsobení KCl však dochádza k výraznému zväzkovaniu kortikálnych mikrotubulov Col-0 (Obr. 11 A). Mutant *mpk5* teda reaguje na stres citlivejšie ako divoký typ Col-0.

Bol potvrdený predpoklad, že jednoduché mutanty, ktorých fenotyp je za normálnych podmienok rovnaký ako u rastlín divokého typu, môžu vykazovať odlišný fenotyp pri pôsobení stresu. Priame genetické analýzy rastlín s abnormálnym fenotypom viedli k identifikácii a odhaleniu mnohých génov zodpovedných za špecifické funkcie rastlín (Bolle *et al.*, 2011). Spätná genetická analýza je zameraná na vytvorenie „knock out“ mutantu v presne určenom géne a následnú charakterizáciu jeho defektov.

V rámci spätnej genetickej analýzy mutantov MAPK bol vytvorený dvojitý mutant *mpk4 mpk5*, keďže jednoduchý mutant *mpk5* neprejavoval odlišný fenotyp za normálnych kultivačných podmienok. Fenotypová analýza *mpk4 mpk5* odhalila, že medzi génmi dochádza ku genetickej interakcii (Su a Krysan, 2016).

Experimenty potvrdili charakteristické fenotypy koreňov mutantov *mpk4* a *mpk4 mpk5*, ktoré boli podrobne opísané v publikovaných článkoch (Beck *et al.*, 2010; Beck *et al.*, 2011; Su a Krysan., 2016).

Ióny  $\text{Na}^+$  a  $\text{Cl}^-$  nachádzajúce sa v zasolených pôdach vo vysokých koncentráciách obmedzujú rast rastlín dvoma spôsobmi. Korene majú problém absorbovať vodu a akumulácia iónov v pletivách je pre rastlinu toxická (Munns, 2005). Vysoká koncentrácia solí v pôde spôsobuje problémy v poľnohospodárstve, keďže väčšina poľnohospodárskych plodín sú glykofyty (Isayenkov, 2012). Na experimenty v tejto práci boli použité rastliny *A. thaliana* z dvoch dôvodov: je to významný modelový organizmus dvojklíčnoslistových rastlín a taktiež patrí do skupiny glykofytov.

Výsledky prezentované v tejto práci však naznačujú, že *mpk5* je náchylnejší na ošetrovanie KCl než divoký typ Col-0, *mpk4* jednoduchý mutant a *mpk4 mpk5* dvojité mutant, keďže dochádza k rozpadu mikrotubulov. Mutant *mpk4 mpk5* je však citlivejší na pôsobenie NaCl než ostatné línie použité v tomto experimente.

Taktiež bolo prevedené kríženie rastlín *mpk4 mpk5* s rastlinami exprimujúcimi markery aktínového a mikrotubulárneho cytoskeletu. Ďalšie skúmanie takto vytvorených rastlín môže viesť k odhaleniu odpovedí cytoskeletu na meniace sa podmienky prostredia. Na mikroskopické štúdie zmien organizácie a dynamiky cytoskeletu sa budú môcť použiť semená F3 generácie homozygótného *mpk4 mpk5* v kontrolných podmienkach, ako aj v podmienkach abiotického stresu.

## 6 ZÁVER

Bakalárska práca bola rozdelená na časť teoretickú a experimentálnu. V teoretickej časti tejto práce bola detailne popísaná signalizácia MAPK kaskád v odpovedi na abiotický stres u *A. thaliana*. Predstavená bola problematika kondicionálneho fenotypu a tvorba dvojitéch mutantov. Podrobne popísaný bol rastlinný cytoskelet a s ním asociované proteíny.

V experimentálnej časti bolo najprv charakterizované usporiadanie buniek koreňovej špičky a organizácia kortikálnych mikrotubulov u divokého typu Col-0, jednoduchých mutantov *mpk4* a *mpk5* a dvojitého mutantu *mpk4 mpk5* v kontrolných podmienkach bez premývania s tekutým ½ MS médiom. Ako ďalšia kontrola boli použité rastliny ošetrené tekutým ½ MS médiom na zistenie vplyvu mechanického stresu na organizáciu kortikálnych mikrotubulov. U všetkých mutantných línií v tomto prípade dochádzalo k zväzkovaniu kortikálnych mikrotubulov, čo naznačuje, že mutanti *mpk4*, *mpk5* a *mpk4 mpk5* sú náchylnejší na mechanický stres než rastliny divokého typu Col-0.

Sledoval sa vplyv soľného stresu navodeného premývaním rastlín v  $150 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaCl na organizáciu kortikálnych mikrotubulov. Mutant *mpk4* sa bránil voči soľnému stresu tvorbou veľmi výrazných a hrubých zväzkov mikrotubulov. V bunkách mutantov *mpk5* taktiež dochádzalo k tvorbe veľmi hrubých zväzkov mikrotubulov. Mutant *mpk4 mpk5* reagoval na NaCl rozpadom mikrotubulov. U dvojitého mutantu *mpk4 mpk5* bola pozorovaná vyššia citlivosť na pôsobenie NaCl než u oboch jednoduchých mutantov.

V ďalšej časti bol študovaný vplyv soľného stresu navodeného premývaním rastlín v  $150 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  KCl na organizáciu kortikálnych mikrotubulov. Mikrotubuly rastlín divokého typu Col-0 reagujú na ošetrenie KCl tvorbou veľmi výrazných zväzkov. Mutant *mpk4* tvorí zväzky, avšak v menšej miere než pri pôsobení NaCl. Naopak u mutantu *mpk5* dochádza k rozpadu mikrotubulov. Na pôsobenie KCl je teda citlivejší než na NaCl. Dvojité mutant *mpk4 mpk5* vytvára zväzky, no k rozpadu mikrotubulov nedochádza.

Posledná časť bola venovaná kríženiu dvojitéch mutantov *mpk4 mpk5* s rastlinami s markermi aktínového cytoskeletu (*35S::GFP:FABD2*), a markermi tubulínového cytoskeletu (*35S::TUA6:GFP*), ekotyp Col-0. Rastliny po krížení vytvorili šesule so semenami F1 generácie. Po dozretí z nich budú vyselektované rastliny exprimujúce cytoskeletálne markery. Semená generácie F3 homozygótného *mpk4 mpk5* budú použité na mikroskopické štúdie cytoskeletu.

## 7 LITERATÚRA

- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2008): The Cytoskeleton. In: *Molecular Biology of the Cell*. 5th ed. Garland Science, New York, U.S.A., 965-1052.
- Allwood E. G., Smertenko A. P., Hussey P. J. (2001): Phosphorylation of plant actin-depolymerising factor by calmodulin-like domain protein kinase. *FEBS Letters* **499**, 97-100.
- 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.
- Assaha D. V. M., Ueda A., Saneoka H., Al-Yahyai R., Yaish M. W. (2017): The Role of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> Transporters in Salt Stress Adaptation in Glycophytes. *Frontiers in Physiology* **8**, 509.
- Ayscough K. R. (1998): In vivo functions of actin-binding proteins. *Current Opinion in Cell Biology* **10**, 102-111.
- 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**, 755-771.
- 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 microtubule transitions in Arabidopsis thaliana. *New Phytologist* **189**, 1069-1083.
- Bigeard J., Hirt H. (2018): Nuclear Signaling of Plant MAPKs. *Frontiers in Plant Science* **9**, 469.
- Bolle C., Schneider A., Leister D. (2011): Perspectives on Systematic Analyses of Gene Function in Arabidopsis thaliana: New Tools, Topics and Trends. *Current Genomics* **12**, 1-14.
- Bolle C., Huep G., Kleinbölting N., Haberer G., Mayer K., Leister D., Weisshaar B. (2013): GABI-DUPLO: a collection of double mutants to overcome genetic redundancy in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal* **75**, 157-171.
- Bouché N., Bouchez D. (2001): Arabidopsis gene knockout: phenotypes wanted. *Current Opinion in Plant Biology* **4** (2) 111-117.
- Caillaud M. C., Lecomte P., Jammes F., Quentin M., Pagnotta S., Andrio E., de Almeida Engler J., Marfaing N., Gounon P., Abad P., Favery B. (2008): MAP65-3 microtubule-associated protein is essential for nematode-induced giant cell ontogenesis in Arabidopsis. *The Plant Cell* **20**, 423-437.
- Clough S. J., Bent A. F. (1998): Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal* **16** (6) 735-743.
- Colcombet J., Hirt H. (2008): Arabidopsis MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochemical Journal* **413**, 217-226.
- Cooper G. M., Hausmann R. E. (2007): The Cytoskeleton and cell movement. In: *The Cell: A Molecular Approach*. 4th ed. Sinauer Associates, Massachusetts, U.S.A., 473-528.
- Dóczi R., Brader G., Pettkó-Szandtner A., Rajh I., Djamei A., Pitzschke A., Teige M., Hirt H. (2007): The Arabidopsis mitogen-activated protein kinase kinase MKK3 is upstream of group C mitogen-activated protein kinases and participates in pathogen signaling. *The Plant Cell* **19**, 3266-3279.
- 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.
- 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.
- Gu Y., Deng Z., Paredes A. R., DeBolt S., Wang Z. Y., Somerville C. (2008): Prefoldin 6 is required for normal microtubule dynamics and organization in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105** (46), 18064-18069.
- Hamel L. P., Nicole M. C., Sritubtim S., Morency M.J., Ellis M., Ehlting 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** (4), 192-198.
- Hashimoto T. (2015): Microtubules in plants. *The Arabidopsis Book* **13**, e0179.
- Hong Y., Zhang W., Wang X. (2010): Phospholipase D and phosphatidic acid signalling in plant response to drought and salinity. *Plant, Cell & Environment* **33**, 627-635.
- Huang, Y., Li, H., Gupta, R., Morris, P. C., Luan, S., Kieber, J. J. (2000): ATMPK4, an Arabidopsis homolog of mitogen-activated protein kinase, is activated in vitro by AtMEK1 through threonine phosphorylation. *Plant Physiology* **122**, 1301-1310.
- Hubbart S. R., Till J. H. (2000): Protein tyrosine kinase structure and function. *Annual Reviews* **69**, 373-398.
- Hunter T. (1995): Protein kinases and phosphatases: The Yin and Yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* **80**, 225-236.
- Hussey P. J., Hawkins T. J., Igarashi H., Kaloriti D., Smertenko A. (2002): The plant cytoskeleton: recent advances in the study of the plant microtubule-associated proteins MAP-65, MAP-190 and the *Xenopus* MAP215-like protein, MOR1. *Plant Molecular Biology* **50**, 915-924.
- Hussey P. J., Hashimoto T. (2008): The Cytoskeleton and Signal Transduction: Role and Regulation of Plant Actin- and Microtubule-Binding Proteins. *Annual Plant Reviews* **33**, 244-272.
- Hyman A. A., Salser S., Drechsel D. N., Unwin N., Mitchison T. J. (1992): Role of GTP hydrolysis in microtubule dynamics: information from a slowly hydrolyzable analogue, GMPCPP. *Molecular Biology of the Cell* **3**, 1155-1167.
- 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.
- Isayenkov (2012): Physiological and molecular aspects of salt stress in plants. *Cytology and Genetics* **46** (5), 50-71.
- 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.
- Jammes F., Song C., Shin D., Munemasa S., Takeda K., Gu D., Cho D., Lee S., Giordo R., Sritubtim S., Leonhardt N., Ellis B. E., Murata Y., Kwak J. M. (2009): MAP kinases MPK9 and MPK12 are preferentially expressed in guard cells and positively regulate ROS-mediated ABA signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106** (48), 20520-20525.
- Jouannic S., Hamal A., Leprince A.S., Tregear J.W., Kreis M., Henry Y. (1999): Plant MAP kinase kinase kinases structure, classification and evolution. *Gene* **233** 1-11.
- Kamal A., Goldstein L. S. (2000): Connecting vesicle transport to the cytoskeleton. *Current Opinion in Cell Biology* **12**, 503-508.
- Kiegerl S., Cardinale F., Siligan Ch., Gross A., Baudouin E., Liwosz A., Eklöf S., Till S., Bögre L., Hirt H., Meskiene I. (2000): SIMKK, a Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Kinase, Is a Specific Activator of the Salt Stress-Induced MAPK, SIMK. *The Plant Cell* **12**, 2247-2258.
- 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.
- Khoury G. A., Baliban R. C., Floudas Ch. A. (2011): Proteome-wide post-translational modification statistics: frequency analysis and curation of the swiss-prot database. *Scientific reports* **1**: 90 <https://www.nature.com/articles/srep00090>.
- Knight H., Knight M. R. (2001): Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends in Plant Science* **6** (6), 262-267.
- Komis G., Luptovciak I., Doscocilova A., Šamaj J. (2015): Biotechnological aspects of cytoskeletal regulation in plants. *Biotechnology advances* **33**, 1043-1062.
- Komis G., Šamajová O., Ovečka M., Šamaj J. (2018): Cell and Developmental Biology of Plant Mitogen-Activated Protein Kinases. *Annual Review of Plant Biology* **69**, 237-265.

- Koornneef M., Meinke D. (2010): The development of Arabidopsis as a model plant. *The Plant Journal* **61**, 909-21.
- Kopczak S. D., Haas N. A., Hussey P. J., Silflow C. D., Snustad D. P. (1992): The small genome of Arabidopsis contains at least six expressed alpha-tubulin genes. *The Plant Cell* **4**, 539-547.
- 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**, 3378-3790.
- Krishnan K., Moens P. D. J. (2009): Structure and functions of profilins. *Biophysical Reviews* **1**, 71-81.
- Křenek P., Smékalová V. (2014): Quantification of stress-induced mitogen-activated protein kinase expressional dynamic using reverse transcription quantitative real-time PCR. In: *Plant MAP Kinases*. (Komis G., Šamaj J., eds.), Springer, New York, U.S.A., 13-25.
- Lee J. S., Ellis B. E. (2007): Arabidopsis MAPK phosphatase 2 (MKP2) positively regulates oxidative stress tolerance and inactivates the MPK3 and MPK6 MAPKs. *The Journal of Biological Chemistry* **282** (34), 25020-25029.
- Lee S. H., Dominguez R. (2010): Regulation of Actin Cytoskeleton Dynamics in Cells. *Molecules and Cells*. **29** (7), 311-325.
- Li S., Sun T., Ren H. (2015): The functions of the cytoskeleton and associated proteins during mitosis and cytokinesis in plant cells. *Frontiers in Plant Science* **6**, 282.
- Liu B., Joshi H. C., Wilson T. J., Silflow C. D., Palevitz B. A., Snustad D. P. (1994): gamma-Tubulin in Arabidopsis: gene sequence, immunoblot, and immunofluorescence studies. *The Plant Cell* **6**, 303-314.
- Lucas J. R., Nadeau J. A., Sack F. D. (2006): Microtubule arrays and Arabidopsis stomatal development. *Journal of Experimental Biology* **51** (1), 71-79.
- Lucas J. R., Shaw S. L. (2012): MAP65-1 and MAP65-2 promote cell proliferation and axial growth in Arabidopsis roots. *The Plant Journal* **71** (3), 454-463.
- 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.
- Maciver S. K., Hussey P. J. (2002): The ADF/cofilin family: actin-remodeling proteins. *Genome Biology* **3** (5), 1-12.
- Magiera M. M., Janke C. (2014): Post-translational modifications of tubulin. *Current Biology* **24** (9), R351-R354.
- 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.
- Matsuoka D., Nanmori T., Sato K., Fukami Y., Kikkawa U., Yasuda T. (2002): Activation of AtMEK1, an Arabidopsis mitogen-activated protein kinase kinase, in vitro and in vivo: Analysis of active mutants expressed in E. coli and generation of the active form in stress response in seedlings. *The Plant Journal* **29** (5), 637-647.
- McKinney E. C., Kandasamy M. K., Meagher R. B. (2002): Arabidopsis contains ancient classes of differentially expressed actin-related protein genes. *Plant Physiology* **128**, 997-1007.
- McKinney E. C., Meagher R. B. (1998): Members of the Arabidopsis actin gene family are widely dispersed in the genome. *Genetics* **149**, 663-675.
- McDowell J. M., Huang S., McKinney E. C., An Y. Q., Meagher R. B. (1996): Structure and evolution of the actin gene family in Arabidopsis thaliana. *Genetics* **142**, 587-602.
- Menges M., Dóczy R., Okrészl L., Morandini P., Mizzi L., Soloviev M., Murray J. A., Bögre L. (2008): Comprehensive gene expression atlas for the Arabidopsis MAP kinase signalling pathways. *New Phytologist* **179**, 643-662.
- Miles G. P., Samuel M. A., Ellis B. E. (2009): Suppression of MKK5 reduces ozone-induced signal transmission to both MPK3 and MPK6 and confers increased ozone sensitivity in Arabidopsis thaliana. *Plant Signaling & Behavior* **4** (8), 687-692.
- Mittler R., Vanderauwera S., Suzuki N., Miller G., Tognetti V. B., Vandepoele K., Gollery M., Shulaev V., Van Breusegem F. (2011): ROS signaling: the new wave? *Trends in Plant Science* **16** (6), 300-309.

- Mizoguchi T., Gotoh Y., Nishida E., Yamaguchi-Shinozaki K., Hayashida N., Iwasaki T., Kamada H., Shinozaki K. (1994): Characterization of two cDNAs that encode MAP kinase homologues in *Arabidopsis thaliana* and analysis of the possible role of auxin in activating such kinase activities in cultured cells. *The Plant Journal* **5**, 111-122.
- Mizoguchi T., Ichimura K., Irie K., Morris P., Giraudat J., Matsumoto K., Shinozaki K. (1998): Identification of a possible MAP kinase cascade in *Arabidopsis thaliana* based on pairwise yeast two-hybrid analysis and functional complementation tests of yeast mutants. *FEBS Letters* **437** (1-2), 56-60.
- Munns R. (2005): Genes and salt tolerance: bringing them together. *The New Phytologist* **167**, 645-663.
- Munns R., Tester M. (2008): Mechanisms of salinity tolerance. *Annual review of Plant Biology* **59**, 651-681.
- Müller B., Grossniklaus U. (2010): Model organisms – A historical perspective. *Journal of Proteomics* **73**, 2054-2063.
- Müller S., Smertenko A., Wagner V., Heinrich M., Hussey P. J., Hauser M. T. (2004): The plant microtubule-associated protein AtMAP65-3/PLE is essential for cytokinetic phragmoplast function. *Current Biology* **14** (5), 412-417.
- Nishihama R., Machida Y. (2001): Expansion of the phragmoplast during plant cytokinesis: a MAPK pathway may MAP it out. *Current Opinion in Plant Biology* **4**, 507-512.
- Nogales E., Whittaker M., Milligan R. A., Downing K. H. (1999): High-resolution model of the microtubule. *Cell* **96**, 79-88.
- O'Malley R. C., Barragan C. C., Ecker J. R. (2015): A user's guide to the *Arabidopsis* T-DNA insertion mutant collections. *Methods in Molecular Biology* **1284**, 323-342.
- Otegui M. S., Staehelin L. A. (2000): Cytokinesis in flowering plants: more than one way to divide a cell. *Current Opinion in Plant Biology* **3**, 493-502.
- Otegui M. S., Verbrugghe K. J., Skop A. R. (2005): Midbodies and phragmoplasts: analogous structures involved in cytokinesis. *Trends in Cell Biology* **15** (8), 404-413.
- Quentin M., Baurès I., Hoefle C., Caillaud M. C., Allasia V., Panabières F., Abad P., Hüchelhoven R., Keller H., Favery B. (2016): The *Arabidopsis* microtubule-associated protein MAP65-3 supports infection by filamentous biotrophic pathogens by down-regulating salicylic acid-dependent defenses. *Journal of Experimental Botany* **67** (6), 1731-1743.
- Petersen M., Brodersen P., Naested H., Andreasson E., Lindhart U., Johansen B., Nielsen H. B., Lacy M., Austin M. J., Parker J. E., Sharma S. B., Klessig D. F., Martienssen R., Mattsson O., Jensen A. B., Mundy J. (2000): *Arabidopsis* map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* **103**, 1111-1120.
- Phillips P. C. (2008): Epistasis – the essential role of gene interactions in the structure and evolution of genetic systems. *Nature Reviews Genetics* **9** (11), 855-867.
- 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.
- Rodionov V. I., Borisy G. G. (1997): Microtubule treadmill in vivo. *Science*. **275**, 215-218.
- 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* **6** (5), 743-747.
- Sasabe M., Machida Y. (2012): Regulation of organization and function of microtubules by the mitogen-activated protein kinase cascade during plant cytokinesis. *Cytoskeleton* **69**, 913-918.
- Smertenko A. P., Assaad F., Baluška F., Bezanilla M., Buschmann H., Drakakaki G., Hauser MT., Janson M., Mineyuki Y., Moore I., Müller S., Murata T., Otegui M. S., Panteris E., Rasmussen C., Schmit A. C., Šamaj J., Samuels L., Staehelin L. A., Van Damme D., Wasteneys G., Žárský V. (2017): Plant Cytokinesis: Terminology for Structures and Processes. *Trends in Cell Biology* **27** (12), 885-894.
- Smertenko A. P., Chang H. Y., Wagner V., Kaloriti D., Fenyk S., Sonobe S., Lloyd C., Hauser M. T., Hussey P. J. (2004): The *Arabidopsis* microtubule-associated protein AtMAP65-1: molecular analysis of its microtubule bundling activity. *The Plant Cell* **16**, 2035-2047.

- Smertenko A. P., Kaloriti D., Chang H., Fiserova J. Opatrny Z., Hussey P. J. (2008): The C-terminal variable region specifies the dynamic properties of Arabidopsis microtubule-associated protein MAP65 isoforms. *The Plant Cell* **20**, 3346-3358.
- Smékalová V., Doskočilová A., Komis G., Šamaj J. (2014): Crosstalk between secondary messengers, hormones and MAPK modules during abiotic stress signalling in plants. *Biotechnology Advances* **32**, 2-11.
- Snustad D.P., Haas N. A., Kopczak S. D., Silflow C. D. (1992): The small genome of Arabidopsis contains at least nine expressed beta-tubulin genes. *The Plant Cell* **4**, 549-556.
- Staiger C.J. (2000): Signaling to the actin cytoskeleton in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **51**, 257-288.
- Steggerda S. M., Paschal B. M. (2002): Regulation of nuclear import and export by the GTPase ran. *International Review of Cytology* **217**, 41-91.
- Su S., Kryan P. J. (2016): A double-mutant collection targeting MAP kinase related genes in Arabidopsis for studying genetic interactions. *The Plant Journal* **88** (5), 867-878.
- Suarez-Rodriguez M.C., Petersen M., Mundy J. (2010): Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* **61**, 621-649.
- Šamaj J., Baluška F., Hirt H. (2004): From signal to cell polarity: mitogen-activated protein kinases as sensors and effectors of cytoskeleton dynamicity. *Journal of Experimental Botany* **55** (395), 189-98.
- Šamajová O., Komis G., Šamaj J. (2013a): Emerging topics in the cell biology of mitogen-activated protein kinases. *Trends In Plant Science* **18** (3), 140-148.
- Šamajová O., Plíhal O., Al-Yousif M., Hirt H., Šamaj J. (2013b): Improvement of stress tolerance in plants by genetic manipulation of mitogen-activated protein kinases. *Biotechnology Advances* **31**, 118-128.
- Šamajová O., Komis G., Šamaj J. (2014): Immunofluorescent localization of MAPKs and colocalization with microtubules in Arabidopsis seedling whole-mount probes. In: Plant MAP Kinases. (Komis G., Šamaj J., eds.), Springer, New York, U.S.A., 107-115.
- Šlajcherová K., Fišerová J., Fischer L., Schwarzerová K. (2012): Multiple actin isoforms in plants: diverse genes for diverse roles? *Frontiers in Plant Science* **3**, 226.
- 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.
- 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.
- Tilney L. G., Bryan J., Bush D. J., Fujiwara K., Mooseker M. S., Murphy D. B., Snyder D.H. (1973): Microtubules: evidence for 13 protofilaments. *The Journal of Cell Biology* **59**, 267-275.
- Vaškebová L., Šamaj J., Ovečka M. (2017): Single-point ACT2 gene mutation in the Arabidopsis root hair mutant der1-3 affects overall actin organization, root growth and plant development. *Annals of Botany* **00**, 1-13.
- Verma D. P. (2001): Cytokinesis and building of the cell plate in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**, 751-784.
- Wade R.H. (2009): On and around microtubules: an overview. *Molecular Biotechnology* **43**, 177-191.
- Wang Y. H. (2008): How effective is T-DNA insertional mutagenesis in Arabidopsis? *Journal of Biochemical Technology* **1**, 11-20.
- Weigel D. Glazerbrook J. (2002): *Arabidopsis: A Laboratory Manual* 1st ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, 448.
- Widmann Ch., Gibson S., Jarpe M.B., Johnson G.L. (1999): Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiological Reviews* **79**, 143-179.
- Winder S. J., Ayscough K. R. (2005): Actin-binding proteins. *Journal of Cell Science* **118**, 651-654.
- Xu J., Zhang S. (2015): Mitogen-activated protein kinase cascades in signaling plant growth and development *Trends in Plant Science* **20**, 56-64.

- Zhang S., Klessig D. F. (2001): MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends in Plant Science* **6** (11), 520-527.
- Zhu J. K. (2016): Abiotic stress signaling and responses in plants. *Cell* **167**, 313-324.

## 8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ABA	kyselina abscisová (abscisic acid)
BSA	hovädzí sérový albumín
Col-0	ekotyp Columbia
CP	čiapočkový proteín (capping protein)
DAPI	4, 6-diamín-2-fenylindol
DMSO	dimethylsulfoxid
EDTA	ethyléndiamíntetraoctová kyselina
EGTA	ethylénglykol-bis-(2-aminoetyléter)-N,N,N',N'-tetraoctová kyselina
F-aktín	filamentový aktín
G-aktín	globulárny aktín
GFP	zelený fluorescenčný proteín (green fluorescent protein)
GUS	$\beta$ -glukuronidázový reportérový gén
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peroxid vodíka
K <sup>+</sup>	draslíkový ión
KCl	chlorid draselný
MAP	proteín asociujúci s mikrotubulmi
MAPK	mitogénom aktivovaná proteín kináza
MAPKK	mitogénom aktivovaná proteín kináza kináza
MAPKKK	mitogénom aktivovaná proteín kináza kináza kináza
MPK4	mitogénom aktivovaná proteín kináza 4
MS médium	Murashige and Skoog médium
MTOC	mikrotubuly-organizujúce centrum
MTSB	pufor stabilizujúci mikrotubuly
Na <sup>+</sup>	sodíkový ión
NaCl	chlorid sodný
Obr.	obrázok
P	fosfát
PA	kyselina fosfatidová
PBB	preprofázny zväzok
PBS	fosfátom tlmenný soľný roztok
PCR	polymerázová reťazová reakcia (polymerase chain reaction)
PIPES	piperazín-N,N'-bis-(etánsulfonová kyselina)
PLD $\alpha$ 1	phospholipáza D alfa 1
ROS	reaktívne formy kyslíka
RPM	otáčky za minútu (revolutions per minute)
RT	izbová teplota (room temperature)
SALK	inštitút biologických štúdií Salk Institute for Biological Studies
Tab.	tabuľka
TDY	podskupina MAPK s motívom treonín kyselina asparágová tyrozín
TEY	podskupina MAPK s motívom treonín kyselina glutámová tyrozín
TRIS	tris(hydroxymetyl)aminometán