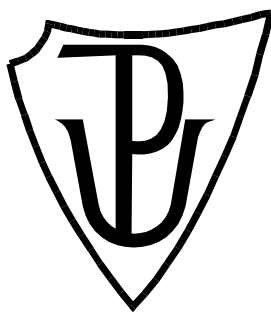


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Fenotypová a biochemická analýza *mpk3-1* mutanta
huseníčku rolního v různých podmínkách osvětlení
kořenů**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Nikola Nogolová
Studijní program:	B1406 / Biochemie
Studijní obor:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Ing. Tomáš Takáč, Ph.D.
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 10.5.2018

Nikola Nogolová

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu mé práce, Ing. Tomášovi Takáčovi Ph.D., za odborné vedení, vstřícný přístup, trpělivost, čas a ochotu při zpracování této bakalářské práce. Velký dík patří také mé rodině za pomoc a podporu.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Nikola Noglová
Název práce	Fenotypová a biochemická analýza <i>mpk3-1</i> mutanta huseníčku rolního v různých podmínkách osvětlení kořenů
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, Oddělení buněčné biologie
Vedoucí práce	Ing. Tomáš Takáč, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2018

Abstrakt

Mitogen aktivované protein kinázy (MAPK), jsou proteiny, sloužící k přenosu signálu z vnějšího prostředí. MPK3 je součástí MAPK kaskády, která je indukována v odpovědi na biotický i abiotický stres. V současnosti se věnuje pozornost studiu vnímání světla kořeny. Zjišťovali jsme, jestli může mít MPK3 roli v této signalizaci. Využili jsme fenotypové analýzy kořene Col-0 a *mpk3-1* huseníčku rolního ve dvou podmínkách osvětlení. Poněvadž má MPK3 důležitou roli v signalizaci během oxidativního stresu, zjišťovali jsme, jestli tyto podmínky osvětlení ovlivní antioxidantní obranu.

Pozorovali jsme fenotypové rozdíly kořenů huseníčku. *mpk3-1* mají kratší primární kořeny než Col-0 v obou kultivačních podmínkách. Zastínění kořenů má vliv na prodloužení primárního kořene. Inhibice růstu vyvolaná osvětlením kořenů byla větší u Col-0 než *mpk3-1*. Také jsme vyhodnocovali počet postranních kořenů - *mpk3-1* mají méně postranních kořenů než Col-0.

Celková aktivita superoxiddisutasy SOD je závislá na světelných podmínkách. SOD má v huseníčku s osvětlenými kořeny vyšší aktivitu. *mpk3-1* vykazuje vyšší aktivitu SOD než Col-0, při kultivaci se zastíněnými kořeny. Rozdíly v aktivitě katalázy mezi Col-0 a *mpk3-1*, a také v různých kultivačních podmínkách byly zanedbatelné.

Osvětlení kořenů má vliv na fenotyp i aktivitu SOD. *MPK3* přispívá k odpovědi rostlin na osvětlení kořenů.

Klíčová slova	MPK3, osvětlení kořenů, fenotyp kořene, kataláza, superoxiddismutasa, huseníček rolní, fotoreceptory, fototropin
Počet stran	74
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Nikola Nogolová
Title	Phenotypic and biochemical analysis of <i>Arabidopsis thaliana mpk3-1</i> in different regimes of root illumination
Type of thesis	Bachelor
Department	Centre of the region Hana for biotechnological and agricultural research, Department of Cell biology
Supervisor	Ing. Tomáš Takáč, Ph.D.
The year of presentation	2018

Abstract

Mitogen activated protein kinases (MAPK) are proteins which transduce signal generated in the outside environment. MPK3 is part of the MAPK cascade which is induced in response to the biotic and abiotic stresses. This bachelor thesis focuses on perception of light by *Arabidopsis* roots. We aimed to investigate, whether *MPK3* can play a role in this signalisation. We performed a root phenotypic analysis of *Arabidopsis thaliana* wild type (Col-0) as well as *mpk3-1* TDNA mutants which were either fully illuminated or cultivated with shadowed roots. Since MPK3 plays an important role in signalisation during oxidative stress, we attempted to examine the effects of MPK3 deficiency on antioxidant defense in the two differentcultivation systems.

We have observed phenotypical differences in roots. *mpk3-1* mutant has shorter primary roots compared to Col-0 in both cultivation conditions. Shadowed roots showed longer primary roots compared to illuminated roots in both lines. Inhibition of the primary roots growth caused by illumination was larger in Col-0 compared to *mpk3-1*. We have also analysed the number of lateral roots – *mpk3-1* have less lateral roots compared to Col-0. Overall activity of the superoxide dismutase (SOD) is dependent on root illumination conditions. SOD has higher activity plants with illuminated roots. Interestingly, this root illumination-induced SOD activation is MPK3-dependent. On the other hand, we

observed only minor differences in catalase activity between Col-0 and mpk3-1. Root illumination did not modified its activity as well.

In conclusion, root illumination has an affect on root phenotype and activity of SOD. MPK3 has a regulatory role in light perception by *Arabidopsis* roots.

Keywords	MPK3, illumination conditions, root phenotype, catalase, superoxide dismutase, <i>Arabidopsis thaliana</i> , photoreceptors, phototropin
Number of pages	74
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1	ÚVOD.....	11
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY.....	12
2.1	Vliv světla na růst kořenů a vnímání světla kořeny rostlin.....	12
2.1.1	Vliv světla na kořeny rostlin.....	12
2.1.2	Molekulární mechanismy vnímání světla kořeny.....	13
2.1.2.1	Fytochromy.....	14
2.1.2.2	Krytochromy.....	15
2.1.2.3	Fototropiny.....	15
2.1.2.4	Důležité regulační bílkoviny.....	16
2.2	Mitogenem aktivované protein kinázy u rostlin.....	18
2.2.1	MAPK signalizace a její aktivace během stresové odpovědi rostlin ...	18
2.2.2	MAPK a oxidační stres.....	20
2.2.3	MPK3.....	21
2.3	Oxidační stres a reaktivní kyslíkové radikály.....	23
2.3.1	Vznik reaktivních kyslíkových radikálů.....	23
2.3.2	Tvorba reaktivních kyslíkových radikálů během abiotického stresu...	25
2.3.3	Tvorba reaktivních kyslíkových radikálů během biotického stresu.....	25
2.3.4	Mechanismy regulace hladiny RKR.....	26
2.3.4.1	Enzymatické odbourávání RKR u rostlin.....	26
2.3.4.2	Nenzymatické odbourávání RKR u rostlin.....	31
3	Materiál a metody.....	33
3.1	Materiál.....	33
3.1.1	Biologický materiál.....	33
3.1.2	Chemikálie.....	33
3.1.3	Přístroje.....	34
3.2	Metody.....	35

3.2.1	Příprava rostlinného materiálu	35
3.2.2	Extrakce proteinů pro nativní elektroforézu	37
3.2.3	Měření obsahu bílkovin.....	37
3.2.4	Nativní polyakrylamidová elektroforéza.....	37
3.2.4.1	Specifické barvení aktivity katalázy na nativních polyakrylamidových gelech	38
3.2.4.2	Specifické barvení aktivity aktivity superoxiddismutasy	39
3.2.5	Kontrola množství proteinů nanesených na gel	39
4	Výsledky	41
4.1	Fenotypová analýza mutanta huseníčku <i>mpk3-1</i> v různých podmínkách osvětlení kořenů	41
4.1.1	Délka primárního kořene.....	41
4.1.2	Délka postranních kořenů	43
4.2	Vliv různých kultivačních podmínek na aktivitu superoxiddismutasy a katalázy u Col-0 a mutanta <i>mpk3-1</i>	45
4.2.1	Superoxiddismutasa	45
4.2.2	Kataláza.....	46
4.3	Predikce fosforylace Phot1 a Phot2.....	47
5	Diskuze	51
6	Závěr	54
7	Citace	55
8	Seznam použitých zkratk	71

CÍLE PRÁCE

Teoretická část

- Mitogenem aktivované protein (MAP) kinázy a oxidační stres s důrazem na MPK3
- Antioxidační obrana u rostlin a její regulace pomocí MAP kináz
- Fenotypové a molekulární aspekty vlivu světla na růst kořenů

Experimentální část

- získat praktické zkušenosti v práci s rostlinami a v biochemických metodách (enzymatická aktivita a imunoblotování)
- vliv různých systémů kultivace rostlin na fenotyp mutantu huseníčku mpk3-1
- zjistit změny v aktivitě vybraných antioxidačních enzymů v mutantovi mpk3-1 v závislosti na přístupu světla

1 ÚVOD

V dnešní době, kdy dochází k významným změnám klimatu, je důležité chápat principy tolerance biotických i abiotických stresů rostlin. To je základním předpokladem pro zajištění stálého, nebo i vyššího výnosu kulturně významných plodin (Pitzschke *et al.*, 2009). Z tohoto důvodu, je stále častěji věnována pozornost mitogen aktivovaným protein kinázám (MAPK), které hrají hlavní roli v brzké odpovědi na změnu vnějších podmínek a podmiňují odolnost vůči stresovým faktorům.

Většinu těchto stresů spojuje skupina molekul, označovaná jako reaktivní kyslíkové radikály (RKR). Tyto radikály jsou v buňkách akumulovány při vystavení rostlin stresu, kde způsobují degradaci lipidů, bílkovin a nukleových kyselin, což v extrémních případech vede až k buněčné smrti. Jejich funkce nespočívá jen v poškození buněk, ale mají význam i v signalizaci. RKR jsou regulovány a odstraňovány v buňkách antioxidantními enzymy, jejichž aktivita podléhá regulaci MAPK.

Kořeny byly dlouho považovány za orgány necitlivé ke světlu. Zjistilo se, že reagují velmi citlivě na světlo a v současnosti se zvýšená pozornost věnuje výzkumu vnímání světla kořeny rostlin. Bylo zjištěno, že světlo výrazně ovlivňuje fyziologické a biochemické procesy v kořenech rostlin, jako je například i tvorba RKR (Yokawa *et al.*, 2011). Ve většině laboratoří, které pracují s rostlinným materiálem, jsou rostliny běžně kultivovány v takových podmínkách, kdy jsou kořeny osvětlovány stejně intenzivním světlem, jako zbytek rostliny.

Jedním z cílů této bakalářské práce bylo zjistit, jestli MAPK signalizace pomocí MPK3 ovlivňuje odpověď kořene na různé světelné podmínky. Také jsme chtěli odhalit, jestli se změní regulace antioxidantních enzymů.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Vliv světla na růst kořenů a vnímání světla kořeny rostlin

Díky světlu rostliny fotosyntetizují, světelné záření také ovlivňuje vývojové procesy jako například klíčení semen i kvetení. Rostliny, jakožto sesilní organismy, mají unikátní mechanismy vnímání změn světelných podmínek. Odpověď rostlin na světlo závisí na intenzitě a také na kvalitě světla (Gelderen *et al.*, 2018). Svůj růst i vývoj rostliny přizpůsobují světelným podmínkám. Tento jev se nazývá fotomorfogeneze. Fotoreceptory umístěné ve všech částech rostlin umožňují fotomorfogenetické odpovědi (Lee *et al.*, 2017). K detekci světla slouží fotoreceptory a molekuly citlivé na světlo (Yokowa *et al.*, 2014). Světlo má v průběhu fotomorfogeneze specifický vliv na pletivo rostlin huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*). Světlo podporuje růst děložních listů, a inhibuje prodlužování hypokotylu. K dalším změnám morfologie rostlin za změněných světelných podmínek (infračervené světlo, spektrální posun, stín) patří prodlužování stonku nebo řapíku a nevýrazný růst čepele listu (Montgomery, 2016).

2.1.1 Vliv světla na kořeny rostlin

Základním způsobem tropického růstu kořenů je pozitivní gravitropismus, čili růst ve směru zemské tíže. Bylo dokázáno, že růst i vývoj kořene ovlivňuje také světlo. Po osvětlení kořenů rostoucích ve tmě dochází k jejich zakřivení - úniku od vlivu světla. Kořeny proto rostou negativně fototropicky a je známo, že tento způsob růstu je zachován v podmínkách modrého a bílého světla. Červené světlo indukuje pozitivní fototropismus (Zhao *et al.*, 2014). V podmínkách gravitace je dominantním pozitivní gravitropismus nad negativním fototropizmem. Nedávné experimenty na palubě mezinárodní vesmírné stanice ukázaly, že kořeny v prostředí mikrogravitace vykazují pozitivní fototropismus za působení modrého světla. Pozitivní fototropismus je proto podřazen gravitropizmu (Vandenbrink *et al.*, 2016).

Tradiční způsob kultivace rostlin na agarových tuhých médiích je založen na rovnoměrném osvětlení nadzemních částí rostlin a také kořene s přídavkem sacharózy v médiu. Zastínění kořenů a nepřítomnost sacharózy způsobuje delší primární kořeny, nižší hustotu a délku postranních kořenů, poruchy v rozmístění PIN2 a PIN3 (přenašeči auxinu zabezpečující jeho eflux z buňky) v kořenové špičce (Xu *et*

al., 2013; Zhang *et al.*, 2013). Vystavení kořenů světlu je spojeno se zvýšením koncentrace auxinu (indol-3-octové kyseliny; IAA) v kořenové špičce a v přechodné zóně kořene. Tato akumulace auxinu, která je způsobena světlem aktivovanou YUC-dráhou syntézy auxinu, je potřebná pro specifické zakřivení kořene, která nastává po osvětlení kořenů (Suzuki *et al.*, 2016).

Kořeny rostou v půdě, která je světlu za normálních podmínek neprostupná (Yokowa *et al.*, 2014). Výjimku tvoří několik centimetrů při povrchu půdy. Kořeny jsou díky tomu světlem ovlivňovány i přes jejich růst pod zemí. Fotony červeného a infračerveného spektra se dokážou dostat do větší hloubky v půdě než fotony modrého spektra (Mo *et al.*, 2015). Bylo dokázáno, že růst kořenů je také ovlivňován vnímáním světla nadzemními orgány a přenosem signálu do kořenů (Lee *et al.*, 2016).

Význam fototropizmu kořenů není přesně znám. Negativní fototropizmus má pozitivní vliv na odolnost vůči suchu, desikaci a stresu vůči vysokému osvětlení (Galen *et al.*, 2004 a 2006).

2.1.2 Molekulární mechanismy vnímání světla kořeny

Rostliny obsahují rozličné fotoreceptory, které zprostředkovávají světelné vjemy z okolí a spouštějí signalizační dráhy (Montgomery, 2016). V rostlinách huseničku dochází k expresi 14 různých fotoreceptorů, z nichž je většina obsažena také v kořenech (Briggs and Lin, 2012; Jeong and Choi, 2013; Briggs, 2014). Obecně, kořeny obsahují ty samé fotoreceptory jako nadzemní orgány (Galen *et al.*, 2007).

Rostliny mají v závislosti od citlivosti na světelné spektrum několik kategorií fotoreceptorů: fotoreceptory pro UV-B, UV-A, modré, červené i infračervené spektra. Díky takto odlišným a citlivým fotoreceptorům si rostliny vyvinuly komplexní a extrémně citlivé systémy, kterými reagují na odlišné světelné podmínky. Tyto fotoreceptory jsou schopny zaznamenat jak spektrum, tak i intenzitu světla (Mo *et al.*, 2015). Všechny fotoreceptory obsahují organickou, neproteinovou část, známou pod názvem chromofor. Chromofor je primární absorbant fotonů a je kovalentně či nekovalentně vázán na protein. Fotoreceptory jsou podle jejich chemického složení a organizace klasifikovány do šesti skupin: lightoxygen-voltage (LOV) senzory, xantopsiny, fytochromy, senzory modrého světla využívající FAD (flavin adenine dinucleotide), kryptochromy a rodopsiny. Každý má jinou strukturu a příslušný

fotoreceptor provádí odlišnou chemickou reakci. Mohou obsahovat i více než jeden chromofor (Möglich *et al.*, 2010).

2.1.2.1 Fytochromy

Fytochrom je rostlinný senzor, který zaznamenává světlo červeného a infračerveného spektra. Má 5 podskupin – PhyA až PhyE. Všechny tyto fytochromy mají stejný chromofor – fytochromobilin, který přijímá světelné signály (Lamparter, 2004). Fytochromy mají dvě spektrálně odlišné konformace (tzv. Pr a Pfr) se dvěma maximálními absorpčními vlnovými délkami (660nm a 730nm), které jsou fotokonvertibilní. Konformace s $\lambda_{max} = 730$ je aktivní při klíčení semen (Rockwell *et al.*, 2006). Exprese fytochromů v kořenech je druhově závislá, ve většině případů jsou exprimovány v kořenové čepičce a meristému (Mo *et al.*, 2015). Po stimulaci světlem jsou fytochromy translokovány do jádra, kde spouštějí expresi genů (Li *et al.*, 2011). Jejich role fotoreceptorů není limitována jenom na tuto jadernou funkci (Hughes, 2013). Phytochrom A také může fyzicky interagovat s Fototropinem 1 na plasmatické membráně v huseníčku (Neoptolemos *et al.*, 2010). Fytochrom-fototropinové hybridní fotoreceptory se nazývají neochromy.

Fytochromy zprostředkovávají různé fyziologické procesy v rostlinách huseníčku, jako je růst primárního i postranních kořenů (Takano *et al.*, 2001). Bylo zjištěno, že PhyA v kořenech huseníčku inhibuje negativní fototropismus indukovaný modrým světlem (Kiss *et al.*, 2003) a že oba fotoreceptory, PhyA i PhyB, hrají významné role v prodlužování kořene stimulované světlem (Correll and Kiss, 2005).

Fytochrom B je zodpovědný za expresi transkripčního faktoru ELONGATED HYPOCOTYL 5 (HY5) směrem z nadzemní části rostliny do kořenů. Akumulace HY5 proteinu v kořeni aktivuje jeho růst. Tento mechanismus přímo potvrzuje závislost růstu kořene na osvětlení nadzemní části rostliny (Lee *et al.*, 2016). Fytochromy interagují a fosforylují PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE1 (PKS1) přičemž PKS1 pozitivně ovlivňuje pozitivní fototropismus (Boccalandro *et al.*, 2008). Fytochromy také interagují a regulují s PIRF (phytochrome-interacting ROP guanine-nucleotide exchange factor - RopGEF 1), což je protein - aktivátor malých ROP (Rho of Plants) GTPáz. Pr konformace fytochromů stimuluje GTP aktivační funkci PIRF a Pfr konformace ji inhibuje. Naopak, PIRF negativně reguluje vliv fytochromů na vývoj kořene (Shin *et al.*, 2010).

2.1.2.2 Kryptochromy

Kryptochromy jsou fotoreceptory modrého světla. Obecně jsou kryptochromy flavoproteiny a nachází téměř ve všech organismech (Chaves *et al.*, 2011). V huseníčku byly identifikovány tři zástupci této skupiny, a to CRY1, CRY2 a CRY3 (Liu *et al.*, 2011). Mají vliv na fotomorfogenezi, prodlužování hypokotylu, růst děložních listů a kořene (Wu and Spalding, 2007). Zprostředkovávají negativní vliv modrého světla na nodulaci u *Lotus japonicus* (Shimomura *et al.*, 2016) a také na prodlužování hypokotylu u huseníčku (Li and Yang, 2007). Exprese kryptochromů probíhá na dvou místech – v cytoplazmě a v jádře. Exprese geneticky modifikovaného *CRY1* bez jaderné lokalizační signální sekvence u huseníčku vedla ke stimulaci růstu primárního kořene a děložních listů, přičemž exprese jenom jaderného *CRY1* tyto funkce inhibovala. Jaderná exprese také způsobila zvýšenou produkci antokyanů v přítomnosti modrého světla (Wu and Spalding, 2007).

Aktivace *CRY* genů spočívá v reakci na fotony. Ve tmě je C-konec *CRY* proteinu složen takovým způsobem, že nemůže interagovat s jinými proteiny a tudíž je inaktivní. Při přístupu světla je foton absorbován N-koncem na flavin vázající doménu. Způsobuje chemickou reakci, která spustí změnu konformace a protein se stává aktivním (Zuo *et al.*, 2012; Engelhard *et al.*, 2014). Aktivací kryptochromů dochází také k jejich autofosforylaci, což umožňuje jeho vazbu s dalšími proteiny: CIB1 (CRYPTOCHROME – INTERACTING bHLH1), COP1 a SPA (SUPPRESSOR OF PHYA), čímž jsou spuštěny signalizační dráhy kryptochromu. (Yu *et al.*, 2010).

Při pozorování exprese genů *CRY1* a *CRY2* zjištěno, že interakce CIB1-CRY2, závislá na modrém záření, představuje důležitý mechanismus transdukce signálu kryptochromu. Stále zůstává několik otázek ohledně přímé interakce mezi kryptochromem a CIB1 transkripčním faktorem (Yu *et al.*, 2010). Z tohoto zjištění můžeme odvodit, že *CRY* signalizační dráhy ovlivňují růst kořenů nepřímou regulací (Yu *et al.*, 2010, Mo *et al.*, 2015). Nepřímá regulace je taková, kdy receptor signálu potřebuje k regulaci genové exprese minimálně jednu další biochemickou reakci.

2.1.2.3 Fototropiny

Fototropiny jsou receptory modrého světla zprostředkovávající dynamické procesy ve vývoji rostliny. Mezi jejich funkce patří indukce fototropizmu kořene i stonku rostliny, pohyby chloroplastů, otvírání a zavírání stomat a růst děložních listů (Christie, 2007).

Také zvyšují efektivitu fotosyntézy (Sullivan *et al.*, 2008) regulací a optimalizací procesů závislých na světle – migrace chloroplastů, otevírání průduchů (Briggs and Christie, 2002). Fototropiny jsou kódovány u huseníčku dvěma geny *PHOT1* a *PHOT2*. V kořenech dospělých rostlin huseníčku najdeme výrazně větší zastoupení Phot1 než v nadzemní části. *PHOT1* je nejvíce exprimován v přechodné zóně kořene, není exprimován v kořenové čepičce a meristemické zóně (Sakamoto a Briggs 2002, Wan *et al.*, 2008). V přechodné zóně kořene je *PHOT1* přítomen v kortexu (ale ne v rizodermě), kde byla pozorována jeho polární lokalizace (Mo *et al.*, 2015). Při studiu fototropinu ve fúzi s GFP (*PHOT1::GFP*) fluorescenčním proteinem došlo k objevu distribuce Phot1 po osvětlení modrým světlem. Phot1 je zpočátku rovnoměrně distribuován v plazmatické membráně, po osvětlení je však zřetelná mozaika s výrazně označenými bodovými oblastmi. Tento jev je nejvýraznější v kortikálních buňkách prodlužovací části hypokotylu. Během reorganizace se *PHOT1::GFP* pohybuje do cytoplazmy, s výjimkou vedlejších buněk průduchů. Tento jev vymizí po několika hodinách ve tmě (Wang *et al.*, 2008). Součástí fototropinů je doména LOV1 a LOV2 – světlo snímající protein navázaný na N-konec fototropinu. K aktivaci dochází přes kinázovou doménu C-konce LOV domény fotoexcitací a dále autofosforylací. Fototropiny jsou kinázy, znamená to, že mohou být fosforylovné (Sullivan *et al.*, 2008) a také mohou fosforylovat jiné substráty. Jedním z těchto substrátů je Phytochrome Kinase Substrate 4 (PKS4), který je fosforylován pouze Phot1. Silná exprese *PKS4* i *PHOT1* je v prodlužovací části hypokotylu. PKS4 má skrze Phot1-závislé fosforylace silný vliv na fototropismus (Schepens *et al.*, 2008; Demarsy *et al.*, 2012). Dalším fosforylovaným substrátem Phot1 je BLUS1 (BLUE LIGHT SIGNALING 1). Je to zprostředkovatel pro Phot1 a jeho funkce ve vedlejších buňkách průduchů. Mutantní rostliny *blus1* ztratily funkci v otevírání průduchů závislé na modrém světle (Takemiya *et al.*, 2013).

2.1.2.4 Důležité regulační bílkoviny

E3 ubiquitin ligáza COP1 (CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC 1) je důležitým proteinem negativně regulujícím fotomorfogenezi u rostlin (Kim *et al.*, 2017). COP1 způsobuje ubikvitinizaci a proteazomální degradaci fotoreceptorů jako fytochromy, kryptochromy a jejich interagujících proteinů. Na druhé straně je známo, že fotoreceptory negativně ovlivňují expresi a aktivitu COP1 (Kim *et al.*, 2017). Bylo zjištěno, že negativní regulace COP1 pomocí receptorů za působení světla vede k

inhibici degradace ARP2/3-SCAR proteinového komplexu (Dyachok *et al.*, 2011). ARP2/3-SCAR komplex je zodpovědný za nukleaci a organizaci aktinu (Deeks and Hussey, 2005). Aktivní ARP2/3-SCAR v podmínkách světla zachovává podélnou organizaci F-aktinu v kořeni, což vede k elongaci kořene v podmínkách světla (Dyachok *et al.*, 2011).

Jiným důležitým regulátorem vnímání světla kořeny může být signální dráha kontrolována TOR (Target of Rapamycin) kinázou (Yokawa and Baluška, 2016). Tato kináza má vliv na rovnováhu mezi růstem a stárnutím buněk. Také bylo zjištěno, že TOR kináza se podílí na negativním fototropizmu kořenové špičky a je aktivována auxinem (Schepetilnikov *et al.*, 2013, Bögre *et al.*, 2013). Přesný mechanismus aktivace zatím není znám a je potřeba dalšího výzkumu. Reaktivní kyslíkové radikály slouží jako signální molekuly i pro TOR kinázy. RKR společně s TOR kinázou kontrolují fototropismus kořene. ROS molekuly utlmují signalizaci TOR kináz, což vede k aktivaci autofágie (rozklad proteinů lysozomy, složí k regulaci homeostázy). TOR reguluje růst kořenů regulací autofágie prostřednictvím signalizace TOR. Arabidopsis TOR signalizace může být chápána jako hlavní složka ovládající růst a chování kořenů (Yokawa and Baluška, 2016; Trewavas 2009).

Osvětlení kořenů má veliký dopad na transkriptom kořene (Qu *et al.*, 2017). Byla provedena transkriptomická analýza kořenů zcela osvětlených a se zcela zastíněnými kořeny. Výsledky ukázaly 141 odlišně exprimovaných genů. Největší rozdíly byly pozorovány v biosyntéze flavonoidů, což jsou látky s antioxidačními účinky. V kořenech měly geny pro kryptochromy v případě osvětlení zvýšenou expresi. Exprese fototropinů byla při plném osvětlení snižena, na expresi fytochromu A nemělo osvětlení vliv a fytochrom B reagoval na světlo sníženou expresí, s výjimkou kořenové špičky, kde byla exprese vyšší na světle.

V souladu s transkriptomickou studií, nedávná publikace potvrdila citlivost flavonoidů na osvětlení kořenů. Osvětlení kořenů vyvolává v huseníčku akumulaci flavonolů (podskupina flavonoidů) v kořenech. Flavonoly se rychle hromadí v prodlužovací zóně kořene, blíže ke straně přímého dopadu světla. Tato akumulace podporuje asymetrické prodloužení buňky a způsobuje rozdíl růstu mezi oběma stranami, což vede k ohnutí kořene (Silva-Navas *et al.*, 2016).

2.2 Mitogenem aktivované protein kinázy u rostlin

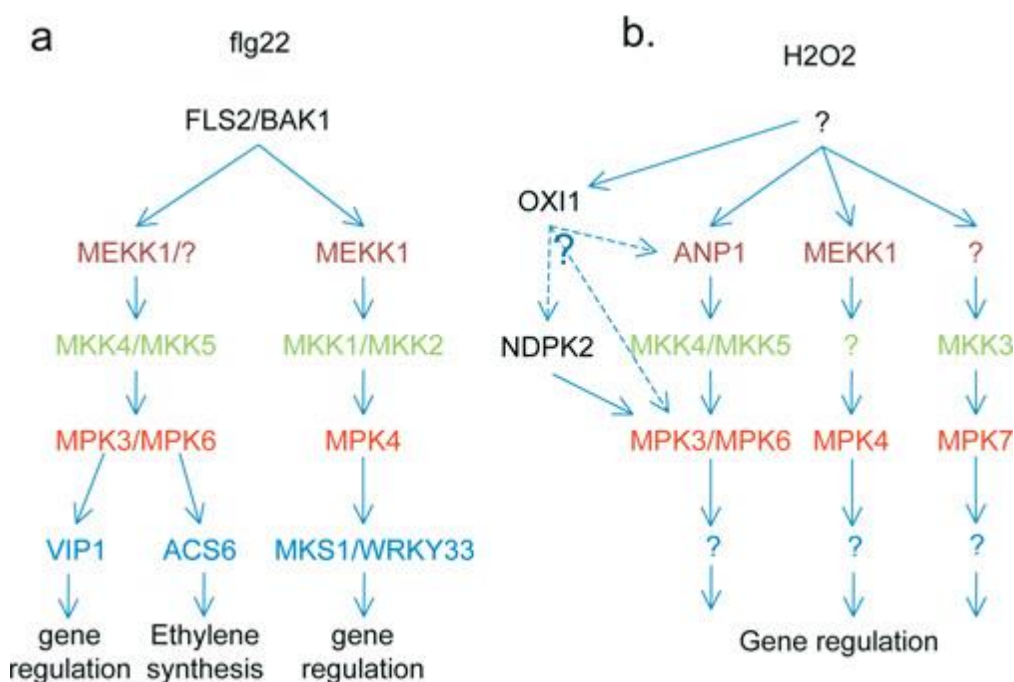
2.2.1 MAPK signalizace a její aktivace během stresové odpovědi rostlin

MAPK (mitogenem aktivované protein kinázy) tvoří signalizační kaskády, které jsou součástí většiny eukaryot. Přenos signálu pomocí těchto kaskád je jeden ze způsobů, jak rostliny reagují na environmentální změny, kterým na rozdíl od pohybujících se organismů, nemohou uniknout. MAPK ovlivňují odpověď na stres, buněčnou smrt, vývoj a růst rostlin díky schopnosti modifikace genové exprese a regulace enzymů (Colcombet and Hirt, 2008; Komis *et al.*, 2018).

Přibližně 10 % všech kináz u rostlin jsou MAPK. Kinázy jsou proteiny zodpovědné za transfer fosfátové skupiny z ATP na cílový protein, čímž způsobují jejich fosforylaci. Fosforylace je nejčastější posttranslační modifikace proteinů (Stone *et al.*, 1995).

MAPK kaskáda se skládá z třech kináz: MAPKKK (mitogen aktivovaná protein kináza kináza kináza), MAPKK (mitogen aktivovaná protein kináza kináza), MAPK (mitogen aktivovaná protein kináza). V kompletně osekvenovaném genomu huseníčku rolního bylo objeveno 80 genů kódujících MAPKKK, které jsou oproti 20 MAPK a 10 MAPKK více heterogenní (Colcombet and Hirt, 2008; MAPK group, 2002). MAPKKK jsou serin - threonin kinázy, které fosforylují (aktivují) MAPKK a dále dochází k fosforylaci a aktivaci MAPK na threoninu a tyrosinu. MAPK jsou schopné fosforylovat velké množství substrátů, včetně jiných kináz, transkripčních faktorů anebo vývojově důležitých proteinů (Colcombet and Hirt, 2008). Aktivace MAPK signálních kaskád vede k aktivaci nebo inaktivaci obranných genů, což vede k rezistenci nebo senzitivě rostlin k stresovým faktorům.

MAPK signální dráhy jsou aktivovány v odpovědi na změny vnějších podmínek prostředí, například při snížené teplotě a zasolení (Teige *et al.*, 2004), suchu (Li *et al.*, 2017), osmotickém stresu (Zhang *et al.*, 2014), oxidačním stresu (Lumbreras *et al.*, 2010), ale také biotickém stresu (Lang *et al.*, 2017). Jedním z mechanismů indukce MAPK signalizace během biotického stresu je uvolnění bakteriálního peptidu flagelinu flg22 do apoplastu. Flg22 je peptid, derivát flagelinu, skládající se z 22 aminokyselin (Overmyer *et al.*, 2003). Flg22 je nejznámějším příkladem signální strukturní molekuly patogenů (tzv. PAMP = pathogen associated molecular pattern). PAMP jsou malé molekuly, obvykle strukturní součásti patogenů (Glazebrook, 2005), které jsou rozpoznány receptorovými kanály rostlin a tak je spuštěna obranná reakce rostlinné buňky. V huseníčku jsou specifické signální receptory pro flg22 umístěny v cytoplazmě. Skládají se ze 2 proteinů - FLS2 (FLAGELLIN SENSING 2) a BAK1 (BRI1-ASSOCIATED KINASE 1; Heese *et al.*, 2007; Chinchilla *et al.*, 2007; Gomez-Gomez and Boller, 2000). V případě detekce flg22 tímto receptorem, dojde k aktivaci MAPK kaskády (Obrázek č. 1 – a; Colcombet and Hirt, 2008).



Obrázek č. 1 – MAPK signální dráhy aktivované flagelinem a peroxidem vodíku (Colcombet and Hirt, 2008).

K aktivaci MAPK během abiotického stresu dochází vlivem druhých posílů, jako například reaktivní kyslíkové radikály, vápník (Ca^{2+}) anebo kyselina fosfatidová (PA;

Smékalová *et al.*, 2014). PA reguluje MAPK kaskády vazbou na jejich komponenty. Bylo dokázáno, že MPK6 se během solného stresu váže na PA, což vyvolává její aktivaci (Yu *et al.*, 2010). RKR jsou molekuly, které narušují redoxní rovnováhu signálních molekul. *In vitro* experimenty ukázaly, že aktivace MPK3 a MPK6 u rýže během oxidačního stresu je závislá na oxidačním stavu specifického cysteinového zbytku (Xie *et al.*, 2014). To může být mechanismus, kterým RKR aktivují MAPK kaskády. Vápník významně ovlivňuje MAPK signalizaci přes konvergenci vápníkové signalizace s MAPK signalizací (Liu *et al.*, 2017).

2.2.2 MAPK a oxidační stres

Bylo prokázáno, že MAPK jsou aktivovány během oxidačního stresu a genetické modifikace. MAPK dokážou změnit odolnost rostlin vůči tomuto stresu (Pitzschke *et al.*, 2009). MAPK i RKR jsou tak na sebe úzce vázané, RKR dokážou spustit MAPK kaskádu ale i MAPK kaskáda dokáže ovlivnit tvorbu RKR (Liua and Heb, 2016). Díky tomu, že H₂O₂ má schopnost procházet přes membrány, stal se jedním z nejdůležitějších prvků rostlinné signalizace (Xing *et al.*, 2008). V současnosti jsou známy 2 MAPK kaskády které jsou aktivovány H₂O₂ v (Kovtun *et al.*, 2000; Nakagami *et al.*, 2006). V jedné z nich jsou fosforylovány MPK6 a MPK3, jako MAPK pomocí ANP proteinů (MAPKKK) a MKK5 (MAPKK; Kovtun *et al.*, 2000). Součástí druhé signální dráhy aktivované pomocí H₂O₂ je MPK4 (Nakagami *et al.*, 2006), která je fosforylována MEKK1. Výsledkem těchto fosforylací je genová regulace (Obrázek č. 1). Je známo, že MAPK dokážou také regulovat aktivitu antioxidantních enzymů. MKK5 – mitogenem aktivovaná protein kináza kináza zprostředkovává expresi Cu-ZnSOD1 a Cu-ZnSOD2 v podmínkách vysoké intenzity osvětlení. (Xing *et al.*, 2008). Expresí genu katalázy je zprostředkována genem *AtMKK1* v přítomnosti kyseliny abscisové a pod vlivem stresových faktorů (Xing *et al.*, 2008).

Genetické modifikace některých MAPK významně mění odolnost rostlin vůči oxidačnímu stresu. Typickým příkladem je skupina ANP genů (ANP1, ANP2 a ANP3), které patří do MAPKKK. (Takáč *et al.*, 2014). Tyto geny mají vliv na cytokinezi a organizaci mikrotubulů v rostlině (Krysan *et al.*, 2002, Beck *et al.*, 2010). Proteomická a biochemická analýza odhalila konstitutivně aktivovanou antioxidantní obranu u dvojitého mutantu *anp2anp3*, což vede k jeho zvýšené toleranci vůči oxidativnímu stresu vyvolaného paraquatem (Takáč *et al.*, 2014).

2.2.3 MPK3

MPK3 je MAPK, která má důležitou signalizační a regulační roli v odpovědi rostlin na biotický i abiotický stres. (Pitzschke *et al.*, 2009; Andreasson and Ellis, 2010).

MPK3 proteiny jsou lokalizovány v cytoplazmě a jádru buňky (Brock *et al.*, 2010; Persak and Pitzschke, 2013), což bylo dokázáno na rostlinách *Tropaeolum majus* a *Nicotiana benthamiana*, při experimentech s tranzientní expresí MPK3-YFP značením (promotor CaMV35S::MPK3-YFP). Malé množství MPK3-YFP bylo lokalizováno v membránách rostlin *Tropaeolum majus* (Pitzschke *et al.*, 2013).

Dva proteiny, MPK3 a MPK6, vykazují mnoho podobností ve struktuře i funkci. K jejich aktivaci dochází přes upstream regulaci MAPK, konkrétně MKK4 a MKK5 (Asai *et al.*, 2002). MPK3 hraje klíčovou roli při adaptaci na nepříznivé podmínky způsobené zvýšeným teplem, osmotickým a UV stresem (Besteiro *et al.*, 2011; Perez-Salamo *et al.*, 2014; Persak and Pitzschke, 2014). UV-B záření aktivuje v rostlinách huseničku mitogen aktivované protein kinázy, konkrétně MPK3. MPK1 huseničku je důležitým regulátorem MPK3. V práci Besteiro a Ulm, (2013) s *mpk1* knock out mutantními rostlinami huseničku, byly tyto rostliny hypersenzitivní na UV-B záření, což bylo způsobeno neaktivním *MPK3*. U rostlin, které neměly schopnost opravit škody způsobené UV-B zářením, byla zjištěna vysoká aktivita MPK3. Toto zjištění naznačuje, že poškození DNA způsobené UV zářením by mohlo být spouštěčem MAPK kaskády (Besteiro and Ulm, 2013).

Jednoduchá knock out mutace *MPK3* nemá zásadní vliv na vývoj rostlin - dochází ke zkracování šesulí a mutace průduchů a kontroluje růst postranních kořenů. Fenotyp kořene nebyl detailně studovaný (Cho *et al.*, 2008). MPK3 má svůj význam ve vývoji vajíček rostlin (Wang *et al.*, 2008). Bez správně fungující MPK3 nemůže dojít k vytvoření rostlinných rozmnožovacích orgánů. V rostlinách, kde MPK3 neplní svou funkci, dochází k sterilitě nebo vzniku defektních embryí (Carey *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008). Gudesblat *et al.*, 2007 prokázali, že se MPK3 podílí na regulaci otevírání a zavírání stomat v odpovědi na ABA a H₂O₂. Kaskáda MKK7-MPK3 také reguluje morfologii listů u huseničku (Jia *et al.*, 2016). Ztráta funkce *MPK3* i *MPK6* je pro embryo huseničku nepřekonatelnou překážkou a rostlina hyne. Pro záchranu těchto dvojíých mutantů a zjištění funkce *MPK3* použili Wang *et al.*, (2007) RNA interferentní *MPK3* a vložili tento konstrukt do *mpk6* deficientních rostlin. Vznikl

nenulový dvijitý mutant *mpk3mpk6*. Výsledné rostliny mají defektní průduchy, které se objevují ve shlcích a místy vůbec nedochází k vzniku vedlejších (pomocných) buněk průduchů (Wang *et al.*, 2007). Spojením aktivity MAPK a transkripčního faktoru SPEECHLESS (SPCH), patřící do skupiny basic helix-loop-helix (bHLH; Komis *et al.*, 2018) vzniká specifický typ buňky, který umožňuje integraci více vývojových a environmentálních signálů vzniku a rozmístění průduchů. SPCH je regulátor průduchů, který obsahuje unikátní MAPK fosforylační cílovou doménu. bHLH transkripční faktor je cílem MPK3 (Lampard *et al.*, 2008).

Další důležitou roli hrají MAPK v udržení redoxní homeostázy (stálost vnitřního prostředí) v rostlině huseníčku. V rostlinách s chybějícím genem *MEKK1* dochází k chybné regulaci exprese několika genů zapojených v redoxní kontrole buněk a akumulují se zde reaktivní kyslíkové radikály (Nakagami *et al.*, 2006). Studie dokazují, že *MEKK1* signalizační dráha, se zapojuje do reakcí na biotický i abiotický stres (Mizoguchi *et al.*, 1996) a je regulována přítomností H_2O_2 . *MEKK1* deficientní rostliny huseníčku vykazují výrazné fenotypové odchylky od kontrolních rostlin, jako trpasličí vzrůst a méně kořenových vlásků i postranních kořenů (Nakagami *et al.*, 2006). Akumulace H_2O_2 může být způsobena vystavení rostliny ozónu. Odpověď rostliny na tento druh stresu je stejná jako při vystavení rostliny H_2O_2 (Rodriguez *et al.*, 2010). V případě *mpk3* a *mpk6* delece, jsou rostliny na přítomnost ozónu hyperenzitivní a je narušena homeostáza rostliny, což dokazuje významnou roli MPK3 v zachování redoxního prostředí huseníčku (Miles *et al.*, 2005).

mpk3 mutant je hypersenzitivní na solný stres (Pitzschke *et al.*, 2014), role MPK3 v odpovědi na stres je z části zprostředkována pomocí fosforylace lipid transfer proteinu AZI1 (Pitzschke *et al.*, 2014).

Při práci s *mpk3* mutanty huseníčku bylo experimentálně potvrzeno, že MPK3 kinázy jsou zodpovědné za spuštění *LOX* genu, tzn. transkripci *LOX2*, *LOX3* a *LOX4* enzymů. Tyto lipoxygenázy (*LOX*) se aktivují pod vlivem různých stresů a jejich transkripce se zvyšuje v případě ozáření rostliny vlnovou délkou spadající do červené části světelného spektra. Při napadení rostliny patogeny, byla aktivita MPK3 při ozáření červeným světlem vyšší, což dokazuje spojitost mezi MAPK a *LOX* (Zhao *et al.*, 2014).

Kromě abiotických stresů reaguje MPK3 také na biotický stres – infekce způsobené houbami. Do obrany je v tomto případě zakomponovaný i transkripční faktor WRKY33 (Mao *et al.*, 2011). MPK3 fosforyluje velké množství substrátů - různorodé enzymy (syntázy, hydrolázy, oxidoreduktázy...; Han *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2010) i transkripční faktory (WRKY, bHLH, MYB bZIP, Hsf...; Lampard *et al.*, 2008; Bethke *et al.*, 2009; Evrard *et al.*, 2013; Nguyen *et al.*, 2012; Yoo *et al.*, 2008). Fosforylace zvyšuje aktivitu enzymů a stabilitu proteinů (Wang *et al.*, 2010). MPK3 spouští obranné mechanismy vůči patogenům (Lang *et al.*, 2017; Genot *et al.*, 2017). Také je schopna interferovat s pozitivními účinky autoimunní reakce *mpk4* mutanta (Genot *et al.*, 2017). Fosforylace E3 ubiquitin ligase PUB22 pomocí MPK3 způsobuje jeho stabilizaci a utlmení imunitní odpovědi u huseníčku (Furlan *et al.*, 2017).

2.3 Oxidační stres a reaktivní kyslíkové radikály

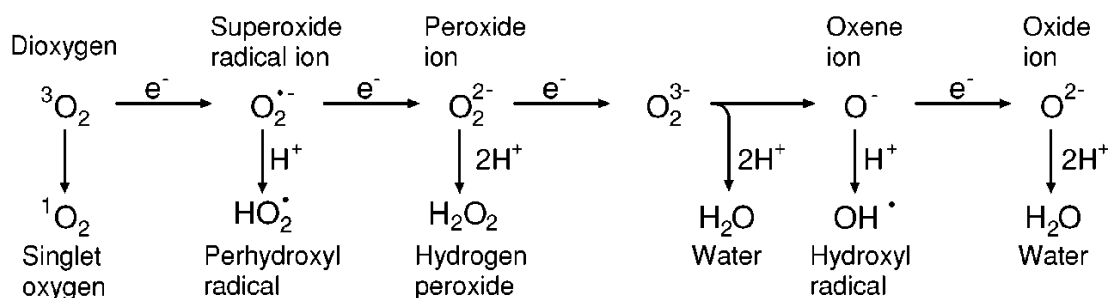
S vývojem aerobních drah metabolismu, jako je například fotosyntéza a dýchání, došlo ke vzniku reaktivních kyslíkových radikálů. Velká škála environmentálních stresových faktorů (vysoká nebo nízká teplota, sucho, UV záření, zasolení atd.) může způsobit nadměrnou tvorbu RKR, která vyvolává poškození DNA, lipidů a proteinů. Stav, při kterém je způsobováno poškození nadměrnou produkcí RKR, je označován jako oxidační stres (Gill and Tuteja, 2010). Role RKR není jen negativní, RKR také fungují jako signalizační molekuly a v rostlinách částečně regulují vývoj a odpovědi na obranu proti abiotickým a biotickým stresům (Apel and Hirt, 2004). Koncentrace RKR je udržována antioxidační obranou. V podmínkách, kdy dochází k oxidačnímu stresu, není účinnost antioxidační obrany dostatečná a RKR mají na rostlinu negativní vliv. Indukce buněčné smrti v důsledku oxidačního stresu není vždy pro rostlinu neprospěšná a to například v případě hypersenzitivní odpovědi rostlin (Apel and Hirt, 2004).

2.3.1 Vznik reaktivních kyslíkových radikálů

Fyzikálně chemické vlastnosti předurčují kyslík k tomu, že při absorpci energie se mění na vysokoreaktivní formy. Kyslík je v elektron-transportních řetězcích redukován na vodu. Za změny vnějšího prostředí může dojít k neúplné redukci kyslíku,

což vede ke vzniku RKR. RKR mají různou životnost a role v signalizaci (Breusegem *et al.*, 2001).

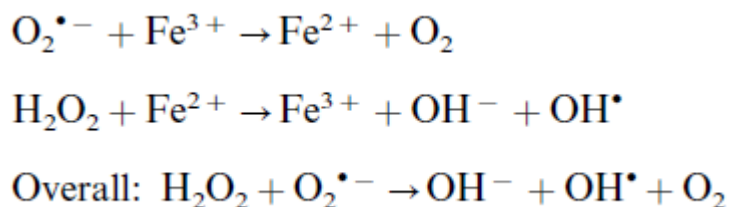
K redukci molekulárního kyslíku (O_2) na vodu dochází přes různé formy RKR (Obrázek č. 2).



Obrázek č. 2 – Monovalentní redukce kyslíku na RKR (Apel and Hirt, 2004)

Prvním krokem přeměny kyslíku na vodu je jeho redukce a tvorba hydroperoxylového ($HO_2^{\bullet-}$) a ($O_2^{\bullet-}$) radikálu. Tyto formy RKR mají velmi malý poločas rozpadu (zhruba 2-4 μ s). Při nadměrné produkci $O_2^{\bullet-}$ dochází k poškození (oxidaci) aminokyselin, konkrétně histidinu, tryptofanu a metioninu (Knox and Dodge, 1985; Sutherland, 1991). $O_2^{\bullet-}$ také způsobuje peroxidaci lipidů, tím dochází k poškození buněčných membrán (Halliwell and Gutteridge, 1989).

Při pokračování redukce kyslíku dochází k přeměně hydroperoxylového ($HO_2^{\bullet-}$) a superoxidového ($O_2^{\bullet-}$) radikálu na peroxid vodíku (H_2O_2). Oproti $HO_2^{\bullet-}$ a $O_2^{\bullet-}$ má H_2O_2 poločas rozpadu přibližně 1 ms, má větší schopnost difundovat z místa vzniku do okolí a oxiduje thioly (SH skupiny; Levine *et al.*, 1994). K další oxidaci H_2O_2 na hydroxylový radikál (OH^{\bullet}) dochází za pomoci přechodných kovů (Fe^{2+} , Fe^{3+}) Fenton a Harber-Weiss reakcí (Obrázek č. 3; Breusegem *et al.*, 2001).



Obrázek č. 3 – Fenton a Harber-Weiss reakce (Breusegem *et al.*, 2001)

Posledním krokem k redukci kyslíku na vodu, je přeměna hydroxylového radikálu ($\text{OH}\cdot$). Jeho poločas rozpadu je více než 1 μs (Levine *et al.*, 1994).

2.3.2 Tvorba reaktivních kyslíkových radikálů během abiotického stresu

RKR jsou v rostlinách obvykle produkovány v chloroplastech, mitochondriích, peroxizomech a v apoplastu (Apel and Hirt, 2004).

Reakční centra fotosystému I a II (PS I a PS II) v thylakoidech chloroplastů jsou jedny z hlavních generátorů RKR. Existují dva primární procesy vzniku RKR v průběhu fotosyntézy. Prvním je přímá fotoredukce kyslíku na $\text{O}_2^{\cdot-}$ radikál (Foyer and Noctor, 2005). K této redukci může dojít díky lineárnímu elektronovému transportu v chloroplastech, které vytváří v souvislosti s PS I sloučeniny s redukčními vlastnostmi (Badger *et al.*, 2000). Druhým způsobem vzniku RKR v souvislosti s fotosyntézou, jsou reakce fotorespiračního cyklu, který je aktivován oxygenační aktivitou Rubisca v chloroplastech a následní translokací glykolátu do peroxizomů, kde dochází k jeho oxidaci na glyoxalát, přičemž se tvorí H_2O_2 (Apel and Hirt, 2004). Mitochondrie savců jsou důležitým zdrojem RKR, kdežto v mitochondriích rostlin je obsah RKR výrazně nižší (Purvis, 1997). Nižší výskyt reaktivních kyslíkových radikálů v mitochondriích rostlin je způsobený alternativní oxidázou (AOX), která s koenzymem Q10 katalyzuje tetravalentní redukci kyslíku (O_2). Koenzym Q10, též známý jako ubichinon, funguje v mitochondriích jako antioxidant (Apel and Hirt, 2004; Wagner, 1995).

2.3.3 Tvorba reaktivních kyslíkových radikálů během biotického stresu

RKR mohou být úmyslně syntetizovány buňkou pomocí enzymatického komplexu NADPH oxidázy, známé též jako RBOH (podle anglického názvu respiratory burst oxidase homologues). RBOH jsou proteiny lokalizované v plazmatické membráně, skládající se z 6 transmembránových domén a 2 hemových skupin. Aktivitou NADPH oxidázy je v apoplastě produkován $\text{O}_2^{\cdot-}$, který je následně odbouráván na H_2O_2 . Produkce RKR pomocí RBOH hraje zásadní roli v obraně proti patogenům. Při snížení exprese RBOH dochází k nízké produkci RKR a rostlina musí k obraně proti patogenům využít alternativní obranné mechanismy (Marino *et al.*, 2011). RKR plní během obranných mechanismů důležitou roli, protože se podílí na aktivaci signálních

drah (např. MAPK), ale také je důležitou složkou programované buněčné smrti během hypersenzitivní odpovědi (Zurbriggen *et al.*, 2010).

2.3.4 Mechanizmy regulace hladiny RKR

RKR jsou v rostlinách přítomny nejen v měnících se vnějších podmínkách. V případě, kdy je rostlina vystavená stresu, dochází k zvýšení tvorby RKR, což aktivuje různé mechanismy jejich odbourávání. U rostlin se vyvinuli enzymatické a neenzymatické způsoby kontroly hladiny RKR. Neefektivnějším způsobem obrany rostlin proti nadbytku reaktivních kyslíkových radikálů je pomocí enzymů. Mezi tyto enzymy patří superoxiddismutasa (SOD), kataláza (CAT) a peroxidázy (askorbát peroxidáza APX, glutathion peroxidáza GPX; Foyer and Noctor, 2005).

2.3.4.1 Enzymatické odbourávání RKR u rostlin

Superoxiddismutasa

Jeden z hlavních antioxidačních enzymů je superoxiddismutasa (SOD). SOD je prvořadý antioxidační enzym a redukuje $O_2^{\bullet-}$, který je nejčastěji lokalizován na stejných místech jako elektronové transportní řetězce (mitochondrie, chloroplasty) (Alscher *et al.*, 2002).

SOD dělíme podle centrálního atomu kovu na izoformy FeSOD, MnSOD a Cu-ZnSOD. Isoformy SOD jsou v buňce účinně kompartmentalizovány. FeSOD se nachází v chloroplastech a cytosolu, MnSOD v mitochondriích a peroxizomech a Cu-ZnSOD v chloroplastech a cytosolu (Kliebenstein *et al.*, 1998). Kovy přítomné v aktivních centrech proteinu mají funkci donoru elektronů přímo radikálu $O_2^{\bullet-}$, který následně reaguje s protonem a tvoří H_2O_2 (viz Obrázek č. 4; Bowler *et al.*, 1994).

Superoxide Dismutase:



Obrázek č. 4 – Přeměna superoxidu $O_2^{\bullet-}$ na peroxid vodíku (H_2O_2) pomocí SOD (Apel and Hirt, 2004)

V rostlinách huseníčku se nacházejí tři izoformy FeSOD a to FeSOD1, FeSOD2 a FeSOD3, přičemž FeSOD1 se nachází v cytosolu a FeSOD2 a FeSOD3 jsou plastidové (Kliebenstein *et al.*, 1998). Díky absenci FeSOD u živočichů bylo prokázáno, že

původně byly geny kódující FeSOD umístěny v plastidech a v průběhu evoluce se začlenily do jaderného genomu (Bowler *et al.*, 1994). FeSOD vyšších rostlin se skládá ze čtyř identických jednotek, tvořících tetramer, kdy každá z těchto jednotek má velikost 80-90 kDa a atomy železa se nacházejí v aktivních místech (Alscher *et al.*, 2002).

Za evolučně nejstarší SOD je považována FeSOD. Vlivem změny geologických podmínek došlo k využití více dostupného kovu – manganu. Proto se MnSOD považuje za evolučně druhou nejstarší SOD. Z hlediska struktury (primární, sekundární i terciální) jsou si tyto dvě izoformy SOD velmi podobné, také se objevují ve formě homodimeru nebo homotetrameru (Alscher *et al.*, 2002).

Po ustálení koncentrace kyslíku v atmosféře a přeměně nerozpustného Cu (I) na Cu (II), došlo k dalšímu evolučnímu vývoji SOD a jako další centrální atom se začala využívat měď. Vzhledem k tomu, že kovy Fe a Mn jsou si strukturně podobné, nedošlo u těchto dvou typů SOD (FeSOD a MnSOD) k výrazné změně v proteinové struktuře. Cu a Zn mají výrazněji odlišné elektrochemické vlastnosti a tak se musela změnit i struktura proteinu Cu-ZnSOD (Bannister *et al.*, 1991). Cu-ZnSOD se v rostlinných buňkách objevuje ve dvou formách. První forma je strukturou homodimer a nachází se v cytoplazmě a periplazmě. Druhá forma Cu-ZnSOD je homotetramer a je lokalizována převážně v chloroplastech a extracelulárních prostorech. Ve struktuře proteinu je zabudováno aktivní místo pro každý kov (Cu i Zn) nezávisle na sobě (Bordo *et al.*, 1994).

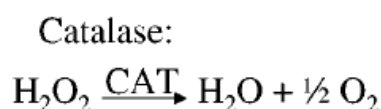
Regulace SOD na molekulární úrovni

Měď (Cu) je nezbytným mikronutrientem pro většinu živých organismů. Je součástí kofaktorů proteinů, včetně Cu-ZnSOD (Pilon *et al.*, 2006). Při nedostatku Cu dochází v rostlině k expresi miR398, která je zapojená v degradaci mRNA, podílející se na expresi Cu-ZnSOD v huseníčku. Podmínkou pro funkční odpověď miR398 je promotor SPL7 (Squamosa promoter binding protein-like 7). SPL7 je také nezbytnou součástí exprese několika dalších miRNA (miR397, miR408 a miR857) zapojených v regulaci homeostázy mědi a genů kódujících transport mědi. Z těchto poznatků lze usoudit, že SPL7 hraje klíčovou roli v odpovědi na nedostatek mědi (Yamasaki *et al.*, 2009).

Homeostáza Cu v buňce je úzce spojena s výskytem sacharózy (C₁₂H₂₂O₁₁). Společně hrají důležitou roli v růstu a vývoji rostlin. Sacharóza vyvolává expresi miR398, kterou reguluje SPL7 (Ren and Tang, 2012). Sacharóza je spotřebovávána v průběhu fotosyntézy, kdy se zároveň tvoří RKR. Ty jsou regulovány SOD obsahující měď a zinek, jejíž exprese je regulována miR398. V případě nedostatku mědi může funkci Cu-ZnSOD vykonávat FeSOD, která není regulována miRNA (Dugas *et al.*, 2008).

Kataláza

Kataláza (CAT) je první objevený charakterizovaný antioxidační enzym. K tomuto objevu došlo v roce 1900 a jeho objevitelem se stal Oscar Leow (Mhamdi *et al.*, 2010). Jeho funkce spočívá v přeměně H₂O₂ na vodu a kyslík (Obrázek č. 5). Při této reakci dochází k dvěma reakcím, přičemž první je oxidace H₂O₂ a vzniku vody a druhá spočívá v redukci H₂O₂ a vzniku kyslíku (Zamocky *et al.*, 2008). Tuto formu katalázy nazýváme monofunkcí a nachází se primárně u vyšších rostlin. Velikost monomerní jednotky katalázy se pohybuje kolem 55 kDa. Kataláza u vyšších rostlin se vyskytuje ve formě tetrameru (Corpas *et al.*, 1999).



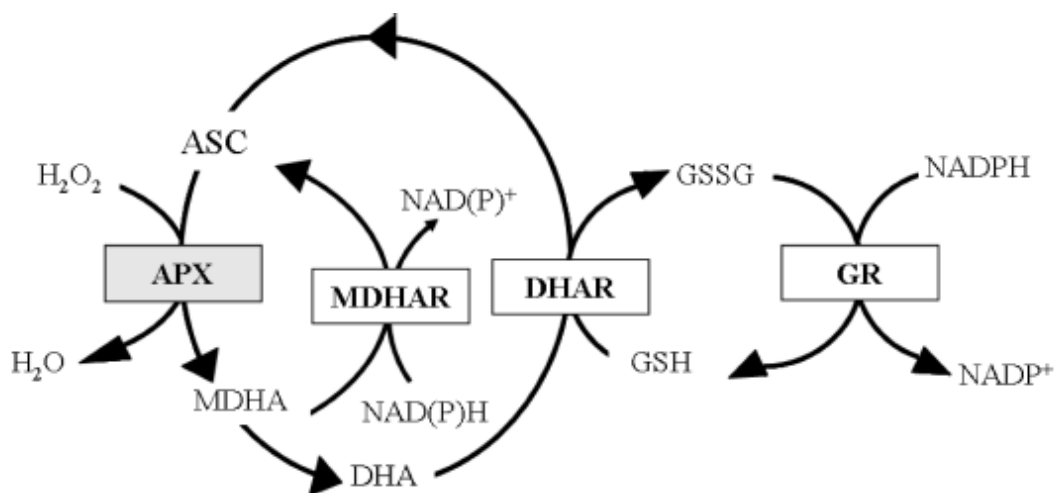
Obrázek č. 5 – Přeměna peroxidu vodíku (H₂O₂) na vodu a kyslík pomocí katalázy (CAT; Apel and Hirt, 2004)

V rostlinách huseníčku byly identifikovány tři geny pro katalázu – *CAT1*, *CAT2* a *CAT3*. Funkce všech izoform spočívá v kontrole homeostázy reaktivních kyslíkových radikálů. Izoformy katalázy se liší nejen ve způsobu aktivace ale i lokalizací. *CAT1* a *CAT2* izoforma se nachází převážně v děložních listech, růžici rostliny a v šesulích. Nízká exprese *CAT1* je typická pro pravé listy a kořeny. Pro *CAT3* je typická exprese ve stonku a kořenech. Hlavní funkce izoformy *CAT1* je odstranění RKR vytvořených vlivem různých enviromentálních stresů. *CAT2* izoforma je aktivována stresem vyvolaným ze sucha nebo nízké teploty a aktivita *CAT3* stoupá ve spojení nejen se zvýšenou koncentrací RKR, způsobenou stárnutím rostliny, ale také s přítomností kyseliny abscisové (Du *et al.*, 2008).

Askorbát glutathionový cyklus

Významným mechanismem odbourávání H_2O_2 je tzv. askorbát glutathionový cyklus. Jeho hlavními složkami jsou neenzymatické komponenty jako askorbát a glutathion, ale také enzymy jako askorbát peroxidáza (APX) a glutathion peroxidáza (GPX) (Apel and Hirt, 2004).

Askorbát-glutathionový cyklus je sled reakcí, ve kterých dochází k regeneraci askorbátu a glutathionu, které mají vliv na udržení redoxní homeostázy buněk rostlin (Gara *et al.*, 2003). Prvním enzymem této dráhy je APX, která odbourává H_2O_2 oxidací askorbátu na monodehydroaskorbát. Monodehydroaskorbát je pomocí NADPH (přes monodehydroaskorbát reduktázu) redukován na askorbát. K obnově monodehydroaskorbátu na monodehydroaskorbát reduktázu dochází díky redukční energii z NADPH. Dehydroaskorbát je redukován přes glutathion na askorbát, redukční energie pochází z enzymu dehydroaskorbát reduktáza. Nakonec je glutathion obnovený z oxidovaného glutathionu (GSSG) přes glutathion reduktázu, která je aktivovaná NADPH (Noctor and Foyer, 1998; Obrázek č. 6). Enzymy askorbát-glutathionového cyklu hrají roli také v klíčení semen, růstu i vývoji rostlin (Suzuki *et al.*, 2013).



Obrázek č. 6 – Schéma přeměny H_2O_2 na H_2O askorbát-glutathionovým cyklem (Locato *et al.*, 2013). Význam zkratk: APX - Askorbát peroxidáza, ASC – Askorbát, MDHA – Monodehydroaskorbát, NADPH - Nicotinamid adenin dinukleotid fosfát, MDHAR - Monodehydroaskorbát reduktáza, DHA - Dehydroaskorbát, GSH – Glutathion, DHAR - Dehydroaskorbát reduktáza GSSG - Glutathion disulfid, GR - Glutathion reduktáza

Pro správnou funkci APX musí být kyselina L-askorbová v organismu běžně dostupná. APX hraje klíčovou roli v signalizačních drahách odpovídající na abiotický stres (Suzuki *et al.*, 2013).

Glutathion peroxidáza

V rostlinách huseníčku se nachází 8 *GPX* genů (Passaia *et al.*, 2014). K expresi *GPX* genů dochází v přítomnosti oxidačního i environmentálního (zasolení, sucho, chlad) stresu (Gao *et al.*, 2014). Tyto geny kódují mnoho izoenzymů s různými subcelulárními lokacemi. Přítomnost glutathionu je nezbytná pro jeho redukční vlastnosti. V rostlinách bývají glutathion peroxidázy závislé na aktivaci glutathion transferázou. *GPX* má v buňkách roli přeměny H_2O_2 i ostatních RKR na vodu a detoxifikace hydroperoxidů vázaných na lipidy (poškození membrán; Edwards a Dixon, 2009). *GPX* mají vliv na mnoho fyziologických procesů rostlin. Fungují jako součást obrany proti patogenům i abiotickému stresu a kontrolují buněčný růst (Csiszár *et al.*, 2012). Většina rostlinných *GPX* jsou monomerní (Navrot *et al.*, 2006).

Thioredoxíny a peroxiredoxiny

Peroxidázy můžeme dělit do různých skupin podle toho, jestli mají v aktivním místě navázaný hem kofaktor (Koua *et al.*, 2009). Mezi peroxidázy bez hemového kofaktoru se řadí thioredoxiny, peroxiredoxiny i GPX. Tyto skupiny používají jako donor elektronu thioly (Kim *et al.*, 1988). Peroxiredoxiny jsou peroxid reduktázy závislé na cysteinu (Poole and Nelson, 2016) a tvoří zhruba 1 % všech proteinů v chloroplastech. Mnoho enzymů v plastidech jsou aktivovány a deaktivovány thioredoxinovým systémem. Mezi thioredoxiny se řadí skupina devíti proteinů, seskupených do čtyř klastrů. Mohou interagovat s více než 50 proteiny, průduchy, chloroplasty, a zastávají nejrozličnější funkce. V chloroplastech bylo identifikováno 14 proteinů, zapojených v odpovědi na oxidační stres (Peltier *et al.*, 2006).

2.3.4.2 Nenzymatické odbourávání RKR u rostlin

Kyselina askorbová (Vitamin C)

Kyselina askorbová je molekula běžně dostupná v různých tkáních a pletivech a tudíž je to nejhojnější způsob neenzymatického odbourání RKR. Vyšší koncentrace k. askorbové jsou nalezeny ve fotosyntetizujících buňkách a meristematických tkání. Její funkce v chloroplastech spočívá v překonání fotoinhibice, způsobená silným světlem. Askorbát je nejen vytvářen, ale i regenerován z oxidovaných forem v mitochondriích a do chloroplastů je transportován (Szarka A. *et al.*, 2007). Transportním proteinem askorbátu u huseníčku je AtPHT4;4 (Miyaji *et al.*, 2014).

Askorbát patří mezi hlavní redoxní molekuly, je antioxidantem a koenzymem se stěžejní rolí pro funkci některých metabolických drah. ASC je považován za velmi důležitou látku při odbourávání RKR, a to pro její schopnost darovat elektrony velkému množství enzymatických i neenzymatických reakcí (Gill and Tuteja, 2010). ASC regeneruje ostatní metabolity, související s oxidačním stresem, a chrání katalytická místa různých enzymů (hydroxylázy) před nevratným oxidačním poškozením způsobeným RKR (Locato *et al.*, 2013).

Glutathion (GSH)

Tripeptid glutathion - γ glu-cys-gly je lokalizovaný v buněčných organelách rostlin jako endoplazmatické retikulum, cytosol, vakuola, mitochondrie, chloroplasty, peroxizomy i apoplast (Jimenez *et al.*, 1998). Jeho funkce spočívá v regulaci

transportu sulfátů, detoxifikací xenobiotik a expresí genů zodpovědných za stresové odpovědi (Mullineaux a Rausch, 2005). K udržení redoxní homeostázy buňky je důležitá rovnováha mezi GSH a GSSG (Foyer and Noctor, 2005). Glutathion je v buňce potřebný pro udržení jejího redukováného stavu a tím reagovat na efekty indukované RKR (Meyer, 2008).

Prolin

Prolin, kdysi známý pouze jako osmolyt, je nyní považován i za jeden z antioxidantů, jehož hlavní funkce je inhibice programované buněčné smrti. Dále prolin stabilizuje proteiny, je inhibitorem peroxidace lipidů a redukuje hydroxylový radikál (Trovato *et al.*, 2008). Bylo zjištěno, že zvýšená akumulace prolinu souvisí se zvýšenou tolerancí na různé abiotické stresy, hlavně zasolení a stres způsobený suchem (Hare and Cress, 1997). Z těchto poznatků lze usoudit, že prolin není jen redoxní signalizační molekula, ale také redukuje RKR.

α -tokoferol (Vitamin E)

Tokoferoly jsou považovány za hlavní antioxidanty v biomembránách. Jsou to v tucích rozpustné antioxidanty odstraňující RKR a lipidové radikály (Hollander-Czytko, 2005). V rostlinách jsou lokalizovány v tylakoidních membránách chloroplastů. Tokoferoly mají 4 izoformy (α -, β -, λ -, δ -), z nichž má α izoforma nejvyšší antioxidační aktivitu a to díky přítomnosti tři metylovaných skupin ve struktuře molekuly (Kamal-Eldin and Appelqvist, 1996).

Karotenoidy

Karotenoidy jsou pigmenty nacházející se v rostlinách i mikroorganismech. V přírodě se nachází více než 600 izoform karotenoidů. Jsou to látky rozpustné v tucích a v rostlinách mají mnoho funkcí, včetně zvýšení tolerance oxidačního stresu (Gill and Tuteja, 2010). Rostliny mají několik mechanismů jak se vypořádat s přebytkem energie ve fotosyntetických membránách. Ve všech fotosyntetizujících organismech, karotenoidy, zeaxantin a tokoferol mají fotoprotektivní roli. Způsobují rozptýlení a přeměnu přebytečné energie na teplo nebo odstranění vzniklých RKR a potlačení peroxidace lipidů (Sieferman-Harms, 1987).

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Materiál

3.1.1 Biologický materiál

Jako rostlinný materiál byly použity rostliny huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) ekotyp Col-0 a mutantní rostliny *mpk3-1*. Jedná se o T-DNA inzerčního mutanta z kolekce SALK (SALK_151594; Carey *et al.*, 2008), přičemž inserce se nachází na pátém exonu (ze šesti).

3.1.2 Chemikálie

Tabulka č. 1: Seznam použitých chemikálií

Název chemikálie	Dodavatel
2-merkptoethanol	Sigma Aldrich
40% akrylamid/bis-akrylamid, 37,5:1??	Bio-Rad
kyselina askorbová	Sigma Aldrich
Tris	Sigma Aldrich
Blotting-grade blocker (odtučněné mléko)	Bio-Rad
Clarity ECL Western Blotting substrate	Bio-Rad
Coomassie protein assay reagent	Sigma Aldrich
Coomasie Brilliant Blue g250	Sigma Aldrich
dithiothreitol (DTT)	Sigma Aldrich
dodecyl sulfát sodný (SDS)	Sigma Aldrich
ethanol	Sigma Aldrich
ferykianid ($K_3[Fe(CN)_6]$)	Sigma Aldrich
ferchlorid ($FeCl_3$).	Sigma Aldrich
glycin	Sigma Aldrich
hovězí sérový albumin (BSA)	Sigma Aldrich
kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA)	Sigma Aldrich

Laemmli pufr	Bio-Rad
methanol	Sigma Aldrich
Murashige & Skoog medium bez vitamínů	Duchefa
Nitroblue tetrazolium chlorid (NBT)	Sigma Aldrich
peroxid vodíku	Sigma Aldrich
paraquat (methyl viologen)	Sigma Aldrich
Peroxyširan amonný (APS)	Sigma Aldrich
phytagel	Sigma Aldrich
Ponceau S	Sigma Aldrich
riboflavin	Applichem
sacharosa	Sigma Aldrich
tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma Aldrich
Tris HCl	Sigma Aldrich
Tween-20	Sigma Aldrich

3.1.3 Přístroje

Tabulka č. 2: Seznam použitých přístrojů

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

3.2 Metody

3.2.1 Příprava rostlinného materiálu

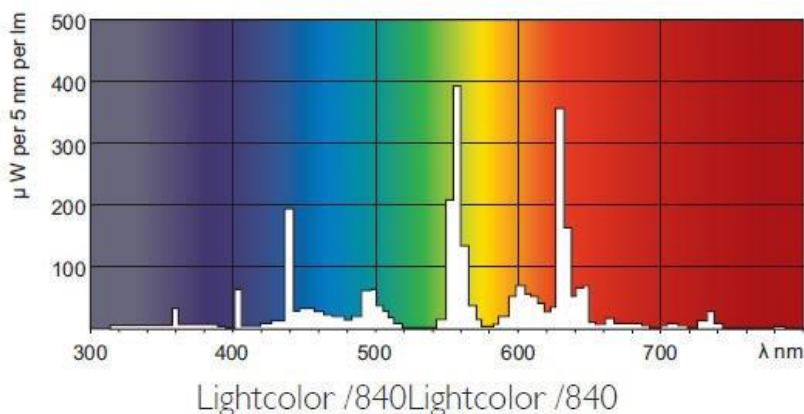
Semena rostlin huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) ekotyp Columbia-0 (Col-0) a mutanta *mpk3-1* byla vysterilizována ethanolem ve sterilním prostředí (sterilní box) podle následujícího protokolu: semena byla 5 minut promývána v roztoku 70% ethanolu, následně 3 minuty v 96% ethanolu a 5 krát promyta sterilní vodou. Sterilní semena byla vysušena v sterilním boxu na sterilním filtračním papíru a suchá sterilní semena byla skladována v Petriho misce zabezpečené parafilmem při 4 °C. Pro kultivaci sterilních semen a výživu následných rostlin bylo použito tuhé ½ MS (Murashige a Skoog, 1962) médium (pH 5,8; Tabulka č. 3).

Všechny analýzy byly provedeny ve třech biologických replikách. Rozdíly mezi rostlinami (vzroky) byly vyhodnoceny statisticky pomocí Studentova t testu, při hladině významnosti p je menší jako 0,05.

Tabulka č 3. : Složení ½ MS média (Murashige a Skoog, 1962).

Sacharóza	10 g.l ⁻¹
MS médium bez vitaminů	2,15 g.l ⁻¹
Phytigel	8 g.l ⁻¹

Médium bylo sterilizováno autoklávováním. Sterilní médium bylo v sterilním boxu rozlito do sterilních čtvercových Petriho misek (přibližně 50-60 ml média na jednu misku). Na jednu Petriho misku s tuhým médiem bylo nasazeno pomocí sterilního párátko do jedné řady 20 semen, přibližně 2 cm od horního okraje. Vysázená semena byla inkubována minimálně 24 hodin při 4 °C pro stratifikaci. Následovně byla semena vertikálně inkubována ve fytotronu, 13 dní při fotoperiodě 16/8, 70% vlhkosti a intenzitě světla 62,6 uM.m⁻².s⁻¹. Osvětlení bylo zabezpečeno pomocí fluorescenčních trubcových zářivek Philips master TL-D 36W/840. Světelné spektrum emitované těmito zářivkami je znázorněno na Obrázku č. 7.



Obrázek č. 7 – světelné spektrum emitované zářivkami osvětlující rostliny huseníčku v průběhu kultivace (<https://www.lampbelgie.be/en/philips-master-tl-d-36w-840-97cm.html>)

Při inkubaci rostlin ve fytotronu byly praktikovány 2 způsoby pěstování – kultivace s úplným osvětlením kořenů a se zastíněnými kořeny. V systému s osvětlenými kořeny byly celé rostliny, včetně kořenů, na Petriho misce postavené vertikálně vystaveny světlu z vrchu. V systému se zastíněnými kořeny byla Petriho miska vložena do černého obalu tak, aby zůstaly nadzemní orgány zvrchu osvětlené. Díky tomu bylo částečně zabráněno osvětlení kořenů a tak došlo k simulaci přirozených podmínek.

Selekce pozitivních mutantních rostlin probíhala ve 2 krocích na základě fenotypů pomocí binokulárního mikroskopu. Po 4-5 dnech kultivace je možné pod binokulárním mikroskopem pozorovat odlišný fenotyp kořenů mutantních rostlin: *mpk3-1* mutantní rostliny mají oproti rostlině ekotypu Col-0 ektopické kořenové vlásky a menší vzdálenost kořenové špičky od prvního vyvíjejícího se kořenového vlásku. Později, na plně vyvinutých pravých listech, je možné pozorovat odlišný fenotyp trichomů - u mutantních rostlin se vyskytují trichomy s více než třemi větvemi (Zapletalová *et al*, nepublikované data). Negativní rostliny nebyly zahrnuty do analýz.

Rostliny ve věku 13 dní byly odebrány pro biochemické analýzy. Pro fenotypovou analýzu byly rostliny dokumentovány vždy 1x denně po dobu 10 dní, od 3. do 13. dne od vysazení semen. Pozorovali jsme délku primárního kořene a počet postranních kořenů s délkou v rozmezí 1-5 mm, 6-10 mm, 11-15 mm a víc než 15 mm. Tyto pozorování byly provedeny přes přístroj a software Imagescanner III firmy GE Healthcare. Pro vyhodnocování získaných dat byl použit program ImageJ.

3.2.2 Extrakce proteinů pro nativní elektroforézu

Pro biochemické analýzy byly použity celé rostliny, které byly okamžitě homogenizovány tekutým dusíkem v třecí misce na jemný homogenát. Homogenát byl skladován při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do zpracování.

K 8 homogenizovaným rostlinám (do jedné mikrozkušavky) bylo přidáno přibližně $300\text{ }\mu\text{l}$ Na-fosfátového extrakčního pufru (50 mmol.l^{-1} , pH 7,8) s obsahem 2 mmol.l^{-1} kyseliny askorbové, 2 mmol.l^{-1} EDTA a 10 % glycerolu.

Se všemi vzorky bylo manipulováno tak, aby jejich teplota nepřekročila $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ - pro zabránění denaturace. Po krátké inkubaci (15 minut) a průběžném vortexování homogenizovaných rostlin s extrakčním roztokem byly vzorky zcentrifugovány 20 minut při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 13000 g . Supernatant byl přepipetován do čisté mikrozkušavky a byl použit pro biochemické analýzy.

3.2.3 Měření obsahu bílkovin

Pro měření obsahu bílkovin v extraktech byla použita metoda podle Bradforda (Bradford, 1967). Reakční směs byla připravena z $89\text{ }\mu\text{l}$ destilované vody, $10\text{ }\mu\text{l}$ desetinásobně koncentrovaného Bradfordova činidla (Coomassie protein assay reagent; Sigma Aldrich) a $1\text{ }\mu\text{l}$ extraktu. Pro eliminaci nespecifického signálu byl spektrofotometr vynulován měřením stejné reakční směsi, přičemž byl vzorek nahrazen extrakčním roztokem. Absorbance byla po 10 minutové inkubaci při laboratorní teplotě měřena při 595 nm a obsah bílkovin byl vypočítán pomocí kalibrační křivky zhotovené na základě hovězího sérového albuminu jako standardu.

3.2.4 Nativní polyakrylamidová elektroforéza

Při nativní elektroforéze dochází k separaci proteinů podle molekulové hmotnosti a náboje v nativním stavu. Byl připraven 10 % dělicí nativní polyakrylamidový gel (Tabulka č. 4) s rozměry 90 mm (d) x 70 mm (v) x 1 mm (h), na který byl nanesen 4% nativní zaostřovací gel (Tabulka č. 5). Elektroforéza probíhala přibližně 2 hodiny v 800 ml elektroforetickém pufru pro nativní elektroforézu (Tabulka č. 6) při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ při konstantních 10 mA/gel .

Tabulka č. 4: Chemické složení 10% nativního separačního gelu

Složka	Objem
Destilovaná voda	4 950 μ l
1,5mol.l ⁻¹ Tris-HCl, pH 8,8	2 500 μ l
40% akrylamid/bis-akrylamid	2 500 μ l
10% APS	50 μ l
TEMED (0,3%)	5 μ l
Celkový objem (2 gely)	10,005 ml

Tabulka č. 5: Chemické složení 4% zaostřovacího gelu

Složka	Objem
Destilovaná voda	3 230 μ l
0,5mmol.l ⁻¹ Tris-HCl, pH 6,8	1 260 μ l
40% akrylamid/bis-akrylamid	500 μ l
10% APS	25 μ l
TEMED (0,3%)	5 μ l
Celkové množství (2 gely)	5,02 ml

Tabulka č. 6: Elektroforetický pufr

Složka	Navážka
Tris (25mmol.l ⁻¹)	3,03 g
Glycin (192mmol.l ⁻¹)	14,41 g
Celkové množství chemikálií	Objem – 1 l

3.2.4.1 Specifické barvení aktivity katalázy na nativních polyakrylamidových gelech

V rámci jednoho vzorku bylo naneseno 10 μ g proteinů na gel. Po ukončení elektroforézy byl gel promytý třikrát po 5 minutách v destilované vodě a následně inkubován v 0,006% roztoku H₂O₂ v destilované vodě. Po 10 minutách v roztoku H₂O₂ byl gel promyt v destilované vodě a inkubován v roztoku 2% ferikyanidu

($K_3[Fe(CN)_6]$) a 2% ferichloridu ($FeCl_3$). Inkubace probíhala přibližně 10 minut, dokud se na gelu neobjevil světlý signál na tmavém pozadí. Dokumentace probíhala na zařízení Chemidoc (Bio-Rad).

3.2.4.2 Specifické barvení aktivity superoxidodismutasy

Na gel bylo nanášeno 30 μ g proteinů na vzorek. Po ukončení elektroforézy byl gel inkubován 15 minut v 50 $mmol.l^{-1}$ Na fosfátovém pufru (pH 7,8). Po inkubaci byl gel vložen na 20 minut do 50 $mmol.l^{-1}$ Na-fosfátového pufru (pH 7,8) s přidávkem 0,5 $mmol.l^{-1}$ NBT (nitroblue tetrazolium chlorid). Inkubace probíhala bez přístupu světla. Následná inkubace proběhla 20 minut ve tmě, v roztoku skládajícího se z 50mM Na-fosfátového pufru (pH 7,8), riboflavinu (8 $mmol.l^{-1}$, rozpuštěn v 96% ethanolu), 0,3% TEMED (tetrámehylethylendiamin) a 5 $mmol.l^{-1}$ EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová). Poté byl gel vystaven světlu nejméně na 15 minut, a světlý signál na tmavém pozadí byl dokumentován na zařízení Chemidoc (Bio-Rad).

3.2.5 Kontrola množství proteinů nanášených na gel

Pro správné porovnání enzymatické aktivity ve vzorcích je nutné zabezpečit, aby bylo na gel nanášeno stejné množství bílkovin pro každý vzorek. Pro kontrolu množství proteinů nanášených na gel jsme extrakty denaturovali přidáním 4 násobně koncentrovaného Laemmliho pufru (v objemu odpovídajícímu 1/3 objemu vzorku; Složení je uvedeno v tabulce č. 8) a 2-merkptoethanol ve finální koncentraci 5% (v/v). Vzorky byly povařeny 5 minut při 95 °C a následně centrifugovány 10 minut, při 15 °C a 13 000 g. Na gel byly nanášeny supernatanty s obsahem 10 μ g proteinů (podle výsledků měření metodou podle Bradforda v části 3.2.3). Separace probíhala na 12% dělicím denaturujícím polyakrylamidovém gelu (složení je uvedeno v tabulce č. 7) a 4% zaostřovacím gelu (složení je uvedeno v tabulce č. 5). Elektroforéza probíhala v elektroforetickém pufru (tabulka č. 6) s přidávkem 1% SDS, při konstantních 180 V při laboratorní teplotě. Gely byly barveny barvivem Colloidal Coomassie Blue (Bio-Rad). Dokumentace probíhala na zařízení Chemidoc (Bio-Rad).

Tabulka č. 7: Chemické složení 12% nativního separačního gelu

Složka	Objem
Destilovaná voda	4 450 μl
1,5 mol.l ⁻¹ Tris-HCl, pH 8,8	2 500 μl
40% akrylamid/bis-akrylamid	3 000 μl
10% APS	50 μl
TEMED (0,3%)	5 μl
Celkový objem (2 gely)	10,005 ml

Tabulka č. 8: Složení čtyřnásobně koncentrovaného Laemmli pufru

Složka	Objem/Navážka
250 mol.l ⁻¹ Tris pH 6.8	2.4 ml
SDS (finální koncentrace 8 % (w/v))	0.8 g
10% glycerol	4 ml
bromofenolová modř (finální koncentrace 0,4 % (w/v))	4 mg
2-mercaptoethanol	0,5 ml
MilliQ destilované vody	3,1 ml
Celkový objem	10 ml

4 VÝSLEDKY

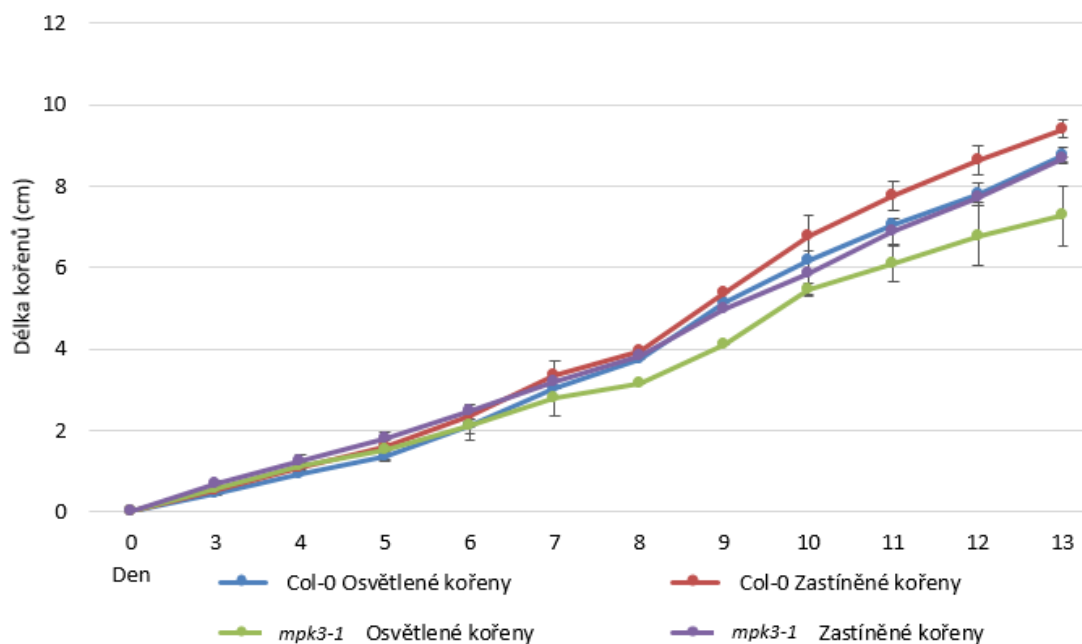
4.1 Fenotypová analýza mutantu huseníčku *mpk3-1* v různých podmínkách osvětlení kořenů

Jedním z cílů této bakalářské práce bylo zjistit vliv deficiencie MPK3 na růst kořene ve dvou odlišných podmínkách osvětlení kořenů. K tomuto experimentu byly použity rostliny mutantu huseníčku *mpk3-1* a rostliny divokého typu Col-0.

4.1.1 Délka primárního kořene

Zjistili jsme, že primární kořeny mutantů *mpk3-1* mají v obou kultivačních podmínkách kratší primární kořeny v porovnání s divokým typem (Obrázek č. 8). Zastínění kořenu má vliv na prodlužování primárního kořene u obou linií (Obrázek č. 8). Rostliny vystavené osvětlení mají kratší primární kořen než ty, které rostly s kořeny zastíněnými, přičemž inhibice růstu vyvolané osvětlením kořenů bylo větší u divokého typu v porovnání s mutantem. Rozdíly mezi liniemi se nejvíce projevovaly po sedmém dni kultivace, přičemž nejvýraznější byly ve 13. den kultivace (Graf č. 1).

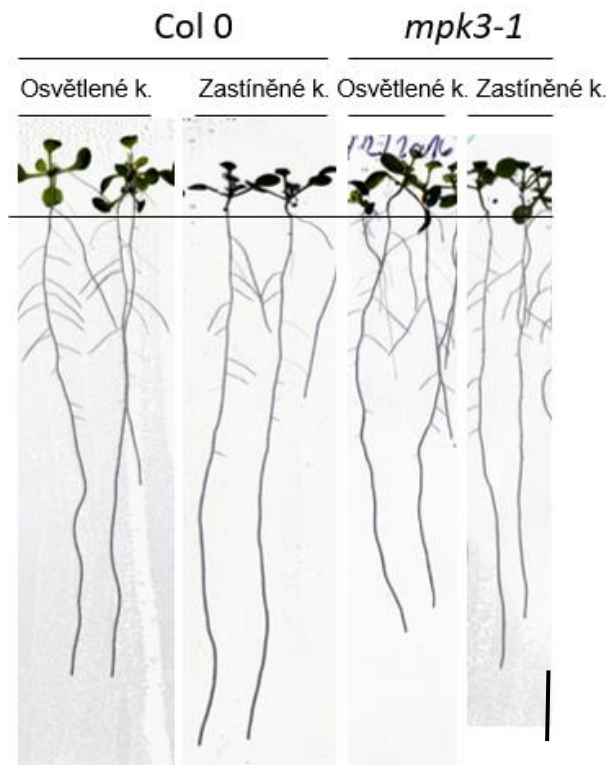
Statistická analýza byla provedena pomocí Studentova t testu při hladině významnosti 0.05 (n=3) a prokázala statisticky významné rozdíly mezi délkou primárních kořenů osvětlených a zastíněných rostlin u obou linií. Pro tuto analýzu byla použita data z 3. až 13. dne kultivace, abychom zjistili hodnotu prodloužení kořene za 10 dní. Rozdíly byly statisticky významné taky pro porovnání osvětlených kořenů divokého typu s mutantem. Stejně tomu bylo taky při zastíněných kořenech (Tabulka č. 9).



Graf č. 1: Délky primárních kořenů huseníčku ekotyp Col-0 a *mpk3-1* mutantu v systému se zastíněnými a osvětlenými kořeny. Chybové úsečky představují standardní odchylky (n=3).

Tabulka č. 9: Statistické porovnání délky primárních kořenů 13 denních rostlin divokého typu Col-0 a mutantů *mpk3-1* rostoucích se zastíněnými a osvětlenými kořeny. Hodnoty v tabulce představují hodnoty P Studentova t testu (n=3) při hladině významnosti $p \leq 0,05$. Za statisticky významný je rozdíl považován při hodnotě $P \leq 0,05$. Zastín. k. = zastíněné kořeny; Osvětl. k. = osvětlené kořeny.

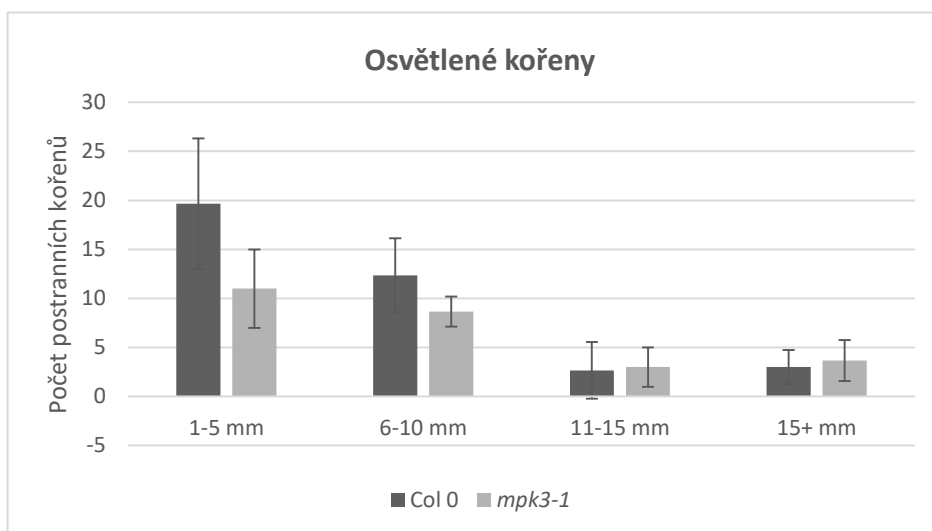
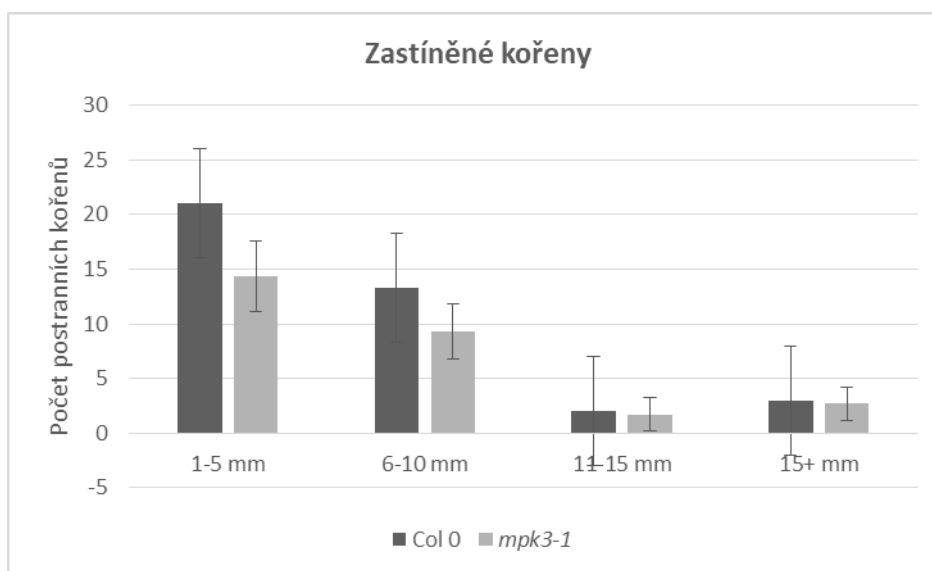
	Col 0 Osvětl. k.	Col 0 Zastín. k.	<i>mpk3-1</i> Osvětl. k.	<i>mpk3-1</i> Zastín. k.
Col 0 Osvětl. k.		0,0322	0,0332	0,0646
Col 0 Zastín. k.	0,0322		0,0276	0,0096
<i>mpk3-1</i> Osvětl. k.	0,0332	0,0276		0,0444
<i>mpk3-1</i> Zastín. k.	0,0646	0,0096	0,0444	



Obrázek č. 8: Reprezentativní obrázky rostlin divokého typu (Col-0) a mutanta *mpk3-1* rostoucích při různých způsobech osvětlení kořene. Obrázky byly dokumentovány ve 13. den kultivace. (k= kořeny). Měřítko představuje 1 cm.

4.1.2 Délka postranních kořenů

Pozorovali jsme také vliv osvětlení kořenů na délku postranních kořenů rostlin divokého typu Col-0 a mutanta *mpk3-1*. Vyhodnocení byla vždy provedena ve 13. den růstu rostlin. Ve 13. den kultivace jsme kvantitativně vyhodnocovali počet postranních kořenů s délkou v rozmezí 1-5 mm, 6-10 mm, 11-15 mm a víc než 15 mm. Zjistili jsme, že mutantní rostliny *mpk3-1* mají méně postranních kořenů o kratších délkách (1-5 mm a 6-10 mm) než kontrolní rostliny Col-0 (Graf č. 2). V *mpk3-1* rostlinách dochází k částečné inhibici tvorby postranních kořenů, v porovnání s Col-0. V případě delších postranních kořenů (11-15 mm a víc než 15 mm) se tato odlišnost neprojevila a počet kořenů se významně nelišil. Při porovnání systémů kultivace, jsme zjistili, že rostliny obou linií kultivovaných v systému s plně zastíněnými kořeny (Graf č. 2 - B), mají počet postranních kořenů mírně zvýšený, v porovnání kultivace rostlin s plně osvětlenými kořeny (Graf č. 2 - A).

A**B**

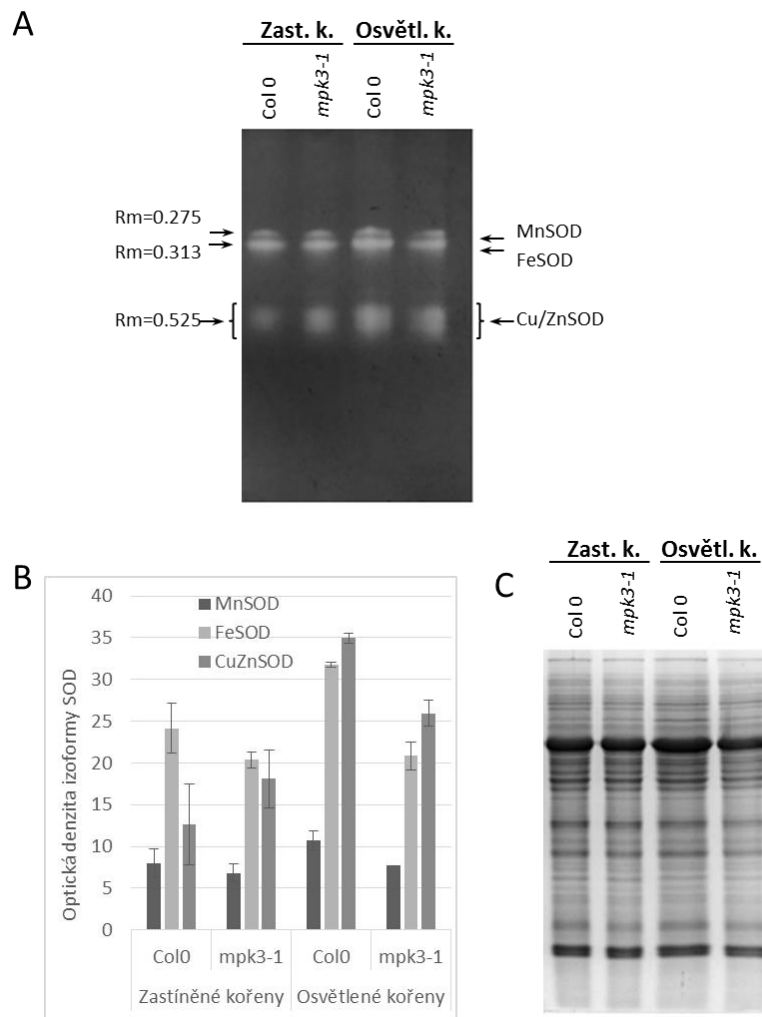
Graf č. 2: Vyhodnocení délky postranních kořenů u rostlin kultivovaných s osvětlenými a zastíněnými kořeny. A – počet postranních kořenů, měřených ve 13. den kultivace, divokého typu Col-0 a mutanta *mpk3-1* v systému s osvětlenými kořeny; B - počet postranních kořenů, měřených ve 13. den kultivace divokého typu Col-0 a mutanta *mpk3-1* kultivovaných v systému se zastíněnými kořeny

4.2 Vliv různých kultivačních podmínek na aktivitu superoxiddismutasy a katalázy u Col-0 a mutantu *mpk3-1*

4.2.1 Superoxiddismutasa

Specifické barvení aktivity SOD na nativních gelech umožňuje rozlišit aktivitu MnSOD, FeSOD a Cu-ZnSOD (Obrázek č. 9) v podobě jednoho pásu pro MnSOD, jednoho pásu pro FeSOD (zahrňuje 3 izoformy FeSOD1, FeSOD2 a FeSOD3) a dvou pásů pro Cu-ZnSOD (Cu-ZnSOD1 a Cu-ZnSOD2; Takáč *et al.*, 2014).

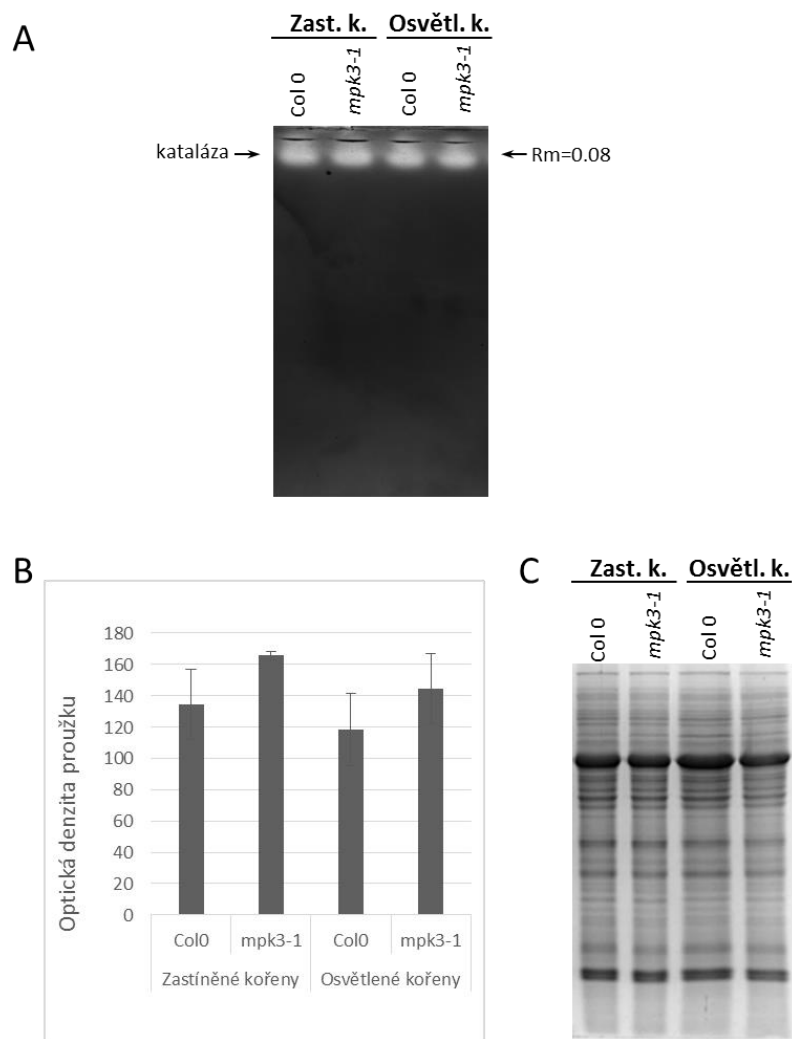
Při pozorování aktivity SOD, jsme zjistili, že celková aktivita SOD (celková denzita bandů v dráze na gelu) je v celých rostlinách silně závislá na světelných podmínkách kořenů u obou linií. Jak MnSOD a FeSOD, tak i CuZnSOD mají v systému s plně osvětlenými kořeny vyšší aktivitu než při zastíněných kořenech (Obrázek č. 9). Mutant *mpk3-1* vykazuje zvýšenou aktivitu všech izoform při kultivaci se zastíněnými kořeny, přičemž nejvíce je zvýšená aktivita Cu-ZnSOD. Při plném osvětlení kořenů jsme mezi divokým typem a *mpk3-1* mutantem zaznamenali mírný pokles v aktivitě všech izoform SOD (Obrázek č. 9).



Obrázek č. 9 – Specifické barvení aktivity izoforem SOD na nativních gelech se vzorky pocházejících z rostlin divokého typu Col-0 a mutantu *mpk3-1* kultivovaných s osvětlenými a zastíněnými kořeny. A – aktivita SOD v nativním polyakrylamidovém gelu; B – graf (průměr ze dvou nativních gelů jedné biologické repliky) znázorňující průměrnou denzitu proužků odpovídající izoformám SOD; C – vizualizace proteinů (ze vzorků použitých pro aktivitu SOD) na polyakrylamidovém gelu - kontrola množství proteinů ve vzorcích. (Zast. k. = zastíněné kořeny; Osvět. k. = osvětlené kořeny; Rm = výsledný retenční faktor)

4.2.2 Kataláza

Pomocí nativní polyakrylamidové elektroforézy jsme detekovali jeden izozym katalázy s Rm-0.08 (Obrázek č. 10), který zahrnuje všechny tři její izoformy (Takáč *et al.*, 2016). Zjistili jsme jenom velmi malé rozdíly (Obrázek č. 10, B) mezi rostlinami se zastíněnými a osvětlenými kořeny. Aktivita katalázy byla mírně zvýšena v *mpk3-1* mutantu v porovnání s Col-0 v obou podmínkách kultivace (Obrázek č. 10).




Obrázek č. 10: Specifické barvení aktivity CAT na nativních gelech se vzorky pocházejících z rostlin divokého typu Col-0 a mutantu *mpk3-1* kultivovaných s osvětlenými a zastíněnými kořeny. A – aktivita katalázy v nativním polyakrylamidovém gelu; B – graf, znázorňující průměrnou denzitu proužků odpovídající izoformám katalázy; C – vizualizace proteinů (ze vzorků použitých pro aktivitu katalázy) na polyakrylamidovém gelu - kontrola množství proteinů ve vzorcích. (Zast. k. = zastíněné kořeny; Osvět. k. = osvětlené kořeny; Rm = výsledný retenční faktor).

4.3 Predikce fosforylace Phot1 a Phot2

Pro návrh možného mechanismu MAPK závislé regulace růstu kořenů v odpovědi na zastínění jsme se rozhodli zjistit, jestli mohou být Phot1 (AT3G45780) nebo Phot2 (AT5G58140) fosforylované MAPK. Predikci fosforylace jsme prováděli pomocí

programu GPS 3.0 (<http://gps.biocuckoo.org/index.php>) a databáze PhosPhAt 4.0 (<http://phosphat.uni-hohenheim.de/>). Výsledky ukázaly, že Phot1 a Phot2 obsahují ve své aminokyselinové sekvenci aminokyseliny, které mohou být fosforylované (Obrázek č. 11, 12). V několika případech byla tato fosforylace také experimentálně dokázána. Predikce pravděpodobné kinázy pro fosforylaci Phot1 pomocí GSP3.0 vedla k zjištění, že MAPK jsou vysoce pravděpodobnými kinázami (na základě skóre) pro její fosforylaci na třech tyrozinech (Tabulka č. 10 a 11). Fosforylace příslušných fosfopeptidů nebyla doposud experimentálně dokázána (PhosPhat). MAPK jsou kandidátními MAPK také pro fosforylaci Phot2 (Tabulka č. 11), a to na třech tyrozinech a jednom serinu. Fosforylace serinu na pozici 9 byla experimentálně dokázána po vystavení rostlin působení ABA (k. abscisová) a Phot1 slouží jako substrát pro Sacharózu nefermentující protein kinázu 2s (SnRK2s), což je hlavní komponent pro signální dráhu abscisové kyseliny (Wang *et al.*, 2013). Fosforlace na S9 byla také potvrzena při zkoumání fosfoproteomu chloroplastů (Reiland *et al.*, 2009). Experimentální důkazy také existují pro fosforylaci tyrozinu na pozicích 303 a 305 v huseníčku (Roitinger *et al.*, 2015).




Species: Arabidopsis thaliana
 Protein: AT3G45780.1
 Description: PHOT1, NPH1, JK224, RPT1; phototropin 1
 MapMan: 30.30.1.1 signaling.kinase.cytoplasmatic.kinase.AGC
 Substrate for Kinase: AT3G45780.1 - PHOT1, NPH1, JK224, RPT1; phototropin 1
 AT5G58140.1 - PHOT2, NPL1; phototropin 2

Sequence

```

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50
1...50 M E P I E K P S I K P S S R T L P R D T R G S L E V F N P S T Q L T I R P D N P V F R P E P P A W Q N
51...100 L S D P R G T S P Q P R P Q Q E P A P S N P V R S D Q E I A V T T S W M A L K D P S P E T I S K K T
101...150 I T A E K P Q K S A V A A E Q R A A E W G L V L K T D T K T G K P Q G V G V R N S G G T E N D P N G
151...200 K K T I T S Q R N S Q N S C R S S G E M S D G D V P G G R S G I P R V S E D L K D A L S T F Q Q T F V
201...250 V S D A T K P D Y P I M Y A S A G F F N M T G Y T S K E V V G R N C R F L Q G S G T D A D E L A K I
251...300 R E T L A A G N N Y C G R I L N Y K K D G T S F W N L L T I A P I K D E S G K V L K F I G M Q V E V
301...350 S K H T E G A K E K A L R P N G L P E S L I R Y D A R Q K D M A T N S V T E L V E A V K R P R A L S
351...400 E S T N L H P E M T K S E S D E L P K K P A R R M S E N V V P S G R R N S G G G R R N S M Q R I N E
401...450 I P E K K S R K S L S F M G I K K S E S L D E S I D D G F I E Y G E E D D E I S D R D E R P E S
451...500 V D D K V R Q K E M R K G I D L A T T L E R I E K N F V I T D P R L P D N P I I F A S D S F L E L T
501...550 E Y S R E E I L G R N C R F L Q G P E T D L T V K K I R N A I D N Q T E V T V Q L I N Y T K S G K
551...600 K F W N I F H L Q P M R D Q K G E V Q Y F I G V Q L D G S K H V E P V R N V I E E T A V K E G E D L
601...650 V K K T I A V N I D E A V R E L P D A N M T P E D L W A N H S K V V H C K P H R K D S P P W I A I Q K
651...700 V L E S G E P I G L K H F K P V K P L G S G D T G S V H L V E L V G T D Q L F A M K A M D K A V M L
701...750 N R N K V H R A R A E R E I L D L D H P L F A L Y A S F Q T K T H I C L I L T D Y Y P G G E L F M
751...800 L L D R Q P R K V L K E D A V R F Y A A Q V V V A L E Y L H C Q G I I Y R D L K P E N V L I Q G N G
801...850 D I S L S D F D L S C L T S C K P Q L L I P S I D E K K K K Q Q K S Q Q T P I F M A E M P R A S N
851...900 S F V G T E E Y I A P E I I S G A G H T S A V D W W A L G I L M Y E M L Y G Y T P F R G K T R Q K T
901...950 F T N V L Q K D L K F P A S I P A S L Q V K Q L I F R L L Q R D P K K R L G C F E G A N E V K Q H S
951...1000 F F K G I N W A L I R C T N P P E L E T P I F S G E A E N G E K V V D P E L E D L Q T N V F
  
```

Obrázek č. 11: Aminokyselinová sekvence Fototropinu 1 s vyznačenými místy pravděpodobné fosforylace, provedená v programu PhosPhAt 4.0 - <http://phosphat.uni-hohenheim.de>



Species: Arabidopsis thaliana
 Protein: AT5G58140.1
 Description: PHOT2, NPL1; phototropin 2
 MapMan: 30.30.1.1 signaling.kinase.cytoplasmatic.kinase.AGC
 Substrate for Kinase: AT1G25490.1 - RCN1, REGA, ATB BETA BETA, EER1; ARM repeat superfamily protein
 AT3G45780.1 - PHOT1, NPH1, JK224, RPT1; phototropin 1
 AT5G58140.1 - PHOT2, NPL1; phototropin 2

Sequence

```

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50
1...50 M E R P R A P P S P L N D A E S L S E R R S L E I F N P S S G K E I H G S T S S S S K P P L D G N N
51...100 K G S S S K W M E F Q D S A K I T E R I A E W G L S A V K P D S G D D G I S F K L S S E V E R S K N
101...150 M S R R S S E E S T S S E S G A E P R V S Q E L K T A L S T L Q Q T I F V S D A T Q P H C P I V Y A
151...200 S S G F F T M T G Y S S K E I V G R N C R F L Q G P D T D K N E V A K I R D C V K N G K S Y C G R L
201...250 L N Y K K D G T P F W N L L T V T P I K D D Q G N T I K F I G M Q V E V S K Y T E G V N D K A L R P
251...300 N G L S K S L I R Y D A R Q K E K A L D S I T E V V Q T I R H R K S Q V Q E S V S N D T M V K P D S
301...350 S T T P T P G R Q T R Q S D E A S K S E R T P G R V S T P I G S K L K S S N R R H E D L L R M E P E
351...400 E L M L S I E V I G Q R D S W D L S D R E R D I R Q G T D L A T T L E R I E K N F V I S D P R L P D
401...450 N P I T F A S D S F L E L T E Y S R E E I L G R N C R F L Q G P E T D Q A T V Q K I R D A I R D Q R
451...500 E I T V Q L I N Y T K S G K K F W N L F H L Q P M R D Q K G E L Q Y F I G V Q L D G S D H V E P L Q
501...550 N R L S E R T E M Q S S K L V K A T A T N V D E A V R E L P D A N T R P E D L W A A H S K P V Y P L
551...600 P H N K E S T S W K A I K K I Q A S G E T V G L H H F K P I K P L G S G D T G S V H L V E L K G T G
601...650 E L Y A M K A M E K T M M L N R N K A H R A C I E R E I I S L L D H P F L P T L Y A S F Q T S T H V
651...700 C L I T D F C P G G E L F A L L D R Q P M K I L T E D S A R F Y A A E V V I G L E Y L H C L G I V Y
701...750 R D L K P E N I L L K K D G H I V L A D F D L S F M T T C T P Q L I I P A A P S K R R R S K S Q P L
751...800 P T F V A E P S T Q S N S F V G T E E Y I A P E I I T G A G H T S A I D W W A L G I L L Y E M L Y G
801...850 R T P F R G K N R Q S T F A N I L H K D L T F P S S I P V S L V G R Q L I N T L L N R D P S S R L G
851...900 S K G G A N E I K Q H A F F R G I N W P L I R G M S P P P L D A P L S I E K D P N A K D I K W E D
901...950 D G V L V N S T D L D I D L F
  
```

Obrázek č. 12: Aminokyselinová sekvence Fototropinu 2 s vyznačenými místy pravděpodobné fosforylace, provedená v programu PhosPhAt 4.0 - <http://phosphat.uni-hohenheim.de>

Tabulka č. 10: Predikce pravděpodobné kinázy pro fosforylaci Fototropinu 1 s fosforylací na serinu (S) nebo tyrosinu (T), která byla provedena pomocí GPS 3.0 (<http://gps.biocuckoo.org/index.php>)

Pozice	Kód	Kináza	Peptid	Skóre	Práh
851	S	Atypical/PDHK	EPMRASNSFVGTEEY	56.833	3.075
851	S	AGC/PDK1	EPMRASNSFVGTEEY	45.463	2.257
621	T	CMGC/MAPK	ELPDANMTPEDLWAN	39.111	35.046
970	T	CMGC/MAPK	TNPPELETPIFSGEA	36.48	35.046
838	T	CMGC/MAPK	KQKKSQQTPIFMAEP	35.802	35.046
851	S	STE	EPMRASNSFVGTEEY	20.855	1.285
410	S	CAMK/CAMKL	EKKSRSLSFMGIK	19.756	8.942
287	S	Other/PEK	IAPIKDESGKVLKFI	15	9.43

Tabulka č. 11: Predikce pravděpodobné kinázy pro fosforylaci Fototropinu 2 s fosforylací na serinu (S), tyrosinu (T) nebo threonin (Y), která byla provedena pomocí GPS 3.0 (<http://gps.biocuckoo.org/index.php>)

Pozice	Kód	Kináza	Peptid	Skóre	Práh
763	S	Atypical/PDHK	EPSTQSNFVGTEEY	59.405	3.075
730	T	CMGC/MAPK	LSFMTTCTPQLIIPA	46.705	35.046
763	S	AGC/PDK1	EPSTQSNFVGTEEY	45.593	2.257
217	T	CMGC/MAPK	FWNLLTVTIKDDQG	45.101	35.046
9	S	CMGC/MAPK	ERPRAPP SPLNDAES	45.086	35.046
305	T	CMGC/MAPK	PDSSTTP PGRQTRQ	41.661	35.046
303	T	CMGC/MAPK	VKPDSS TPTPGRQT	37.769	35.046
106	S	CAMK/CAMKL	KNMSRRS SEESTSSE	23.419	8.942
763	S	STE	EPSTQSNFVGTEEY	22.912	1.285
313	S	Other/PEK	PGRQTRQ SDEASKSF	17.5	9.43
105	S	CMGC/CK2	SKNMSRRS SEESTSS	14.853	9.894
504	S	CAMK/CAMKL	EPLQNRL SERTEMQS	13.664	8.942
368	S	CMGC/CK2	QRDSWDL SDRERDIR	13.61	9.894
763	S	CAMK/CAMKL	EPSTQSNFVGTEEY	12.917	8.942
106	S	CMGC/CK2	KNMSRRS SEESTSSE	12.548	9.894
16	S	CK1/CK1	SPLNDAE SLSERRSL	12.377	6.263
763	S	STE/STE-Unique	EPSTQSNFVGTEEY	12.143	7.543
394	S	TK	IEKNFVIDPRLPDN	12	11.092
799	Y	Other/WEE	ILLYEMLYGRTPFRG	12	12

5 DISKUZE

Fenotypové analýzy ukázaly, že chybějící exprese *MPK3* v *mpk3-1* mutantu huseníčku vede ke snížení délky primárního kořene a také k mírnému snížení počtu postranních kořenů v porovnání s divokým typem. Je známo, že MAPK mají důležitou roli ve vývoji rostlin (Komis *et al.*, 2018). Zásadním způsobem ovlivňují dělení a prodlužování buněk a to se děje přes regulaci mikrotubulárního cytoskeletu fosforylací regulačních proteinů jako MAP65-1 (Beck *et al.*, 2010 a 2011). MPK3 pokrývají v buňce celou škálu funkcí. Jedná se například o vývoj vajíček rostlin a rostlinných rozmnožovacích orgánů (Wang *et al.*, 2008), udržení redoxní homeostázy (Nakagami *et al.*, 2006), poddílí se na regulaci morfologie listů u huseníčku (Jia *et al.*, 2016), otevírání a zavírání průduchů v odpovědi na ABA a H₂O₂ (viz kapitola 2.2.3). Naše výsledky poukazují na možnou roli MPK3 v prodlužování a dělení kořenových buněk, přičemž fenotypově se tento efekt neprojevuje do takové míry, jako u mutantů *mpk4* (Beck *et al.*, 2010) a *mpk6-2* (Müller *et al.*, 2010).

Zjistili jsme, že zastínění kořenů má viditelný vliv na fenotyp kořene huseníčku. Osvětlení celých rostlin způsobilo, v porovnání s kultivací se zastíněnými kořeny, zpomalení růstu primárních kořenů a mírné zvýšení počtu postranních kořenů. Naše výsledky se shodují s Xu *et al.*, (2011) kde použili podobný systém kultivace rostlin huseníčku ekotypu Col-0. Pozorovali delší primární kořeny rostlin, které rostly se zastíněnými kořeny. Dále hustota a délka postranních kořenů byla vyšší v systému s kořeny osvětlenými.

Naše výsledky dokazují, že růst primárního kořene a tvorba postranních kořenů jsou citlivé na osvětlení kořenů, což je patrně způsobeno fotoreceptory. Vnímání světla fotoreceptory má negativní vliv na délku primárního kořene a pozitivní vliv na tvorbu postranních kořenů. Tyto efekty připomínají fenotyp rostlin s poškozeným auxinovým transportem (Blilou *et al.*, 2005), což je v souladu s dříve publikovanými výsledky (Marchant *et al.*, 1999). Z hlediska tropizmů kořene, včetně fototropizmu, má osobitou roli tzv. přechodná zóna kořene, která se vyznačuje specifickou dynamikou a organizací cytoskeletálních struktur. Tato zóna je také důležitá pro morfogenezi a prodlužování buněk (Baluška and Mancuso, 2013). Je známo, že *PHOT1* je nejvíc exprimován právě v přechodné zóně, kde má roli ve vnímání modrého světla (Wang *et al.*, 2008). V nedávné studii bylo publikováno, že reorientace mikrotubulů

v podmínkách modrého světla je kontrolována PHOT1, který reguluje mikrotubuly štěpící protein KATANIN1 (Lindeboom *et al.*, 2013). Je proto možné, že podobný mechanismus nastává také po osvětlení kořenů, kdy aktivace Phot1 způsobuje reorientaci mikrotubulů a následní zpomalení růstu primárního kořene.

Změny v růstu primárního kořene v závislosti od jeho osvětlení budou výsledným efektem více faktorů. Kryptochromy jsou fotoreceptory ovlivňující růst rostlin. Kryptochromy s expresí v jádře mají inhibiční účinek na růst primárních kořenů (Wu and Spalding, 2007). Po dopadu světla na kořeny dojde k absorpci fotonu na N-konec proteinu, konkrétně flavin vázající doménu. Dojde ke změně konformace a protein se stává aktivním, což by mohlo být vysvětlení, proč jsou zastíněné primární kořeny delší.

Naše výsledky naznačují, že určitou roli v percepci světla v kořenech může mít také *MPK3*. Inhibice růstu primárního kořene úplně osvětlených rostlin byla výraznější u *mpk3-1* mutanta v porovnání s divokým typem. Dá se předpokládat, že *MPK3* zesiluje vnímání světla fotoreceptory na kořenech huseníčku. Je zajímavé, že transkriptomické údaje (Frei dit Frey *et al.*, 2014) ukazují na odlišnou expresi několika genů důležitých pro vnímání světla v mutantu *mpk3* (v celých semenáčcích) v porovnání s divokým typem. Tyto geny mají v mutantních rostlinách sníženou nebo nulovou expresi. NPH3 (NON-PHOTOTROPIC HYPOCOTYL 3) a RPT2 (ROOT PHOTOTROPISM 2) jsou proteiny, které mají funkci zprostředkovávat fototropismus *PHOT1*. RPT2 reguluje fosforylaci NPH3 a je nezbytnou součástí fototropismu (Zhao *et al.*, 2018). Tyto poznatky naznačují možný vztah mezi fotoreceptorem fototropin a MPK3 v kořenech huseníčku. Na základě bioinformatické analýzy fosforylace Phot1 a Phot2 se dá předpokládat možná fosforylace těchto fotoreceptorů MAPK, ale tuto hypotézu je nutné potvrdit. Také je pravděpodobný opačný mechanismus, čili regulace (například fosforylace) MPK3 pomocí PHOT1. Podobně dochází také k fosforylaci jiné kinázy, a to BLUS1 (Takemiya *et al.*, 2013)

Dalším důležitým výsledkem našich experimentů byla závislost aktivity SOD v celé rostlině na podmínkách osvětlení kořenů. Vliv osvětlení kořenů lze pozorovat na všech třech izoformách antioxidantního enzymu SOD. Všechny tři izoformy mají v systému s plně osvětlenými kořeny vyšší aktivitu než při zastíněných kořenech. *mpk3-1* rostliny mají zvýšenou aktivitu všech tří izoform v případě zastíněných kořenů, přičemž nejvíce je zvýšená aktivita Cu-ZnSOD. Při plném osvětlení kořenů jsme mezi Col-0 a *mpk3-1* mutantem zaznamenali mírný pokles v aktivitě všech izoform SOD.

Zvýšení aktivity těchto enzymů je způsobeno zcela nefyziologickým osvětlením kořenů. V případě dopadu světla na kořeny se rostlina ocitá ve stresové situaci a dochází k produkci RKR (Yokawa *et al.*, 2011). K tvorbě RKR stačí 10 vteřin osvětlení modrým světlem. RKR představují velmi důležitou signální molekulu pro vnímání světla kořeny (Yokawa *et al.*, 2011). Naše výsledky naznačují, že tato zvýšená hladina RKR se odráží především na zvýšené aktivitě Cu-ZnSOD, což vede k udržení RKR ve fyziologických koncentracích. Na druhé straně, zvýšená tvorba RKR může mít také podíl na pomalejším růstu úplně osvětlených kořenů, jako důsledek jejich poškozujících účinků. Je zajímavé, že osvětlení kořenů nemělo výraznější efekt na aktivitu katalázy, z čehož se dá usoudit, že existují jiné mechanismy, které jsou zodpovědné za odbourávání H_2O_2 vzniklého dismutací superoxidu.

Enzymatická antioxidační obrana je zčásti regulována MAPK signalizací, jako to bylo například publikováno pro solný stres (Pitzschke *et al.*, 2014), nebo ABA (Zhang *et al.*, 2014). Podle našich výsledků je pro regulaci aktivity SOD a zejména Cu-ZnSOD důležitá také MPK3. Zjistily jsme, že vliv MPK3 na aktivitu SOD je závislý na podmínkách osvětlení kořenů. Osvětlení kořenů a následná aktivace fotoreceptorů utlmuje negativní vliv MPK3 na Cu-ZnSOD.

6 ZÁVĚR

V této bakalářské práci jsme pozorovali vliv osvětlení kořenů na mutantní rostliny *mpk3-1* a kontrolní Col-0 huseníčku rolního, které jsme podrobili fenotypové analýze kořenů. Pozorovali jsme délku primárního kořene a počet a délku kořenů postranních. Dále jsme se zabývali vlivem osvětlení kořenů na aktivitu antioxidantních enzymů superoxididismutasy a katalázy na tyto rostliny. Také jsme sledovali rozdíl v aktivitě těchto enzymů u MAP kinázového mutantu *mpk3-1*.

Výsledky našich experimentů ukazují, že podmínky osvětlení kořenů mají veliký vliv nejen na fenotyp rostlin, ale také na aktivitu superoxididismutasy. Zjistili jsme také, že MAPK signalizace přispívá k odpovědi rostlin na osvětlení kořenů a MPK3 v tom hraje významnou roli. Je nutné provádět další výzkum pro detailní prozkoumání těchto jevů, abychom mohli odstranit rozdíly, které vznikají v důsledku odlišných podmínek kultivace.

Podářilo se nám objevit nové poznatky ohledně vlivu osvětlení celých rostlin při jejich kultivaci na aktivitu antioxidantních enzymů i fenotyp.

Naše výsledky ukazují na nutnost co nejpřesněji napodobovat podmínky růstu rostlin v přírodě, abychom předešli vedlejším účinkům pěstování rostlin *in vitro*.

7 CITACE

- Alscher R. G., Erturk N., Heath L. S., (2002): Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J Exp Bot.* **53**(372):1331-41
- Andreasson E., Ellis B. (2010): Convergence and specificity in the Arabidopsis MAPK nexus. *Trends Plant Sci.* **15**, 106–113
- Apel K., Hirt H. (2004): Reactive oxygen species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annu. Rev. Plant. Biol.* **55**,373-99
- Arisz S. A., van Wijk R., Roels W., Zhu J. K., Haring M. A., Munnik T. (2013): Rapid phosphatidic acid accumulation in response to low temperature stress in Arabidopsis is generated through diacylglycerol kinase. *Front Plant Sci* **4**,1.
- Asada K., Kiso K., Yoshikawa K. (1974): Univalent reduction of molecular oxygen by spinach chloroplasts on illumination. *J Biol Chem* **249**, 2175–2181.
- Asai T., Tena G., Plotnikova J., Willmann M. R., Wan-Ling Chiu, Lourdes Gomez-Gomez, Boller T., Ausubel F. M., Sheen J. (2002): MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature* **415**, 977–983
- Baluška F., Mancuso S. (2013): Root apex transition zone as oscillatory zone. *Front Plant Sci* **4**:354
- Bannister W. H., Bannister J. V., Barra D., Bond J., Bossa F. (1991): Evolutionary aspects of superoxide dismutase: the copper/zinc enzyme. *Free Radical Research Communications* **12-13**, 349-361.
- Beck M., Komis G., Muller 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. *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 Phytol.* **189**, 1069–1083.
- Bethke G., Unthan T., Uhrig J. F., Pöschl Y., Gust A. A., Scheel D., Lee J. (2009): Flg22 regulates the release of an ethylene response factor substrate from MAP kinase 6 in Arabidopsis thaliana via ethylene signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 8067–8072

- Besteiro G. M. A, Bartels S., Albert A., Ulm R.. (2011): Arabidopsis MAP kinase phosphatase 1 and its target MAP kinases 3 and 6 antagonistically determine UV-B stress tolerance, independent of the UVR8 photoreceptor pathway. *Plant J.* **68**, 727–737
- Besteiro G. M. A., and Roman Ulm R. (2013): ATR and MKP1 play distinct roles in response to UV-B stress in Arabidopsis. *The Plant Journal* **73**, 1034–1043
- Blilou I, Xu J., Wildwater M., Willemsen V., Paponov I., Friml J., Heidstra R., Aida M., Palme K., Scheres B. (2005): The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots. *Nature* **433**(7021):39-44.
- Boccalandro H. E., De Simone S. N., Bergmann-Honsberger A., Schepens I., Fankhauser C., Casal J. J. (2008): PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE1 regulates root phototropism and gravitropism. *Plant Physiol.* **146**(1):108-15
- Bordo D., Djinoovic K., Bolognesi M., (1994): Conserved patterns in the Cu,Zn superoxide dismutase family. *Journal of Molecular Biology* **238**, 366-361.
- Bowler C., Van Camo W., Van Montagu M., Inzé D., (1994): Superoxide dismutase in plants. *Critical reviews in Plant Science* **13**, 199-218.
- Bögre L., Henriques, R., Magyar, Z. (2013): TOR tour to auxin. *EMBO J.* **32**, 1069-1071.
- Briggs W. R., Christie J. M. (2002): Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends Plant Sci.* **7**(5):204-10
- Briggs W. R. and Lin C. T. (2012): Photomorphogenesis – from one photoreceptor to 14: 40 years of progress. *Mol. Plant* **3**, 531–532.
- Briggs W. R. (2014): Phototropism: some history, some puzzles, and a look ahead. *Plant Physiol.* **164**, 13–23.
- Brock A.K., Willmann R., Kolb D., Grefen L., Lajunen H.M., Bethke G., Lee J., Nurnberger T., Gust A.A. (2010): The Arabidopsis mitogen-activated protein kinase phosphatase PP2C5 affects seed germination, stomatal aperture, and abscisic acid-inducible gene expression. *Plant Physiol.* **153**, 1098–1111
- Bush S. M. and Krysan P. J. (2007): Mutational evidence that the Arabidopsis MAP kinase MPK6 is involved in anther, inflorescence, and embryo development. *J. Exp. Bot.* **58**, 2181-2191.
- Carey L.H. Hord, Yu-Jin Suna, Lynn J. Pillitterie, Keiko U. Toriie, Huachun Wang, Shuqun Zhangg Hong Maa (2008): Regulation of Arabidopsis Early Anther Development by the

Mitogen-Activated Protein Kinases, MPK3 and MPK6, and the ERECTA and Related Receptor-Like Kinases. *Molecular Plant* **1**(4), 645–658

Chaves I., Pokorný R., Byrdin M., Hoang N., Ritz T., Brettel K., Essen L. O., van der Horst G. T., Batschauer A., Ahmad M. (2011): The cryptochromes: blue light photoreceptors in plants and animals. *Annu Rev Plant Biol.* **62**:335-64

Chinchilla D., Zipfel C., Robatzek S., Kemmerling B., Nurnberger T., Jones J. D., Felix G. and Boller T. (2007): A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* **448**, 497–500.

Cho S. K., Larue C. T., Chevalier D., Wang H., Jinn T. L., Zhang S., Walker J. C. (2008): Regulation of floral organ abscission in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA.* **105**:15629–15634

Christie J. M. (2007): Phototropin blue – light receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* **58**, 21–45.

Conroy Ching J., Gao Y., Wang X., Rampitsch C., Xing T. (2013): Knockout of AtMKK1 enhances salt tolerance and modifies metabolic activities in *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav.* **8**(5): e24206.

Corpas F., Palma P. M., Sandalio L. M., Lopez-Huertas E., Romero-Puertas M. C., Barroso J. B., Del Río L. A. (1999): Purification of catalase from pea leaf peroxisomes: identification of five different isoforms. *Free Radic Res* **31**, 235–241

Correll M. J. and Kiss J. Z. (2005): The roles of phytochromes in elongation and gravitropism of roots. *Plant Cell Physiol.* **46**, 317–323.

Csiszár J., Gallé Á., Horváth E., Dancsó P., Gombos M., Váry Z., Erdei L., Györgyey J., Tari I. (2012): Different peroxidase activities and expression of abiotic stress-related peroxidases in apical root segments of wheat genotypes with different drought stress tolerance under osmotic stress. *Plant Physiol Biochem* **52**, 119–29.

Deeks M. J., Hussey P. J. (2005): Arp2/3 and SCAR: plants move to the fore. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **6**(12):954-64.

Demarsy E., Schepens I., Okajima K., Hersch M., Bergmann S., Christie J., Shimazaki K., Tokutomi S., Fankhauser C. (2012): Phytochrome Kinase Substrate 4 is phosphorylated by the phototropin 1 photoreceptor. *EMBO J.* **31**(16):3457-67

Du Y., Wang P., Chen J., Song C. (2008): Comprehensive Functional Analysis of the Catalase Gene Family in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Integrative Plant Biology.* **50**(10): 1318–1326

- Dugas D. V., Bartel B. (2008): Sucrose induction of Arabidopsis miR398 represses two Cu/Zn superoxide dismutases. *Plant Mol. Biol.* **67**, 403–417.
- Dyachok J., Zhu L., Liao F., He J., Huq E. and Blancaflor E. B. (2011): SCAR mediates light-induced root elongation in Arabidopsis through photoreceptors and proteasomes. *Plant Cell* **23**, 3610–3626.
- Evrard A., Kumar M., Lecourieux D., Lucks J., von Koskull-Döring P., Hirt H. (2013): Regulation of the heat stress response in Arabidopsis by MPK6-targeted phosphorylation of the heat stress factor HsfA2. *PeerJ* **1**, e59
- Edwards R., Dixon D. P., (2009): Selective binding of glutathione conjugates of fatty acid derivatives by plant glutathione transferases. *J Biol Chem* **284**, 21249–56.
- Engelhard Ch., Wang X., Robles D., Moldt J., Essen L. O., Batschauer A., Bittl R., Ahmad M. (2014): Cellular Metabolites Enhance the Light Sensitivity of Arabidopsis Cryptochrome through Alternate Electron Transfer Pathways. *The Plant Cell*, **26**, 4519–4531
- Foyer C. H., Noctor G. (2005): Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses, *Plant Cell* **17**, 1866-1875.
- Frei dit Frey N., Garcia A. V., Bigeard J., Zaag R., Bueso E., Garmier M., Pateyron S., de Tauzia-Moreau M. L., Brunaud V., Balzergue S., Colcombet J., Aubourg S., Martin-Magniette M. L., Hirt H. (2014): Functional analysis of Arabidopsis immune-related MAPKs uncovers a role for MPK3 as negative regulator of inducible defences. *Genome Biol.* **15**(6):R87
- Galen C., Huddle J., Liscum E. (2004): An experimental test of the adaptive evolution of phototropins: Blue-light photoreceptors controlling phototropism in Arabidopsis thaliana. *Evolution.* **588**(1):515–523
- Galen C., Rabenold J. J., Liscum E. (2007): Functional ecology of a blue light photoreceptor: effects of phototropin-1 on root growth enhance drought tolerance in Arabidopsis thaliana. *New Phytol.* **1738**(1):91–99
- Gao F., Chen J., Ma T., Li H., Wang N., Li Z., Zhang Z., Zhou Y. (2014): The glutathione peroxidase gene family in *Thellungiella salsuginea*: genome-wide identification, classification, and gene and protein expression analysis under stress conditions. *Int J Mol Sci*, **15**, 3319–35.
- Gara L. D., Pinto M. C., Moliterni V. M. C., D'Egidio M. G. (2003): Redox regulation and storage processes during maturation in kernels of *Triticum durum*, *J. Exp. Bot.* **54**, 249–258.

- Gelderen K., Kang C., Pierik R. (2018): Light signaling, root development and plasticity. *Plant Physiology Preview*. **176**(2):1049-1060
- Gill S. S., Tuteja N. (2010): Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **48**, 909-930
- Glazebrook, J. (2005): Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **43**, 205–227.
- Gomez-Gomez L. and Boller T. (2000): FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. *Mol. Cell* **5**, 1003–1011.
- Halliwell B., Gutteridge J. M. C. (1989): Free Radicals in Biology and Medicine, *Clarendon Press, Oxford* **12**(1):93-5.
- Han L. Li G. J., Yang K. Y., Mao G., Wang R., Liu Y., Zhang S.(2010): Mitogen-activated protein kinase 3 and 6 regulate Botrytis cinerea-induced ethylene production in Arabidopsis. *Plant J.* **64**, 114–127
- Hare P. D., Cress W. A. (1997): Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants, *Plant Growth Regul.* **21**, 79-102.
- Heese A., Hann D. R., Gimenez-Ibanez S., Jones A. M., He K., Li J., Schroeder J. I., Peck S. C. and Rathjen J. P. (2007): The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 12217–12222.
- Hollander-Czytko H., Grabowski J., Sandorf I., Weckermann K., Weiler E. W. (2005): Tocopherol content and activities of tyrosine aminotransferase and cystine lyase in Arabidopsis under stress conditions, *J. Plant Physiol.* **162**, 767-770.
- Hong Y., Zhang W., Wang X. (2010): Phospholipase D and phosphatidic acid signalling in plant response to drought and salinity. *Plant Cell Environ* **33**, 627-35.
- Huang G. T., Ma S. L., Bai L. P., Zhang L., Ma H., Jia P., Liu J., Zhong M., Guo Z. F.(2012): Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants. *Mol Biol Reports* **39**, 969-87.
- Hughes J. (2013): Phytochrome cytoplasmic signaling. *Annu Rev Plant Biol.* **64**:377-402
- Inupakutika A. M., Sengupta S., Devireddy R. A., Azad K. R. and Mittler R., (2016): The evolution of reactive oxygen species metabolism. *Journal of Experimental Botany.* **67**(21):5933-5943

- Jeong J., Choi G. (2013): Phytochrome – interacting factors have both shared and distinct biological roles. *Mol. Cells* **35**, 371–380.
- Jimenez A., Hernandez J. A., Pastori G., Rio L. A., Sevilla F. (1998): Role of the ascorbate-glutathione cycle of mitochondria and peroxisomes in the senescence of pea leaves, *Plant Physiol.* **118**, 1327-1335.
- Kamal-Eldin A., Appelqvist L. A. (1996): The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols, *Lipids* **31**, 671-701.
- Khan M. N., Siddiqui M. H., Mohammad F., Naeem M. (2012): Interactive role of nitric oxide and calcium chloride in enhancing tolerance to salt stress. *Nitric Oxide* **27**, 210-8.
- Kim J. Y., Song J. T., Seo H. S. (2017): COP1 regulates plant growth and development in response to light at the post-translational level. *J Exp Bot.* **13;68**(17):4737-4748
- Kim K., Kim L. H., Lee K. Y., Rhee S. G., Stadtman E. R. (1988): The isolation and purification of a specific protector protein which inhibits enzyme inactivation by a thiol/Fe(III)/O₂ mixed-function oxidation system, *J. Biol. Chem.* **263**, 4704–4711
- Kiss J. Z., Correll M. J., Mullen J. L., Hangarter R. P. and Edelmann R. E. (2003): Root phototropism: how light and gravity interact in shaping plant form. *Gravit. Space Biol. Bull.* **16**, 55–60.
- Kliebenstein D. J., Monde R., Last R. L., (1998): Superoxide dismutase in *Arabidopsis*: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization. *Plant Physiology.* **188**, 637-650.
- Knox J. P., Dodge A. D (1985): Singlet oxygen and plants. *Phytochemistry* **24**, 889-896.
- 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**:6.1–6.29
- Koua D., Cerutti L., Falquet L., Sigrist C. J. A., Theiler G., Hulo N., Dunand C. (2009): PeroxiBase: a database with new tools for peroxidase family classification. *Nucleic Acids Res* **37**: D261–6
- Kovtun Y., Chiu W. L., Tena G., Sheen J., (2000): Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**(6): 2940-5.
- Krysan P. J., Jester P. J., Gottwald J. R., Sussman M. (2002): R An Arabidopsis mitogen-activated protein kinase kinase kinase gene family encodes essential positive regulators of cytokinesis. *Plant Cell.* **14**, 1109–1120.

- Lampard, G.R. Macalister C. A., Bergmann D. C. (2008): Arabidopsis stomatal initiation is controlled by MAPK-mediated regulation of the bHLH SPEECHLESS. *Science* **322**, 1113–1116
- Lamparter T. (2004): Evolution of cyanobacterial and plant phytochromes. *FEBS Lett.* **573**, 1–5.
- Lang J., Genot B., Hirt H., Colcombet J. (2017): Constitutive activity of the Arabidopsis MAP Kinase 3 confers resistance to *Pseudomonas syringae* and drives robust immune responses. *Plant Signal Behav.* **12**(8), e1356533
- Laohavisit A., Colaco R., Davies J. (2012): Cytosolic Ca(2+) determinations in studying plant responses to salinity and oxidative stress. *Methods Mol Biol* **913**, 163-71.
- Larue T. C., Chevalier D., Wang H., Jinn T. L., Zhang S., Walker J. C. (2008): Regulation of floral organ abscission in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**(40): 15629-15634
- Laskowski M. J. (1990): Microtubule orientation in pea stem cells: A change in orientation follows the initiation of growth rate decline. *Planta* **181**, 44–52
- Lee H. J., Ha J. H., Kim S. G., Choi H. K. Kim Z. H. Han Y. J. Jim J. I., Oh Y., Frago V., Shin K., Hyeon T., Choi H. G., Oh K. H., Baldwin I. T., Park C. M. (2016): Stem-piped light activates phytochrome B to trigger light responses in *Arabidopsis thaliana* roots. *Sci. Signal.* **9**, 106
- Lee H., Park Y., Ha J., Baldwin I., Park Ch. (2017): Multiple Routes of Light Signaling during Root Photomorphogenesis. *Trends Plant Sci.* **22**(9):803-812.
- Lee Jin Suk and Ellis Brian E. (2007): Arabidopsis MAPK Phosphatase 2 (MKP2) Positively Regulates Oxidative Stress Tolerance and Inactivates the MPK3 and MPK6 MAPKs. *JBC Papers in Press* **282**(34): 25020–25029
- Levine A., Tenhaken R., Dixon R., Lamb C., (1994): H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response, *Cell* **79**, 583–593.
- Li J., Li G., Wang H., Wang Deng X. (2011): Phytochrome signaling mechanisms. *Arabidopsis Book.* **9**:e0148. Li Q. H. and Yang H. Q. (2007): Cryptochrome signaling in plants. *Photochem. Photobiol.* **83**, 94–101.
- Li Y., Cai H., Liu P., Wang C., Gao H., Wu C., Yan K., Zhang S., Huang J., Zheng C. (2017): Arabidopsis MAPKKK18 positively regulates drought stress resistance via downstream MAPKK3. *Biochem Biophys Res Commun.* **484**(2):292-297

- Lindeboom J., Nakamura M., Hibbel A., Shundyak K., Gutierrez R., Ketelaar T., Emons A., Mulder B., Kirik V., Ehrhardt D. (2013): A Mechanism for Reorientation of Cortical Microtubule Arrays Driven by Microtubule Severing. *Science* **6**, 342.
- Liu H., Liu B., Zhao C., Pepper M., Lin C.(2011): The action mechanisms of plant cryptochromes. *Trends Plant Sci* **16**(12):684-91
- Liu, Y. and Zhang, S. (2004): Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogenactivated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**, 3386–3399 (2004).
- Liu Y., Xu C., Zhu Y., Zhang L., Chen T., Zhou F., Chen H., Lin Y. (2017): The calcium-dependent kinase OsCPK24 functions in cold stress responses in rice. *J Integr Plant Biol.* 1744-7909
- Liu Y., He C. (2016): A review of redox signaling and the control of MAP kinase pathway in plants. *Redox biology* **11**, 192-204
- Locato V., Ciminiand S., Gara L. (2013): Strategies to increase vitamin C in plants: from plant defense perspective to food biofortification. *Front. Plant Sci.* **4**, 152.
- Ludwig A. A., Romeis T., Jones J. D. (2004): CDPK-mediated signalling pathways: specificity and crosstalk. *J Exp Bot* **55**, 181-8.
- Lumbreras V., Vilela B., Irar S., Sole 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. *Plant J* **63**, 1017-30.
- Mao G. Meng X., Liu Y., Zheng Z., Chen Z., Zhang S. (2011): Phosphorylation of a WRKY transcription factor by two pathogen-responsive MAPKs drives phytoalexin biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell* **23**, 1639–1653
- MAPK Group (Kazuya Ichimura et al.), 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., Morris P., Innes R., Ecker J., Scheel D., Klessig D., Machida Y., Mundy J., Ohashi Y., Walker J. Group M., Ichimura K., Shinozaki K., Tena G., Sheen J., Henry Y., Champion A., et al. (2002): Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends Plant Sci.* **7**, 301–308.
- Marchant A., Kargul J., May S. T., Muller P., Delbarre A., Perrot-Rechenmann C., Bennett M. J. (1999): AUX1 regulates root gravitropism in Arabidopsis by facilitating auxin uptake within root apical tissues. *EMBO J.* **18**(8):2066-73.

- Marino D., Dunand Ch., Puppo A. and Pauly N., (2011): A burst of plant NADPH oxidases. *Elsevier*, 1360-1385.
- Mo M., Yokawa K., Wan Y., Baluška F. (2015): How and why do root apices sense light under the soil surface? *Front. Plant Sci.* **6**:775.
- Meyer A. J. (2008): The integration of glutathione homeostasis and redox signaling, *J. Plant Physiol.* **165**, 1390-1403
- Mhamdi A., Queval G., Chaouch S., Vanderauwera S., Breusegem F., Noctor G. (2010): Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. *Journal of Experimental Botany*, 1-24
- Miles G. P., Samuel M. A., Zhang Y., Ellis B. E. (2005): RNA interference-based (RNAi) suppression of AtMPK6, an Arabidopsis mitogen-activated protein kinase, results in hypersensitivity to ozone and misregulation of AtMPK3. *Environ. Pollut.* **138**, 230–37
- Miller G. A. D., Suzuki N., Ciftci-Yilmaz S., Mittler R. O. N. (2010): Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant Cell Environ* **33**, 453-67
- Miyaji T., Kuromori T., Takeuchi Y., Yamaji N., Yokosho K., Shimazawa A., Sugimoto E., Omote H., Jian Feng Ma, Shinozaki K., Moriyama Y. (2014): AtPHT4;4 is a chloroplast-localized ascorbate transporter in Arabidopsis. *NATURE COMMUNICATIONS* **6**, 5928
- Mizoguchi T., Irie K., Hirayama T., Hayashida N., Yamaguchi-Shinozaki K., Matsumoto K., Shinozaki K. (1996): A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold, and water stress in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**(2):765-9.
- Montgomery B. L. (2016): Spatiotemporal Phytochrome Signaling during Photomorphogenesis: From Physiology to Molecular Mechanisms and Back. *Front. Plant Sci.* **7**, 480.
- Möglich A., Yang X., Ayers R. A., Moffat K. (2010): Structure and function of plant photoreceptors. *Annu Rev Plant Biol.* **61**, 21-47.
- Mullineaux P. M., Rausch T. (2005): Glutathione, photosynthesis and the redox regulation of stress-responsive gene expression, *Photosynthetic Res.* **86**, 459-474.
- Müller J., Beck M., Mettbach U., Komis G., Hause G., Menzel D., Samaj J. (2010): Arabidopsis MPK6 is involved in cell division plane control during early root development,

and localizes to the pre-prophase band, phragmoplast, trans-Golgi network and plasma membrane. *Plant Journal* **61**, 234–248.

Nakagami H., Soukupová H., Schikora A., Zárský V., Hirt H. (2006): A Mitogen-activated protein kinase kinase kinase mediates reactive oxygen species homeostasis in Arabidopsis. *J Biol Chem* **281**(50):38697-704

Navrot N., Collin V., Gualberto J., Gelhaye E., Hirasawa M., Rey P., Knaff D. B., Issakidis E., Jacquot J. P., Rouhier N. (2006): Plant glutathioneperoxidases are functional peroxiredoxins distributed in several subcellular compartments and regulated during biotic and abiotic stresses. *Plant Physiol*; **142**, 1364–79.

Neoptolemos J. P., Stocken D. D., Bassi C., Ghaneh P., Cunningham D., Goldstein D., Padbury R., Moore M. J., Gallinger S., Mariette C., Wente M. N., Izbicki J. R., Friess H., Lerch M. M., Dervenis C., Oláh A., Butturini G., Doi R., Lind P. A., Smith D., Valle J. W., Palmer D. H., Buckels J. A., Thompson J., McKay C. J., Rawcliffe C. L., Büchler M. W.; European Study Group for Pancreatic Cancer. (2010): Adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid vs gemcitabine following pancreatic cancer resection: a randomized controlled trial. *JAMA*.**304**(10):1073-81.

Nguyen X. C., Kim S. H., Lee K., Kim K. E., Liu X. M., Han H. J., Hoang M. H., Lee S. W., Hong J. C., Moon Y. H., Chung W. S. (2012): Identification of a C₂H₂-type zinc finger transcription factor (ZAT10) from Arabidopsis as a substrate of MAP kinase. *Plant Cell Rep.* **31**, 737–745

Nick R., Bergfeld R., Schafer E., Schopfer P. (1990): Unilateral reorientation of microtubules at the outer epidermal wall during photo- and gravitropic curvature of maize coleoptiles and sunflower hypocotyls. *Planta* **181**, 162–168

Noctor G., Foyer C. H. (1998): Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen undercontrol. *Ann. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol.* **49**, 729–737.

Overmyer, K., Brosche, M. and Kangasjarvi, J. (2003): Reactive oxygen species and hormonal control of cell death. *Trends Plant Sci.* **8**, 335–342.

Park H. C., Song E. H., Nguyen X. C., Lee K., Kim K. E., Kim H. S., Lee S. M., Kim S. H., Bae D. W., Yun D. J., Chung W. S. (2011): Arabidopsis MAP kinase phosphatase 1 is phosphorylated and activated by its substrate AtMPK6. *Plant Cell Rep.* **30**, 1523–1531

Passaia G., Fonini L. S., Caverzan A., Jardim-Messeder D., Christoff A. P., Gaeta M. L., de Araujo Mariath J. E., Margis R., Margis-Pinheiro M. (2013): Themitochondrial glutathione

peroxidase GPX3 is essential for H₂O₂ homeostasis and root and shoot development in rice. *Plant Sci*; **208**, 93–101.

Peltier J. B., Cai Y., Sun Q., Zabrouskov V., Giacomelli L., Rudella A., Ytterberg A. J., Rutschow H., Wijk K. J. (2006): The oligomeric stromal proteome of *Arabidopsis thaliana* chloroplasts *Mol. Cell Proteomics* **5**, 114–133.

Pérez-Salamó I., Papdi C., Rigó G., Zsigmond L., Vilela B., Lumberras V., Nagy I., Horváth B., Domoki M., Darula Z., Medzihradsky K., Bögre L., Koncz C., Szabados L. (2014): The heat shock factor A4A confers salt tolerance and is regulated by oxidative stress and the mitogen-activated protein kinases MPK3 and MPK6. *Plant Physiol.* **165**, 319–334

Persak H., Pitzschke A. (2013): Tight interconnection and multi-level control of *Arabidopsis* MYB44 in MAPK cascade signalling. *PLoS One.* **8**, e57547.

Persak, H. and Pitzschke, A. (2014): Dominant repression by *Arabidopsis* transcription factor MYB44 causes oxidative damage and hypersensitivity to abiotic stress. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 2517–2537

Pilon M., Abdel-Ghany S. E., Cohu C. M., Gogolin K. A., Ye H. (2006): Copper cofactor delivery in plant cells. *Curr. Opin. Plant Biol.* **9**, 256–263.

Pitzschke A. Schikora A., Hirt H. (2009): MAPK cascade signalling networks in plant defence. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**, 421–426

Pitzschke A., Datta S, Persak H. (2013): Salt Stress in *Arabidopsis*: Lipid Transfer Protein AZI1 and Its Control by Mitogen-Activated Protein Kinase MPK3. *Mol Plant.* **7**(4): 722–738.

Pitzschke A. (2014): Modes of MAPK substrate recognition and control. *Cell Press* **7**, 1360-1385

Poole L. B., Nelson K. J. (2016): Distribution and Features of the Six Classes of Peroxiredoxins. *Mol. Cells.* **39**(1): 53-59

Purvis A. C. (1997): Role of the alternative oxidase in limiting superoxide production by plant mitochondria. *Physiol. Plant.* **100**, 165-70

Qu Y., Liu S., Bao W., Xue X., Ma Z., Yokawa K., Baluška F., Wan Y. (2017): Expression of Root Genes in *Arabidopsis* Seedlings Grown by Standard and Improved Growing Methods. *Int J Mol Sci.* **18** (5)

Ren L., Tang G. (2012): Identification of sucrose-responsive microRNAs reveals sucrose-regulated copper accumulations in an SPL7-dependent and independent manner in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* **187**, 59–68

- Reiland S., Messerli G., Baerenfaller K., Gerrits B., Endler A., Grossmann J., Gruissem W., Baginsky S. (2009): Large-scale Arabidopsis phosphoproteome profiling reveals novel chloroplast kinase substrates and phosphorylation networks. *Plant Physiol* **150**(2):889-903
- Rockwell N. C., Su Y. S., Lagarias J. C. (2006): Phytochrome structure and signaling mechanisms *Annu Rev Plant Biol.* **57**:837-58
- Rodriguez M., Petersen M., Mundy J. (2010): Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **61**, 621–49
- Roitinger E., Hofer M., Köcher T., Pichler P., Novatchkova M., Yang J., Schlögelhofer P., Mechtler K. (2015): Quantitative phosphoproteomics of the ataxia telangiectasia-mutated (ATM) and ataxia telangiectasia-mutated and rad3-related (ATR) dependent DNA damage response in Arabidopsis thaliana. *Mol Cell Proteomics* **14**(3):556-71
- Sakamoto K. and Briggs W. R. (2002): Cellular and subcellular localization of phototropin 1. *PlantCell* **14**, 1723–1735.
- Salin M. L., Bridges S. M. (1980): Localization of superoxide dismutase in chloroplasts from *Brassica campestris*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **99**, 37-47.
- Shimomura A., Naka A., Miyazaki N., Moriuchi S., Arima S., Sato S., Hirakawa H., Hayashi M., Maymon M., Hirsch A. M., Suzuki A. (2016): Blue Light Perception by Both Roots and Rhizobia Inhibits Nodule Formation in Lotus japonicus. *MPMI* **29** (10): 786–796
- Shin D. H., Cho M. H., Kim T. L., Yoo J., Kim J. I., Han Y. J., Song P. S., Jeon J. S., Bhoo S. H., Hahn T. R. (2010): A small GTPase activator protein interacts with cytoplasmic phytochromes in regulating root development. *J Biol Chem.* **285**(42):32151-9
- Schepens I., Boccalandro H. E., Kami C., Casal J. J., Fankhauser C. (2008): PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE4 modulates phytochrome-mediated control of hypocotyl growth orientation. *Plant Physiol* **147**, 661–671
- Schepetilnikov, M., Dimitrova, M., Mancera-Martínez, E., Geldreich, A., Keller, M., Ryabova, L.A. (2013): TOR and S6K1 promote translation reinitiation of uORF-containing mRNAs via phosphorylation of eIF3h. *EMBO J.* **32**, 1087-1102.
- Sieferman-Harms D. (1987): The light harvesting function of carotenoids in photosynthetic membrane, *Plant Physiol* **69**, 561-568.
- Silva-Navas J., Moreno-Risueno M. A., Manzano C., Téllez-Robledo B., Navarro-Neila S., Carrasco V., Pollmann S., Gallego F. J., Del Pozo J. C. (2016): Flavonols Mediate Root

Phototropism and Growth through Regulation of Proliferation-to-Differentiation Transition. *Plant Cell*. **28**(6):1372-87.

Smékalová V., Doskočilová A., Komis G., Šamaj J. (2013): Crosstalk between secondary messengers, hormones and MAPK modules during abiotic stress signalling in plants. *Biotechnology Advances*, **32**, 2-11.

Smékalová V., Luptovciak I., Komis G., Šamajová O., Ovečka M., Doskočilová A., Takáč T., Vadovič P., Novák O., Pechan T., Ziemann A., Košútová P., Šamaj J. (2014): Involvement of YODA and mitogen activated protein kinase 6 in Arabidopsis post-embryogenic root development through auxin up-regulation and cell division plane orientation. *New Phytol.* **203**(4):1175-93

Solanke A. U., Sharma A. K. (2008): Signal transduction during cold stress in plants. *Physiol Mol Biol Plants* **14**, 69-79.

Stone J. M., Walker J. C. (1995): Plant protein kinase families and signal transduction. *Plant Physiol.* **108**(2):451-7.

Sullivan S., Thomson C., Lamont D., Jones M., Christie J. (2008): In Vivo Phosphorylation Site Mapping and Functional Characterization of Arabidopsis Phototropin 1. *Molecular Plant* **1**; 178–194

Sutherland M. W. (1991): The generation of oxygen radicals during host plant responses to infection, *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **39**, 79–93.

Suzuki N., Miller G., Sejima H., Harper J., Mittler R. (2013): Enhanced seed production under prolonged heat stress conditions in Arabidopsis thaliana plants deficient in cytosolic ascorbate peroxidase 2. *Journal of Experimental Botany* **64**, 253–263.

Suzuki H., Yokawa K., Nakano S., Yoshida Y., Fabrissin I., Okamoto T., Baluška F., Koshiba T. (2016): Root cap-dependent gravitropic U-turn of maize root requires light-induced auxin biosynthesis via the YUC pathway in the root apex. *J Exp Bot.* **67**(15):4581-91

Szarka A., Horemans N., Kovacs Z., Grof P., Mayer M., Banhegyi G. (2007): Dehydroascorbate reduction in plant mitochondria is coupled to the respiratory electron transfer chain, *Physiol. Plant.* **129**, 225-232

Takáč T., O. Šamajová, P. Vadovič, T. Pechan, P. Košútová M. Ovečka, A. Husičková, G. Komis, J. Šamaj (2014): Proteomic and Biochemical Analyses Show a Functional Network of Proteins Involved in Antioxidant Defense of the Arabidopsis anp2anp3 Double Mutant *J Proteome Res.* **13**(12): 5347–5361

- Takáč T., Vadovič P., Pechan T., Luptovčiak I., Šamajová O., Šamaj J. (2016): Comparative proteomic study of Arabidopsis mutants mpk4 and mpk6. *Scientific Reports* **6**, 28306
- Takano M., Kanegae H., Shinomura T., Miyao A., Hirochika H., and Furuya M. (2001): Isolation and characterization of rice phytochrome A mutants. *PlantCell* **13**, 521–534.
- Takemiya A., Sugiyama N., Fujimoto H., Tsutsumi T., Yamauchi S., Hiyama A., Tada Y., Christie J. M., Shimazaki K. (2013): Phosphorylation of BLUS1 kinase by phototropins is a primary step in stomatal opening. *Nat Commun.* **4**, 2094
- Teige, M. Scheikl E., Eulgem T., Dóczi R., Ichimura K., Shinozaki K., Dangl J. L., Hirt H. (2004): The MKK2 Pathway Mediates Cold and Salt Stress Signaling in Arabidopsis. *Mol. Cell* **15**, 141–152.
- Trovato M., Mattioli R., Costantino P. (2008): Multiple roles of proline in plant stress tolerance and development, *Rendiconti Lincei* **19**, 325-346.
- Trewavas A. (2009): What is plant behaviour? *Plant Cell Environ.* **32**: 606–616.
- Ueda K., Matsuyama T. (2000): Rearrangement of cortical microtubules from transverse to oblique or longitudinal in living cells of transgenic Arabidopsis thaliana. *Protoplasma* **213**, 28–38
- Vandenbrink J., Raul Herranz R., Medina J., Edelmann R., Kiss J. (2016): A novel blue-light phototropic response is revealed in roots of Arabidopsis thaliana in microgravity. *Planta* **244**(6):1201-1215.
- Wagner A. M. (1995): A role for active oxygen species as second messengers in the introduction of alternative oxidase gene expression in Petunia hybrida cells. *FEBS Lett.* **369**, 339-42.
- Wan Y. L., Eisinger W., Ehrhardt D., Kubitscheck U., Baluška F., Briggs W. (2008): The subcellular localization and blue-light-induced movement of phototropin1 – GFP in etiolated seedlings of Arabidopsis thaliana. *Mol.Plant* **1**, 103–117.
- Wang H., Ngwenyama N., Liu Y., Walker J. C., Zhang S. (2007): Stomatal development and patterning are regulated by environmentally responsive mitogen-activated protein kinases in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**, 63–73
- Wang H., Liu Y., Bruffett K., Lee J., Hause G, John C. Walker, and Zhanga S. (2008): Haplo-Insufficiency of MPK3 in MPK6 Mutant Background Uncovers a Novel Function of These Two MAPKs in Arabidopsis Ovule Development. *The Plant Cell* **20**, 602–613.

- Wang P., Du Y., Li Y., Ren D., Song C. P. (2010): Hydrogen peroxide-mediated activation of MAP kinase 6 modulates nitric oxide biosynthesis and signal transduction in Arabidopsis. *Plant Cell* **22**, 2981–2998
- Wang P., Xue L., Batelli G., Lee S., Hou Y. J., Van Oosten M. J., Zhang H., Tao W. A., Zhu J. K. (2013): Quantitative phosphoproteomics identifies SnRK2 protein kinase substrates and reveals the effectors of abscisic acid action. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **110**(27):11205-10
- Wu G. and Spalding E. (2007): Separate functions for nuclear and cytoplasmic cryptochrome 1 during photomorphogenesis of Arabidopsis seedlings. *PNAS* **104**(47): 18813–18818
- Xie G., Sasaki K., Imai R., Xie D. (2014): A redox-sensitive cysteine residue regulates the kinase activities of OsMPK3 and OsMPK6 in vitro. *Plant Sci.* **227**, 69-75.
- Xing Y., Jia W., Zhang J. (2008): AtMEK1 mediates stress-induced gene expression of CAT1 catalase by triggering H₂O₂ production in Arabidopsis. *J Exp Bot.* **58**(11): 2969-81.
- Xing Y, Cao Q, Zhang Q, Qin L, Jia W, Zhang J. (2013): MKK5 regulates high light-induced gene expression of Cu/Zn superoxide dismutase 1 and 2 in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* **54**, 1217–1227.
- Xu W., Ding G., Ken Yokawa K., Baluška F., Li Q., Liu Y., Shi W., Liang J., Zhang J., (2013): An improved agar-plate method for studying root growth and response of Arabidopsis thaliana. *SCIENTIFIC REPORTS* **3**, 1273
- Yamasaki H., Hayashi M., Fukazawa M., Kobayashi Y., Shikanaic T. (2009): SQUAMOSA Promoter Binding Protein–Like7 Is a Central Regulator for Copper Homeostasis in Arabidopsis. *The Plant Cell.* **21**, 347–361
- Yokawa K., Kagenishi T., Kawano T., Mancuso S., Baluška F. (2011): Illumination of Arabidopsis roots induces immediate burst of ROS production. *Plant Signaling & Behavior* **6**(10), 1460-1464
- Yokawa K., Fasano R., Kagenishi T., Baluška F. (2014): Light as stress factor to plant roots – case of root halotropism. *Front Plant Sci.* **5**:718
- Yokawa K., Baluška F. (2016): The TOR Complex: An Emergency Switch for Root Behavior. *Plant Cell Physiol.* **57**(1):14-8.
- Yoo S. D., Cho Y. H., Tena G., Xiong Y., Sheen J. (2008): Dual control of nuclear EIN3 by bifurcate MAPK cascades in C₂H₄ signalling. *Nature* **451**, 789–795
- Yost Jr. F. J., Fridovich I. (1973): An iron-containing superoxide dismutase from *E. coli*. *Journal of Biological Chemistry.* **248**, 4905-4908.

- Yu L., Nie J., Cao C., Jin Y., Yan M., Wang F., Liu J., Xiao Y., Liang Y., Zhang W. (2010): Phosphatidic acid mediates salt stress response by regulation of MPK6 in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* **188**(3):762-73.
- Yu X., Liu H., Klejnot J. and Lin C. (2010): The cryptochrome blue light receptors. *Arabidopsis Book* **8**, e0135.
- Zamocky M., Furtmüller P. G., Obinger C. (2008): Evolution of catalases from bacteria to humans. *Antioxid. Redox. Signal.* **10**, 1527–1547.
- Zhang J., Shao F., Li Y., Cui H., Chen L., Li H., Zou Y., Long C., Lan L., Chai J., Chen S., Tang X., Zhou J. M. (2007): A *Pseudomonas syringae* effector inactivates MAPKs to suppress PAMP-induced immunity in plants. *Cell Host Microbe* **17**, 175–85.
- Zhang J., Zou D., Li Y., Sun X., Wang NN., Gong SY., Zheng Y., Li X. B. (2014): GhMPK17, a cotton mitogen-activated protein kinase, is involved in plant response to high salinity and osmotic stresses and ABA signaling. *PLoS One*, **9**(4):e95642
- Zhang K. X., Xu H. H., Yuan T. T., Zhang L., Lu Y. T. (2013): Blue-light-induced PIN3 polarization for root negative phototropic response in *Arabidopsis*. *Plant J.* **76**(2):308-21
- Zhao X., Zhao Q. P., Xu C. Y., Wang J., Zhu J. D., Shang B. S., Zhang X. (2018): Phot2-regulated relocation of NPH3 mediates phototropic response to high-intensity blue light in *Arabidopsis thaliana*. *J Integr Plant Biol.* 10.1111/jipb.12639.
- Zhao Y., Zhou J., Xing D. (2014): Phytochrome B-mediated activation of lipoxygenase modulates an excess red light-induced defence response in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, **65**(17): 4907–4918
- Zhu J., Dong C. H., Zhu J. K. (2007): Interplay between cold-responsive gene regulation, metabolism and RNA processing during plant cold acclimation. *Curr Opin Plant Biol* **10**, 290-5.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABA	abscisová kyselina
AHP4	histidine-containing phosphotransmitter 4
ANP	arabidopsis NPK1-related kinase 1
AOX	alternativní oxidáza
APS	peroxysíran amonný
APX	askorbát peroxidáza,
ARP2/3-SCAR	actin related protein 2/3-actin monomer binding protein complex
ASC	askorbát
AtMKK1	mitogen aktivovaná protein kináza kináza 1
ATP	adenosintrifosfát
AZI1	lipid transfer protein
BAK1	BRI1-associated kinase 1
BLUS1	blue light signaling 1
bHLH	transkripční faktor
BSA	hovězí sérový albumin
bZIP	transkripční faktor
CAT	kataláza
CIB1	krytochrom – interacting bHLH1
Col-0	ekotyp Columbia 0
COP1	constitutively photomorphogenic 1
CRY	krytochrom
DHA	dehydroaskorbát
DHAR	dehydroaskorbát reduktáza

DTT	dithiotreitol
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
E3 PUB22	ubiquitin ligáza, ubiquitin-protein transferase activity
FAD	flavin adenine dinucleotide
FLG22	bakteriálníh peptidu flagelinu
FLS2	flagelin sensing 2
GPX	glutation peroxidáza
GR	glutathion reduktáza
GSH	glutathion
GSSG	glutathion disulfid
GTP	guanosintrifosfát
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonová kyselina
Hsf	transkripční faktor
HY5	elongated hypocotyl 5
IAA	indol-3-octová kyselina
LOV	lightoxygen-voltage
LOX	lipoxygenázy
MAPK	mitogenem aktivovaná protein kináza
MAPKK	mitogenem aktivovaná protein kináza kináza
MAPKKK	mitogenem aktivovaná protein kináza kináza kináza
MDHA	monodehydroaskorbát
MDHAR	monodehydroaskorbát reduktáza
MEKK1	mitogen-activated protein kináza kináza 1
MKP2	MAPK fosfatáza 2

MKK5	mitogen aktivovaná protein kináza kináza 5
MKK7	mitogen-activated protein kináza kináza 7
MPK3	mitogenem aktivovaná protein kináza 3
MPK4	mitogenem aktivovaná protein kináza 4
MPK6	mitogenem aktivovaná protein kináza 6
MS	hmotnostní spektrometrie
MYB	transkripční faktor
NADPH	nicotinamide adenine dinukleotid fosfát
NBT	nitroblue tetrazolium chlorid
NPH3	non-phototropic hypocotyl 3
OXI1	oxidative signal – inducible 1
PA	kyselina fosfatidová
PAMP	pathogen associated molecular pattern
PHOT	fototropin
PHY	fytochrome
PIN	auxin efflux carrier component
PIRF	phytochrome-interacting ROP guanine-nucleotide exchange factor
PKS	Phytochrome Kinase Substrate
PS	fotosystém
PY1-ME	Peroxy-Yellow 1 Methyl Ester
Q10	coenzyme Q-binding protein
RBOH	respiratory burst oxidase homologues
RKR	reaktivní kyslíkové radikály
ROP	rho of Plants

RPT2	root phototropism 2
SDS	dodecyl sulfát sodný
SnRK2s	Sacharózu nefermentující protein kinázu 2s
SPA	suppressor of phytochrome A
SPL7	squamosa promoter binding protein-like 7
SOD	superoxiddismutasa
TEMED	tetramehylethylendiamin
TOR	target of rapamycin
WRKY	transkripční faktor
YFP	žlutý fluorescentní protein
YODA	mitogen-activated protein kináza kináza kináza YODA
YUC	YUCCA protein