

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Prírodovedecká fakulta

Katedra biochémie



Úloha a integrácia cytoskeletu a MAPK signalingu počas odpovedí rastlinných buniek na stres

DIPLOMOVÁ PRÁCA

Autor:	Bc. Petra Košútová
Štúdijný program:	N1406 Biochémia
Štúdijný obor:	Biochémia
Forma štúdia:	Prezenčná
Vedúci práce:	Mgr. Olga Šamajová, Dr.
Termín odovzdania práce:	2. 5.2013

„Prehlasujem, že som predloženú diplomovú prácu vypracovala samostatne s použitím citovanej literatúry.“

V Olomouci dňa

.....

Podakovanie

„Rada by som sa poďakovala hlavne vedúcej mojej diplomovej práce Mgr. Olge Šamajovej, Dr. za odborné vedenie, cenné rady a pripomienky pri spracovaní tejto práce. Chcela by som sa poďakovať aj Ing. Tomášovi Takáčovi, Ph.D. a Georgiovi Komisovi, Ph.D.za odporné rady počas experimentálnej práce. Ďakujem aj celému kolektívu Oddelenia bunkovej biológie za priateľský kolektív a ochotu vždy pomôcť a poradiť.“

Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora	Bc.Petra Košútová
Názov práce	Úloha a integrácia cytoskeletu a MAPK signalingu počas odpovedí rastlinných buniek na stres
Typ práce	Diplomová
Pracovisko	Katedra biochémie
Vedúci práce	Mgr. Olga Šamajová, Dr.
Rok obhajoby práce	2013
Abstrakt	<p>Rastliny si ako sesilné organizmy museli vyvinúť spôsoby na obranu pred nepriaznivými podmienkami prostredia. Dôležitú úlohu pri tom hrajú mitogén aktivované proteín kinázy, ktorých aktiváciou dochádza k odpovedi rastliny na stimul. Cieľom diplomovej práce bolo objasnenie vplyvu osmotického, oxidatívneho a chladového stresu na fenotyp divokých typov Col-0 a Ws a tiež mutantov <i>mpk4</i>, <i>mpk6-2</i> a <i>anp2anp3</i> u <i>Arabidopsis thaliana</i>. Ďalším krokom bola imunolokalizácia mikrobutulov v koreňoch po pôsobení osmotického, oxidatívneho a chladového stresu. Na základe získaných výsledkov z fenotypovej analýzy po pôsobení oxidatívneho stresu bola detekovaná aktivita antioxidantného enzýmu superoxid dismutázy v semenáčikoch divokého typu Ws a <i>anp2anp3</i> mutantu pomocou natívnej elektroforézy. Súčasne sa sledovala distribúcia superoxidu v koreňoch týchto semáčikov pomocou farbenia nitroblue tetrazolium.</p>
Kľúčové slová	<i>Arabidopsis</i> , MAPK, cytoskelet, osmotický stres, oxidatívny stres, chladový stres, koreň
Počet strán	97
Počet príloh	6
Jazyk	Slovenský

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Bc. Petra Košútová
Title	The role and the integration of the cytoskeleton and MAPK signalling during stress responses of higher plant cells
Type of thesis	master
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Olga Šamajová, Dr.
The year of presentation	2013
Abstract	<p>In comparison to animals, plants as sessile organisms have developed defence mechanisms against unfavourable conditions. An important role of the mitogen activated protein kinases is activation of plant response to the stimulus. The aim of this thesis was to clarify the influence of osmotic, oxidative and cold stress on the phenotype of wild types Col-0 and Ws as well as <i>mpk4</i>, <i>mpk6-2</i> and <i>anp2anp3</i> mutants in <i>Arabidopsis thaliana</i>. The next step was immunolocalization of microtubules in roots exposed to osmotic, oxidative and cold stress. Based on the results of the phenotypic analysis activity of antioxidant enzyme superoxide dismutase was detected in roots of wild-type Ws and <i>anp2anp3</i> mutant by native electrophoresis. Simultaneously, the distribution of superoxide was monitored in roots of these seedlings by histochemical staining with nitroblue tetrazolium.</p>
Keywords	<i>Arabidopsis</i> , MAPK, cytoskeleton, osmotic stress, oxidative stress, cold stress, root
Number of pages	97
Number of appendices	6
Language	Slovak

OBSAH

Ciele práce	7
Teoretická časť:	7
Praktická časť:	7
TEORETICKÁ ČASŤ	8
1. Úvod	9
2. Charakteristika MAPK	10
2.1. MAPK kaskády	10
2.2. Členovia MAPK modulov: nomenklatúra a klasifikácia	10
2.3. Aktivácia MAPK	11
2.4. Inaktivácia MAPK	12
2.5. MAPK a lipidová signalizácia	13
3. Stresové odpovede rastlín	14
4. Stres a funkcie rastlinných MAPK	15
4.1. Oxidatívny stres a MAPK	15
4.2. Osmotický stres a MAPK	16
4.3. Chladový stres a MAPK	17
4.4. MPK3, MPK4 a MPK6 ako najlepšie študované Arabidopsis MAPK	18
5. Cytoskelet	19
5.1. Reorientácia	21
5.2. Dezorganizácia/rozklad	21
5.3. Zväzkovanie	22
5.4. Posttranslačné modifikácie	22
6. Bunkové delenie	23
EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	25
7. Materiál	26
7.1. Použité prístroje	26

7.2. Chemikálie	26
7.3. Roztoky a média	27
8. Metódy.....	29
8.1. Povrchová sterilizácia semien.....	29
8.2. Fenotypová analýza	29
8.3. Pôsobenie soľného, osmotického a chladového stresu	29
8.4. Imunolokalizácia mikrotubulov metódou „whole-mount“	30
8.5. Farbenie nitroblue tetrazoliom (NBT).....	31
8.6. Natívna elektroforéza	31
9. Výsledky	32
9.1. Charakterizácia fenotypov koreňov u <i>mpk4</i> , <i>mpk6-2</i> a <i>anp2anp3</i> mutantov	32
9.2. Fenotypové zmeny u <i>mpk4</i> , <i>mpk6-2</i> a <i>anp2anp3</i> mutantov a príslušných divokých typov navodené osmotickým, oxidatívnym a chladovým stresom ...	35
9.2.1. Vplyv osmotického stresu.....	35
9.2.2. Vplyv chladového stresu	52
9.2.3. Vplyv oxidatívneho stresu	52
9.3. Imunocytochemické štúdium cytoskeletu u <i>mpk4</i> , <i>mpk6-2</i> a <i>anp2anp3</i> mutantov a u divokých typov Col-0 a Ws metódou "whole mount"	57
9.4. Mitóza a cytokinetické poruchy	58
9.5. Histochemická lokalizácia superoxidu.....	67
9.6. Biochemická analýza aktivity superoxid dismutázy.....	68
10. Diskusia	69
11. Záver	72
12. Zoznam použitej literatúry	73
13. Zoznam použitých skratiek.....	89
14. PRÍLOHY.....	91

Ciele práce

Teoretická časť:

1. Spracovanie literárnej rešerše na tému MAPK signaling a cytoskelet u rastlín a odpovede rastlinných buniek na stres.

Praktická časť:

1. Optimalizácia podmienok kultivácie rastlín v stresových podmienkach *in vitro* (osmotický, oxidatívny a chladový stres).
2. Fenotypové pozorovanie rastlín kultivovaných v stresových podmienkach.
3. Imunocytochemické štúdium vplyvu stresových faktorov na cytoskelet metódou „whole mount“.
4. Histochemické pozorovanie distribúcie superoxidu.
5. Biochemická analýza aktivity superoxid dismutázy.

TEORETICKÁ ČASŤ

1. Úvod

Rastliny sú sesilné organizmy a musia sa neustále prispôbovať rýchlo sa meniacim enviromentálnym podmienkam. V snahe prežiť, normálne rásť a vyvíjať sa, si rastliny vyvinuli mechanizmus na rýchle zachytávanie a prenos signálov z prostredia, ktorý vedie k špecifickým adaptívnym alebo obranným odpovediam. Dôležitú úlohu v tomto mechanizme zohrávajú mitogén aktivované proteín kinázy (MAPK). MAPK predstavujú skupinu vysoko konzervovaných fosforylačných enzýmov nachádzajúcich sa vo všetkých eukaryotických bunkách. Až 5% z celkového genómu *Arabidopsis* kóduje proteín kinázy, z nich 10% je zapojených v MAPK signálnych dráhach (Arabidopsis-Genome-Initiative, 2000). MAPK umožňujú na jednej strane rýchlu a dynamickú reguláciu enzýmovej aktivity a na druhej strane zmenu génovej expresie. Zúčastňujú sa rôznych procesov ako sú regulácia rastu, diferenciácia, predĺžovanie, odpoveď na stres a apoptóza (Suarez-Rodriguez et al., 2010; Šamajová et al., 2013a). MAPK sú zahrnuté nielen v signalizácii biotického a abiotického stresu, ale zohrávajú dôležitú úlohu aj v hormanálnej a vývojovej signalizácii. U živočíšnych buniek je známe, že MAPK moduly sú priestorovo spojené s rôznymi bunkovými doménami, ako sú endozomálne organely (Howe et al., 2001; Teiss et al., 2002 a 2006; Taub et al., 2007) a cytoskelet (Pullikuth & Catling, 2007). V rastlinných bunkách sú MAPK lokalizované na plazmatickej membráne, v cytoplazme (endomembránový systém a cytoskelet) a v jadre (Šamajová et al., 2013b). MAPK kaskády sú zahrnuté v normálnom bunkovom metabolizme počas fyziologických, vývojových a hormonálnych odpovedí u rastlín (Mishra et al., 2006; Zhang et al., 2006; Pitzschke & Hirt., 2009).

2. Charakteristika MAPK

2.1. MAPK kaskády

MAPK vytvárajú v bunkách kaskády, nazývané tiež moduly, ktoré prenášajú a zosilňujú signály prostredníctvom troch typov reverzibilne fosforylovaných kináz. Sú to MAPK kinázy kinázy (MAP3Ks), MAPK kinázy (MAP2Ks) a MAPK (Suarez-Rodriguez et al., 2010). MAPK moduly konvertujú signály vytvorené na receptore do vhodných bunkových odpovedí prostredníctvom fosforylácie rôznych substrátových proteínov. K týmto substrátovým proteínom patria napríklad transkripčné faktory alebo cytoskeletálne proteíny. Reverzibilná fosforylácia je kritický regulačný mechanizmus kontrolujúci aktivitu proteínov. V MAPK signálnej kaskáde závisí bunečná odpoveď na intenzite a trvaní aktivácie MAPK, ktorá je určená rovnováhou medzi fosforylovaným a defosforylovaným stavom. V genóme *Arabidopsis thaliana* bolo identifikovaných 110 hypotetických génov pre MAPK moduly, z toho 80 pre MAP3K, 10 pre MAP2K a 20 pre MAPK (Ichimura et al., 2002). Kinázy v kaskáde sú funkčne prepojené (Šamaj et al., 2004b). Vytváranie a integritu MAPK modulov zabezpečujú takzvané kostrové proteíny, ktoré kaskádu udržiavajú pohromade (Morrison et al., 2003). Predpokladá sa, že kostrové proteíny zohrávajú veľmi významnú úlohu pri určovaní špecificity MAPK signálnych dráh. Tieto proteíny majú väzbové miesta pre MAP3Ks, MAP2Ks a MAPK a tiež špeciálne domény (napr. FYVE), ktorými sa môžu viazať na fosfolipidy v endomembránach (Whitmarsh & Davis, 1998; Bardwell et al., 2001; Takekawa et al., 2005). Aj samotné komponenty MAPK modulu môžu niekedy fungovať ako kostrové proteíny. Ďalej sa na integrite špecifickej MAPK kaskády môžu podieľať adaptorové a kotvové proteíny (Whitmarsh et al., 1998; Bardwell et al., 2001; Takekawa et al., 2005).

2.2. Členovia MAPK modulov: nomenklatúra a klasifikácia

MAP3K sú najväčšia a najviac heterogénna skupina v MAPK kaskáde. Rôzne MAP3K môžu iniciovať podobnú MAPK kaskádu, ktorá aktivuje rovnakú MAPK. Toto predstavuje jeden z mechanizmov, ktorým sa rôzne stimuly prenášajú na tu istú MAPK. Zdieľanie jednej komponenty rôznymi kaskádami tiež vedie k interakcii medzi rôznymi dráhami (Ichimura et al., 2002; Jonak et al., 2002). Skupina MAP3K je rozdelená do dvoch veľkých podskupín: MEKK-typ a Raf-typ. U *A. thaliana* sú príkladmi MEKK-typu ANP 1/2/3 a MEKK1, zatiaľ čo CTR1 (Constitutive Triple Response 1) a EDR1 (Enhanced Disease Resistance1) patria k Raf-typu (Ichimura et al., 2002).

MAP2Ks predstavujú najmenšiu skupinu s 10 členmi. Rastlinné MAP2Ks sú rozdelené do štyroch skupín (A-D) podľa ich sekvenčného usporiadania. Rastlinné MAP2K sú charakterizované rôznymi primárnymi štruktúrami, ale sú konzervované v rámci jednej skupiny (Jouannic et al., 1999). Napríklad, skupina A sa podieľa na abiotickom strese a bunkovom delení a tiež reaguje na patogény. MAP2Ks patriace do skupiny C sú citlivé na abiotický stres a hrajú úlohu v hormonálnych a enviromentálnych odpovediach (Ichimura et al., 2002).

MAPK u *A. thaliana* sú skrátené nazývané MPKs a sú klasifikované do dvoch podtypov: tie ktoré obsahujú TEY (Thr-Glu-Tyr) aminokyselinovú sekvenciu a tie, ktoré obsahujú TDY (Thr-Asn-Tyr) aminokyselinovú sekvenciu v ich aktivačnej doméne. Podtyp TEY sa skladá z troch skupín: A, B a C. MAPK skupiny A sú dôležité v enviromentálnych a hormonálnych odpovediach. Do tejto skupiny patria napr. MPK3 a MPK6. MAPK skupiny B, do ktorej patrí MPK4, tiež hrajú úlohu v odpovediach na enviromentálny stres a podieľajú sa na bunkovom delení. Veľmi málo sa vie o skupine C, ale zdá sa že tieto MAPK sú regulované cirkadiánnym rytmom. TDY podtyp MAPK tvorí skupinu D. Tieto MAPK majú dlhšiu C-terminálnu oblasť vo vzťahu ku skupinám A, B a C. MAPK v skupine D sú indukované patogénom (huby) a poranením (Ichimura et al., 2002).

Rovnaké kinázy sú často zahrnuté v rôznych fyziologických procesoch. Interakcie medzi kinázami v rámci MAPK kaskády vznikajú cez väzbové miesta prítomné v kinázach, alebo s pomocou externých kostrových proteínov.

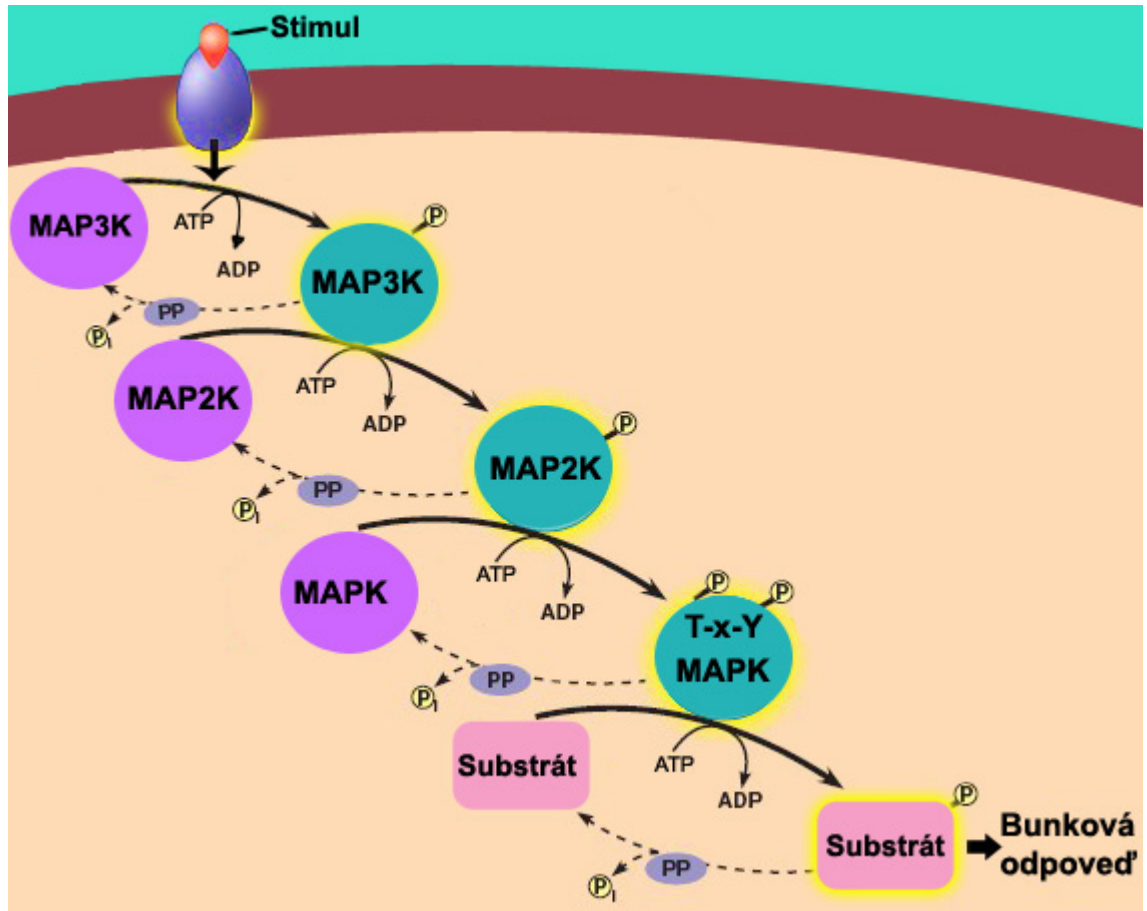
2.3. Aktivácia MAPK

Stimulovaný receptor na plasmatickej membráne aktivuje MAP3Ks (Obr. 1). Sú to serín/treonínové kinázy, ktoré fosforylujú MAP2Ks cez serín/treonínové zvyšky v S/T-X₅-S/T motíve. MAP2Ks sú dvojito špecifické treonín tyrozín kinázy, ktoré aktivujú MAPK ako poslednú komponentu v module, a to prostredníctvom dvojitej fosforylácie tyrozínového a serín/treonínového zvyšku v T-X-Y motíve (Thr-X-Tyr; X je akákoľvek iná aminokyselina) (Chang & Karin, 2001; Colcombet et al, 2008). Deaktivácia a tým regulácia aktivity MAPK je riadená pomocou tyrozínových a serín/treonínových fosfatáz (Sun et al., 1993; Luan, 2003). Členovia MAPK modulov môžu byť aktivovaní viac ako len jedným typom stresu. Aktivované MAPK sú z MAPK modulu uvoľnené, následne relokované v bunke a tak pripravené regulovať širokú škálu rôznych substrátov (napr. transkripčné faktory, enzýmy, cytoskeletálne proteíny).

Bunková odpoveď závisí na stimule a na intenzite a trvaní aktivácie MAPK dvojitou fosforyláciou, ktorá musí byť prísne regulovaná (Marshall, 1995; Camps et al., 2000;

Theodosiou & Ashworth, 2002; Dickinson a Keyse, 2006; Owens & Keyse, 2007, Keyse, 2008).

Najlepšie charakterizované MAPK u *A. thaliana* sú MPK3, MPK4 a MPK6, ktoré sú aktivované rôznymi biotickými a abiotickými stresmi (Šamajová et al. 2013a) ale podieľajú sa aj na vývinových procesoch (Beck et al. 2010, Müller et al. 2010).



Obr.1 Schématické zobrazenie MAPK kaskády zloženej z MAP3K, MP2K a MAPK. Aktiváciou receptora dochádza k postupnej aktivácii jednotlivých zložiek kaskády, čo má za následok bunkovú odpoveď. Aktívne formy kináz a substrátu sú zvýraznené žltým ohraničením. Pi je anorganický fosfát a PP je proteín fosfatáza

2.4. Inaktivácia MAPK

Defosforylácia treonínového alebo tyrozínového zvyšku v rámci aktivačného motívu T-X-Y inaktivuje MAPK. Úplná inaktivácia MAPK vyžaduje defosforyláciu na oboch, treonínovom aj tyrozínovom zvyšku. Sú za ňu zodpovedné dvojito špecifické MAPK fosfatázy (MKPs), ktoré predstavujú dôležitú skupinu fosfatáz priradenú k negatívnej regulácii MAPK signalizácie (Camps et al., 2000; Theodosiou & Ashworth, 2002; Dickinson & Keyese, 2006; Owens & Keyes, 2007; Keyese, 2008). Tieto fosfatázy, podobne ako MAPK, majú rôznu subcelulárnu lokalizáciu. Zastúpenie a aktivita MAPK

fosfatáz je regulovaná aktivovanými MAPK dráhami pomocou spätnoväzobnej slučky (Camps et al., 2000).

K dnešnému dňu boli identifikované tri rôzne formy fosfatáz: proteín tyrozín fosfatázy (PTPs), proteín serín-treonín fosfatázy (PSTPs) a dvojito-špecifické (Ser/Thr a Tyr) fosfatázy (DSPs) (Gupta et al., 1998; Meskiene et al., 1998; Xu et al., 1998; Bartels et al., 2010). U *A. thaliana*, členovia všetkých troch skupín sú spojené s MAPK inaktíváciou, ale dvojito-špecifické MAPK fosfatázy sú najdôležitejšia skupina, pretože umožňujú defosforyláciu oboch zvyškov. Genóm *A. thaliana* kóduje päť možných kandidátov dvojito-špecifických MAPK fosfatáz (MKP1, MKP2, DsPTP1, PHS1 a IBR5) (Bartels et al., 2010). Fosfatáza DsPTP1 (Dual Specificity Protein Tyrosine Phosphatase), bola izolovaná a bolo dokázané, že inaktívuje MPK4 *in vitro* (Gupta et al., 1998). Celkovo bolo nájdených v genóme *A. thaliana* 11 DSPs. Fosfatáza ABI1 (ABA Insensitive 1) hrá dôležitú úlohu v signálnej dráhe kyseliny abscisovej (Leung et al., 1994; Meyer et al., 1994) a defosforyluje zložku MAPK kaskády (Heimovaara-Dijkstra et al., 2000). Iná fosfatáza MKP1 (MAPK Phosphatase) je regulátorom MAPK kinázovej dráhy dôležitej pri DNA poškodení genotoxickým UV stresom (Ulm et al., 2001). MKP1 je potrebná na udržanie potrebnej hladiny aktivity MAPK. Transkripčná hladina MKP1 je konštantná počas a po genotoxickom strese. MKP1 preferenčne interaguje s MPK6 a v menšej miere s MPK3 a MPK4 (Ulm et al., 2002). Celkovo je MKP1 považovaná za negatívny regulátor MPK3 a MPK6 pri rezistencii proti bakteriálnemu patogénu *Pseudomonas syringae* a tolerancii proti UV-B a soľnému stresu (Ulm et al., 2002; Anderson et al., 2011; Basteiro et al., 2011). Lee et al. (2007) ukázali, že aktivita MKP1 sa zvyšuje po väzbe na kalmodulín. To naznačuje, že Ca^{2+} a MAPK signalizácia sú spojené cez reguláciu pomocou MKP1. MKPs môžu pôsobiť spolu s ostatnými proteín fosfatázami a kontrolovať tak MAPK aktivitu. Proteín tyrozín fosfatáza 1 (PTP1), ktorá interaguje s MPK6, účinkuje spolu s MKP1 a potláča biosyntézu salicylovej kyseliny (SA), kamalexínu a patogén-súvisiacu génovú expresiu, čo robí rastliny viac citlivé na infekciu *Pseudomonas syringae* (Bartels et al., 2009). Iná fosfatáza MKP2 sa viaže a defosforyluje MPK3 a MPK6 *in vitro* ako aj *in vivo* (Lee & Ellis., 2007; Lumbreras et al., 2010).

..

2.5. MAPK a lipidová signalizácia

Okrem regulácie MAPK proteín fosfatázami, tieto môžu byť regulované tiež cez lipidovú signalizáciu. Fosfolipáza D (PLD) je enzým asociovaný s plazmatickou membránou, ktorý uvoľňuje kyselinu fosfatidovú (PA) z fosfatidylcholinu,

fosfatidyletanolaminu a fosfatidylglycerolu. PA je významná ako druhý posol v mnohých odpovediach na stres (Bargmann & Munnik, 2006).

U *A. thaliana* bolo dokázané, že PA sa viaže na MPK6, čo má za následok jej aktiváciu počas soľného stresu (Yu et al., 2010). Aktivovaná MPK6 je zodpovedná za fosforyláciu Na⁺/H⁺ antiportéru SOS1, čo má za následok znížené hromadenie Na⁺ v listoch *Arabidopsis*.

3. Stresové odpovede rastlín

Pôsobenie rôznych abiotických stresov vyúsťuje do všeobecných alebo špecifických vplyvov na rast a vývoj rastlín. Napríklad, sucho obmedzuje rast kvôli zníženej fotosyntéze, osmotický stres a sucho bránia dostupnosti živín pri vysušovaní pôdy. Podobne salinita narušuje rast rastlín, pretože spôsobuje fyziologické sucho a iónovú toxicitu (Zhu, 2002). Chlad (teplota pod optimálnou hranicou, ale nad bodom mrazu) a mrznutie môže tiež spôsobiť osmotický stres v prípade priameho vplyvu na metabolizmus (Thomashow, 1999). Osmotický a s ním spojený oxidatívny stres môžu byť tiež následkom vystavenia rastliny suchu, salinite a nízkej teplote. Pri zabránení osmotickému stresu vyvolanému suchom záleží na minimalizácii strát vody cez prieduchy a zabezpečení maximálneho príjmu vody koreňmi a osmotickej regulácii. Osmotické prispôbenie sa počas soľného stresu hrá významnú úlohu v udržaní osmotickej homeostázy, zatiaľ čo prežitie počas osmotického stresu indukovaného mrznutím môže záležať na zabránení alebo oneskorení tvorby ľadu. Rýchla a lokalizovaná programovaná bunková smrť je známa ako hypersenzitívna odpoveď (HR, Hypersensitive Response). Je často spojená s rezistenciou rastlín na choroby. Extrémna teplota, salinita, sucho, znečistenie a patogény značne ovplyvňujú rast, vývoj a produktivitu rastlín. Aby rastliny prežili, vyvinuli súbor signálnych dráh, ktoré ich chránia pred enviromentálnymi zmenami. Vplyvom rôznych biotických a abiotických stresov, ako je teplo, sucho, zranenia, osmotický šok, UV-B žiarenie, dochádza k tvorbe a hromadeniu reaktívnych foriem kyslíka (ROS- Reactive Oxygen Species), vrátane peroxidu vodíka (H₂O₂), superoxidového aniónu a hydroxylových radikálov (Allen 1995; Inze & Van Montagu, 1995; Bolwell & Wojtaszek 1997; Lamb & Dixon 1997; Noctor & Foyer, 1998; Karpinski et al., 1999; Orozco-Cardenas & Ryan, 1999). ROS sú vysoko reaktívne, toxické a spôsobujú poškodenie proteínov, lipidov a DNA, čo má za následok bunkovú smrť. H₂O₂ je aktívna signálna molekula a jej akumulácia (oxidatívny stres) vedie k rôznym bunkovým odpovediam. Odpovede rastlín sú závislé na H₂O₂ dávkach. Vysoká dávka H₂O₂ má za následok bunkovú smrť (Jabs et al., 1996; Wang et al., 1996; Lamb & Dixon, 1997; Alvarez et al., 1998), zatiaľ

čo nízka dávka H₂O₂ spúšťa odolnosť voči rôznym biotickým a abiotickým stresom (Quan et al., 2008).

Preexponovanie abiotického alebo biotického stresu, ktoré indukujú produkciu alebo akumuláciu H₂O₂, môže spúšťať ochrannú funkciu a „imunizovať“ rastlinu voči rôznym stresovým podmienkam. Tak dochádza k zvyšovaniu tolerancie k mnohonásobným stresom a patogénom (Ryals et al., 1996; Sharma et al., 1996; Alvarez et al., 1998; Chamnongpol et al., 1998; Schweizer et al., 1998).

U *Arabidopsis*, ale aj u mnohých iných rastlinných druhov, sú MAPK kaskády zahrnuté do signálnych dráh aktivovaných abiotickými stresmi ako sú napr. salinita, chlad, teplo, poranenie, UV žiarenie, osmotický šok, ťažké kovy (Šamajová et al. 2013).

4. Stres a funkcie rastlinných MAPK

4.1. Oxidatívny stres a MAPK

Väčšina abiotických stresov ako sú sucho, salinita, stres chladom a teplom narušia metabolickú rovnováhu bunky, čo má za následok oxidatívny stres (Mittler, 2002). Termín oxidatívny stres označuje vplyv oxidácie, v ktorej abnormálna hladina ROS vedie k poškodeniu (oxidatívne poškodenie) špecifických molekúl s následným poškodením buniek alebo tkaniva (Gill & Tuteja, 2010). U mnohých eukaryotov je prenos oxidatívnych signálov kontrolovaný fosforyláciou proteínov zahrnutých v MAPK moduloch (Kyriakis & Avruch, 1996; Gustin et al., 1998). MAP3Ks typu ANP u *A. thaliana* (Nishihama et al., 1997) môžu byť indukované pomocou H₂O₂ a môžu aktivovať stresom-indukované MAPK (Obr. 2). MAPK kaskáda obsahujúca ANP by mohla byť tiež pojitkom medzi oxidačným stresom a rastovým hormónom rastlín auxínom. ANP1 môže spôsobiť aktiváciu MPK3 a MPK6 (Nakagami et al., 2004).

Jedným z mechanizmov prispievajúcim k oxidačnému signálu, ktorý je vyvolaný stresom a toleranciou k patogénom, je aktivácia detoxifikácie a ochrana génovej expresie. Napríklad, rastliny *A. thaliana* odstraňujú alebo neutralizujú ROS prostredníctvom endogénnych alebo exogénnych antioxidantov. Medzi endogénne antioxidanty patria glutatión S-transferázy (GSTs), peroxidázy, superoxid dismutázy a katalázy. Medzi exogénne antioxidanty patria karotenoidy, bioflavonoidy, vitamíny A, C a E.

Vo všeobecnosti antioxidantné enzýmy pomáhajú odstraňovať, eliminovať a neutralizovať ROS. Peroxid vodíka v chloroplastoch a mitochondriách eliminuje askorbát peroxidáza (Foyer & Halliwell, 1976). Účinne ho eliminujú aj katalázy (CAT) a peroxidázy (Scandalios, 1993), zatiaľ čo superoxid dismutáza (SOD) eliminuje

superoxidový anión. Najúčinnějšíe antioxidantné enzýmy sú CAT a SOD. Spoločne premieňajú superoxidový radikál a H_2O_2 na vodu a molekulový kyslík.

SOD (EC 1.15.1.1) znižuje nebezpečenstvo vzniku hydroxylového radikálu zo superoxidu v procese Haber-Weissovej reakcie (Foyer et al., 1994). Nachádza sa v častiach rastliny kde je prítomný elektrónový transport. V závislosti na prítomnosti kovu v aktívnom mieste, rozlišujeme tri typy SOD: Cu/ZnSOD, MnSOD a FeSOD. Cu/ZnSOD sa nachádza v cytoplazme a chloroplastoch eukaryotických buniek, MnSOD sa nachádza v matrici mitochondrií a u prokaryotov, FeSOD sa nachádza u prokaryotov a niektorých rastlín. Jednotlivé izozýmy sa líšia citlivosťou na H_2O_2 a KCN.

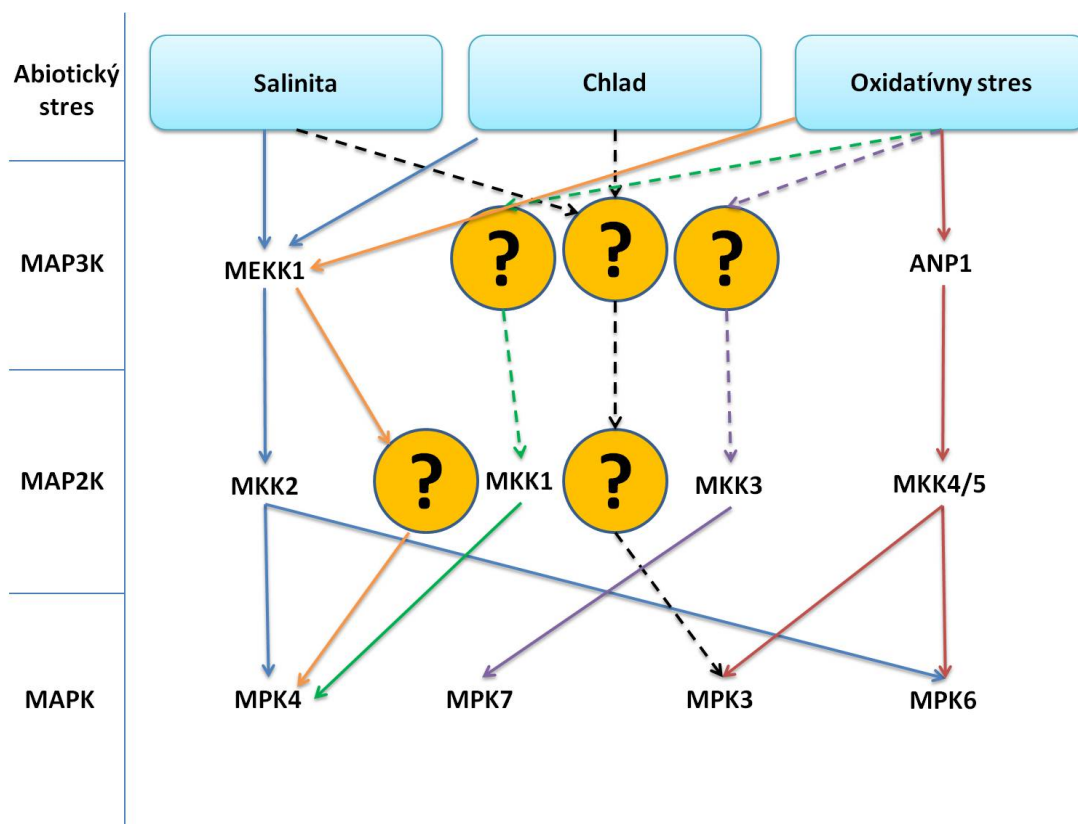
Pri štúdiu oxidatívneho stresu sa často používa paraquat, ktorý patrí k jedným z najpoužívanejších neselektívnych herbicidov. Katalyzuje tvorbu O_2^- .

4.2. Osmotický stres a MAPK

Soľný stres spôsobuje poškodenie rastliny hlavne vnútornou nerovnováhou iónov (Xiong et al., 2002; Zhu, 2002). Regulácia iónovej homeostázy počas soľného stresu je preto kritická pre toleranciu rastliny na tento stres. Jedna z odpovedí rastlinných buniek na stres je zvýšenie cytosolického Ca^{2+} (Knight et al., 1997), následná aktivácia senzoru Ca^{2+} a expresia potrebných proteínov. Identifikácia SOS dráhy (Salt Overly Sensitive) (SOS) u *A. thaliana*, odhalila komponenty a mechanizmy podieľajúce sa na rastlinných odpovediach na osmotický stres. Molekulárna analýza sos mutantov *Arabidopsis* viedla k identifikácii komponentov (SOS1, SOS2 a SOS3) signálnej dráhy, ktorá prenáša soľným stresom indukované Ca^{2+} signály obnovujúce bunkovú homeostázu iónov. Komponenty tejto dráhy boli popísané ako SOS1, Na^+/H^+ antiportér na plazmatickej membráne; SOS2, serín/treonín proteín kináza; a SOS3, calcineurin B proteín viažuci Ca^{2+} (Xiong et al., 2002; Zhu, 2002). Pôsobením soľného stresu sa spúšťa transkripcia SOS1, ktorý transportuje ióny Na^+ do apoplastu. Škodlivá akumulácia Na^+ je signalizovaná SOS2/SOS3 kinázovým komplexom, ktorý sprostredkuje signál cez soľou indukované Ca^{2+} ióny (Xiong et al., 2002; Zhu, 2002).

Predchádzajúce štúdie u *A. thaliana* dokázali, že mRNA MEKK1 sa akumuluje v odpovedi na enviromentálne stresy, vrátane vysokej salinity (Mizoguchi et al., 1996). Enviromentálne signály sú prenášané minimálne dvoma MAPK kaskádami. Jednou je MPK4 kaskáda (MEKK1-MEK1/MKK2-MPK4) a druhá zahŕňa MPK6 a p44MAPK (Ichimura et al., 2000) (Obr. 2). Soľný a chladový stres sú signalizované MAPK dráhou, ktorá zahŕňa aktiváciu MEKK1, MKK2 a následne MPK4 a MPK6 (Teige et al., 2004). Naopak fosfatáza MKP1 hrá negatívnu úlohu v signalizácii soľného stresu cez MPK6

a MPK4 kaskády (Ulm et al., 2002). Osmotický stres u *Arabidopsis* aktivuje expresiu *MPK3*, *MPK4* a *MPK6* génov (Droillard et al., 2002; 2004).



Obr.2 Schematické znázornenie vzájomnej interakcie medzi rôznymi členmi MAPK kaskády. Plné šípky znázorňujú známe dráhy; prerušované šípky ukazujú predpokladané dráhy; otázniky označujú neznáme komponenty kaskády.

4.3. Chladový stres a MAPK

Stres chladom, môže byť klasifikovaný ako chlad (pri teplote 0-15°C) a mrznutie (pri teplote <0°C). V oboch prípadoch nepriaznivo ovplyvňuje rast a vývoj rastlín. Stres chladom spôsobuje inhibíciu metabolizmu a účinkuje aj nepriamo cez chladom indukované osmotické (chlad spôsobuje inhibíciu príjmu vody a mráz spôsobuje bunkovú dehydratáciu), oxidatívne a ostatné stresy. Prispôbenie chladu je proces, ktorým rastliny získajú toleranciu k mrazu na základe predchádzajúceho vystavenia nízkym nemrazivým teplotám (Thomashow, 1999). Odpoveď na stres chladom je veľmi zložitý proces, ktorý zahŕňa veľa rôznych metabolických dráh, reguláciu génov a zmeny v bunkových kompartmentoch (Hannah et al., 2005). *A. thaliana*, ako mnoho ďalších rastlín, zvyšuje svoju odolnosť k mrazu keď je vystavená nemrznúcim teplotám (Xin & Browse, 2000). Keďže bunkové membrány sú kvapalné štruktúry, nízke teploty môžu znížiť ich tekutosť a spôsobiť zvýšenú tuhosť. Rastlinné bunky môžu vnímať chlad cez

zmeny v tekutosti membrány indukované nízkymi teplotami (Orvar et al., 2000). V skutočnosti, tuhnutie plazmatickej membrány vyvolané dimetyl sulfoxidom (DMSO) môže vyvolať expresiu *COR* (cold responsive) génov, a to aj pri normálnej teplote rastu. Naopak, použitie benzylalkoholu (spôsobuje väčšiu tekutosť membrán) zabraňuje expresii *COR* génov pri nízkych teplotách (Sangwan et al., 2001; Orvar et al., 2000). Pôsobením šoku z chladu dochádza k prechodnému zvýšeniu hladiny cytosolického Ca^{2+} (Knight et al., 1991).

MEKK1 a MPK3 sú transkripčne indukované v *A. thaliana* (Mizoguchi et al., 1996), zatiaľ čo MPK4 a MPK6 sú post-translačne aktivované (fosforylované) počas chladového stresu (Ichimura et al., 2000). MAP2K nazývaná MKK2 je nahor-regulovaná v odpovedi na stres chladom (Teige et al., 2004), zatiaľ čo MPK4 a MPK6 sú priame a špecifické substráty MKK2 (Mizoguchi et al., 2000).

4.4. MPK3, MPK4 a MPK6 ako najlepšie študované Arabidopsis MAPK

Najlepšie preštudovanými MAPK u *A. thaliana* sú MPK3, MPK4 a MPK6. Medzi týmito tromi kinázami sa zdá byť významná funkčná redundancia a každá z nich sa vyskytuje vo viacerých signálnych dráhach. Rastliny, ktoré boli vystavené peroxidu vodíka alebo patogénom (tkz. PAMPs Pathogen-Associated Molecular Patterns), reagovali rýchlou aktiváciou kinázovej aktivity MPK3, MPK4 a MPK6 (Ichimura et al., 2006; Nakagami et al., 2006; Suarez-Rodriguez et al., 2007). Aktivácia MPK4 týmito signálmi je nepriamo závislá na MAP3K, ktorá sa nazýva MEKK1, zatiaľ čo aktivácia MPK3 a MPK6 na nej závislá nie je (Ichimura et al., 2006; Nakagami et al., 2006; Suarez-Suarez-Rodriguez et al., 2007). Nadradená MAP2K nazývaná MKK1 priamo aktivuje MPK4 po ošetrení PAMP (Mészáros et al., 2006), zatiaľ čo MKK4 and MKK5 priamo aktivujú MPK3 a MPK6 po vystavení tomu istému stimulu (Asai et al., 2002). Naopak, po chladovom a solnom strese MKK2 priamo aktivuje MPK4 a MPK6 (Teige et al., 2004). Ďalej genotoxický UV-B stres aktivuje len MPK6 (Ulm et al., 2002), zatiaľ čo ošetrenie ozónom aktivuje MPK3 aj MPK6 (Miles et al., 2005). Z uvedeného vyplýva existencia alternatívnych signálnych dráh pre MPK3, MPK4 a MPK6. Počas vývinu rastlín *A. thaliana* MPK3 a MPK6 sú potrebné na správnu reguláciu vytvárania prieduchov v listoch. Absencia MPK3/6 aktivity spôsobuje nadbytok prieduchov, zatiaľ čo nadbytok MPK3/6 aktivity má za následok absenciu prieduchov. Genetické štúdie ukázali, že umlčanie nadradených MAP2Ks MKK4/5 pomocou RNAi technológie má za následok defekty v tvorbe prieduchov (Wang et al., 2007). Pri tvorbe prieduchov je týmto dvom MAP2Ks nadradená MAP3K YODA (Bergmann et al., 2004). Záverom možno

skonštatovať, že MPK3, MPK4 a MPK6 sú zahrnuté v regulácií odpovedí rastliny na stres a vo vývojových dráhach.

Tab. 1 Prehľad najdôležitejších MAP3K, MAP2K a MAPK u *Arabidopsis thaliana* zahrnutých v odpovediach na stres.

Názov	Aktivácia
MAP3K	
ANP1	auxíny, H ₂ O ₂
MEKK1	H ₂ O ₂ , flg22
MAP2K	
MKK1	H ₂ O ₂ , flg22, laminarín
MKK2	soľ, chlad
MKK3	patogén, JA
MKK4	H ₂ O ₂ , PAMPs
MAPK	
MPK3	chlad, soľ, dotyk, ROS
MPK4	chlad, sucho, soľ, dotyk, poranenie, kyselina salicylová hyperosmolarita
MPK6	chlad, sucho, soľ, hyperosmolarita, dotyk, poranenie, ROS, patogény,

5. Cytoskelet

Cytoskelet je komplexná vnútrobunková štruktúra zložená z proteínových vlákien. Predstavuje vysoko dynamickú a premenlivú intracelulárnu kostru, ktorá je u rastlín zložená z mikrotubulov (MT) a aktínových filamentov (AF). Cytoskelet hrá dôležitú úlohu pri prenose signálu z okolia, medzi vyvíjajúcimi sa bunkami a v odpovedi rastlín na vonkajšie podmienky (Dhonukshe et al., 2003; Šamaj et al., 2006; Yang et al., 2008; Wasteneys & Ambrose, 2009). Predpokladá sa vzájomná interakcia medzi cytoskeletom a MAPK modulmi (Nishihama et al., 2002; Šamaj et al., 2002; Limmongkon et al., 2004; Naoi & Hashimoto, 2004; Šamaj et al., 2004a; Smertenko et al., 2006). U rastlín sa cytoskelet podieľa na vzniku bunkovej polarite, bunkovom delení, morfogénéze, regulácii vezikulárneho transportu, endocytóze, exocytóze a sprostredkovaní intracelulárnej motility organel (Šamaj et al., 2006; Boutte et al., 2007; Panteris 2008; Yang, 2008, Wasteneys & Ambrose 2009).

Kontrola roviny delenia je kľúčovým prvkom morfogénzy buniek. Keď sa bunka pripravuje na mitózu, jadro obklopené aktínovými filamentami migruje do miesta kde sa formuje potenciálna rovina delenia. V rovnakom čase, radiálne mikrotubuly, ktoré vychádzajú z jadrového obalu sa spájajú s kortikálnym cytoskeletom. Potom sa MT preprofáznym zväzkom (PPB Pre-Prophase Band) stanoví a vyznačí miesto a orientáciu budúcej roviny delenia. Ďalšou MT štruktúrou je deliace vretienko, ktoré slúži na rozdelenie chromozómov. Akonáhle sa chromozómy posunú k dvom protiahlym pólom, tak sa počas neskorej anafázy *de novo* vytvorí mikrotubulárny fragmoplast v rovine, ktorá bola predtým označená pomocou PPB.

U vyšších rastlín sa vyskytuje niekoľko jedinečných MT cytoskeletálnych štruktúr ako kortikálne MT, preprofázny zväzok (PPB) a fragmoplast. Kortikálne MT majú dôležitú úlohu v polárnej expanzii buniek a spoluurčujú rovinu ukladania mikrofibríl celulózy do bunkovej steny (Chu et al., 2007; Paredez et al., 2008; Sieberer et al., 2009). Fragmoplast je špecifický cytokinetický aparát vyskytujúci sa u rastlín a je priamo zapojený do transportu vezikúl potrebných pri tvorbe novej bunkovej steny. Schopnosť rastlinných buniek dynamicky meniť svoj tvar závisí na schopnosti regulovať ukladanie niekoľkých vrstiev celulózných mikrofibríl, ktoré majú priečnu orientáciu na smer predlžovania bunky.

AF a MT sa môžu predlžovať a skracovať polymerizáciou alebo depolymerizáciou základných stavebných jednotiek na oboch koncoch. MT sú biopolyméry zložené z dimérov α - a β -tubulínu. Tieto diméry polymerizujú do takzvaných protofilamentov, ktoré sa potom špirálovito ukladajú do dutého cylindrického polyméru nazývaného mikrotubulus. MT sa predlžuje pridaním heterodimérov tubulínu na jednom (plus) konci, zatiaľ čo opačný (mínus) koniec sa nepredlžuje alebo naopak stráca tubulínové diméry. AF vznikajú polárnou polymerizáciou z globulárneho G-aktínu (monomér). Polymerizácia prebieha na takzvanom ostnatom konci a depolymerizácia na opačnom ostrom konci filamentu.

V rovnovážnom stave zodpovedá rýchlosť polymerizácie rýchlosti depolymerizácie. Funkčná všestrannosť je uľahčovaná flexibilnou organizáciou cytoskeletu, ktorú u MT umožňuje takzvaný „treadmilling“.

Správanie AF a MT je ovplyvnené proteínmi, ktoré sa na ne špecificky viažu alebo sú s nimi asociované, podľa čoho dostali aj mená Microtubule Associated Proteins (MAPs) a Actin Binding Proteins (ABPs) (Hamada 2007; Higaki et al., 2007). Zo štúdií živočíšnych buniek je známe, že MAPK môžu regulovať cytoskelet priamou asociáciou s elementami cytoskeletu alebo fosforyláciou proteínov viažúcich sa na cytoskelet (Hai & Gu, 2006; Pullikuth & Catling, 2007; Gerthoffer, 2008). MAPK neregulujú

správanie MAPs a ABPs len fosforyláciou, ale zdá sa že aj vytváraním komplexov s cytoskeletálnymi proteínmi.

V rastlinných bunkách, ktoré sa práve nedelia, sa obyčajne cytoskelet zoskupuje do dvoch foriem v podobe kortikálnych a radiálnych (transvakuolárnych) MT a AF. Radiálne MT a AF siahajú od jadra do bunečnej periférie. Zatiaľ čo kortikálne MT a AF sa nachádzajú na periférií (kortexe) buniek hneď pod plazmatickou membránou. Pri raste bunky sú kortikálne MT umiestnené v paralelných prstencoch, ktoré obklopujú bunku. Predlžovanie bunky sa uskutočňuje v smere, ktorý je kolmý na kortikálne MT. Z toho vyplýva, že usporiadanie a orientácia kortikálnych MT sú dôležité pre riadenie smeru, ktorým sa bunka predlžuje. Narušenie MT farmakologickým ošetrovaním alebo mutáciou zastavuje predlžovanie bunky a táto sa začína rozširovať radiálne (Kaskin et al., 1994; McClinton & Sung, 1997; Whittington et al., 2001; Sugimoto et al., 2003; Wasteneys & Fujita, 2006; Ambrose et al., 2007; Wasteneys & Collings, 2007). Existuje niekoľko mutácií, ktoré menia organizáciu kortikálnych MT. Rastliny s týmito mutáciami majú defekty v kontrole riadenia bunečného predlžovania.

Reorganizácia cytoskeletu je pevne spojená s mechanizmom signalizácie. Kortikálne MT určitých typov buniek (napríklad v stonkovom meristéme) sú schopné prijať informáciu z prostredia (napríklad mechanické stimuly), čo môže ovplyvniť ich morfogénu. Zmeny v MT môžeme rozdeliť do štyroch skupín: reorientácia, dezorganizácia/rozklad, zväzkovanie a posttranslačné modifikácie.

5.1. Reorientácia

Usporiadanie kortikálnych MT a AF sa v interfáze často mení v závislosti na rôznych podnetoch. Reorientácia MT je spojená s tropistickými rastovými signálmi, ako je gravitácia, svetlo a dokonca mechanická sila (Fischer & Schopfer, 1998). V koleoptilách a hypokotyle slnečníc sú kortikálne MT vonkajšej epidermy zoskupené paralelne s náhodným usporiadaním uhlov. Reorientácia MT je aktivovaná zmenou osi rastu gravitropickým, alebo fototropickým podnetom. Náhodné usporiadanie sa zmení do priečného vzoru, ktorý je kolmý k pozdĺžnej ose.

5.2. Dezorganizácia/rozklad

Vystavenie rastlinných buniek biotickému alebo abiotickému stresu môže mať za následok dezorganizáciu alebo rozklad MT. Rozklad MT bol pozorovaný ako odpoveď buniek na nízke a vysoké teploty. Hoci stupeň rozkladu MT sa líši v závislosti na citlivosti ku chladu u príslušných rastlín.

5.3. Zväzkovanie

Zväzkovanie MT má dôležitú úlohu pri ich organizácii a funkcii. Acentrozomálne interfázne MT v kortexe rastlinných buniek sú silne zviazané a ich priestorová organizácia určuje smer expanzie bunky (Wasteneys & Ambrose, 2009). Kortikálne MT sú vysoko dynamické a často interagujú s ostatnými MT (Shaw et al., 2003). Tieto interakcie vedú k tvorbe zväzkov kortikálnych MT. Na zväzkovaní MT sa podieľajú členovia MAP65 rodiny. Genóm *Arabidopsis* kóduje deväť MAP65 proteínov, z ktorých MAP65-1, MAP65-2, MAP65-5 a MAP65-8 sú lokalizované na kortikálnych MT *in vivo* (Hussey et al., 2002; Van Damme et al., 2004; Smertenko et al., 2008). Najlepšie preštudovaná izoforma u *Arabidopsis* je MAP65-1.

5.4. Posttranslačné modifikácie

Stavebné jednotky MT, heterodiméry α - a β -tubulínu, podliehajú posttranslačným modifikáciám akými sú acetylácia, glutamylácia, fosforylácia a cyklická detyrozinácia/tyrozinácia (Hammond et al., 2008). Napríklad, všetky eukaryotické α -tubulíny nesú konzervovaný karboxyterminálny tyrozín, ktorý môže byť vyštiepený a spätne pripojený špecifickými enzýmami. Takýto tubulín zbavený tyrozínu je dominantný v stabilných MT, zatiaľ čo nestabilné MT obsahujú hlavne tubulín s tyrozínom. Tieto modifikácie hrajú úlohu nielen v regulácii vlastností MT, ale pravdepodobne ovplyvňujú aj bunkové funkcie MT.

Rôzne izotypy tubulínu boli popísané počas mikrotubulárnej reorientácie spustenej signálom (Duckett & Lloyd, 1994). Niektoré izotypy tubulínu môžu byť rozlíšené na základe špecifických protilátok, ktoré rozlíšia tyrozinovaný a detyrozinovaný α -tubulín (YL1/2 and YOL1/34). Detyrozinácia má za následok zvýšenie životnosti a dĺžky MT (Skoufias & Wilson, 1998). Pozdĺžne MT majú dlhšiu životnosť v porovnaní s priečnymi MT, takže stabilita jednotlivých MT je určená aj ich orientáciou (Wiesler et al., 2002).

Nedávna štúdia (Jovanovič et al., 2010) poukázala na význam posttranslačných modifikácií tubulínu pre reguláciu bunkového cyklu u rastlín. Ireverzibilná nitrotyrozinácia α -tubulínu (začlenením nitrotyrozínu (NO_2Tyr) namiesto tyrozínu) môže inhibovať bunkové delenie a stimulovať predĺžovanie buniek s dezorientáciou priečnych stien.

6. Bunkové delenie

Rastlinné MAPK hrajú centrálnu úlohu pri bunkovom delení pričom niektoré MAPK sú prechodne indukované počas mitózy. Cytokinéza u rastlín zahŕňa špecifický súbor mikrotubulov (MT) známy ako fragmoplast. U rastlín, MAPK kaskáda kontroluje dynamiku MT vo fragmoplaste a umožňuje expanziu fragmoplastu, ktorá je dôležitá pre postupnú cytokinézu (úplné rozdelenie dcérskych buniek). Takzvaná NACK-PQR dráha, ktorá zahŕňa MAPK kaskádu potrebnú pre rastlinnú cytokinézu, je aktivovaná počas neskorej M-fázy a je konzervovaná u tabáku a *A. thaliana*. Táto dráha sa u tabáku skladá z kinezínov NACK1 (NPK1-activating kinesin 1) a NACK2, MAP3K nazývanej NPK1 (nucleus- and pfragmoplast-localized protein kinase 1), MAP2K nazývanej NQK1/NtMEK1 a MAPK nazývanej NRK1/NTF6 (Nishihama et al., 2001, 2002; Ishikawa et al., 2002; Soyano et al., 2003). NPK1 je exprimovaná v deliacich sa bunkách počas M-fázy a interaguje s motorovými proteínmi NACK1 a NACK2, ktoré ju aktivujú. Oba tieto proteíny sú lokalizované v centrálnej rovine deliaceho vretienka a fragmoplastu deliacich sa buniek tabáku (Nishihama & Machida, 2000) podobne ako NPK1, NQK1/NtMEK1 a NRK1/NTF6 (Calderini et al., 1998; Nishihama et al., 2001, 2002). Aktivita komponentov v NACK-PQR dráhe je regulovaná nadol po depolymerizácii mikrotubulov. NACK1 je potrebný predovšetkým na lokalizáciu NPK1 do strednej zóny fragmoplastu (Nishihama et al., 2002). Pre mutantov NACK a NPK1 v tabakových BY-2 bunkách sú typické defekty v cytokinéze. To naznačuje, že NACK1 a NPK1 sú potrebné pre cytokinézu (Ishikawa et al., 2002; Nishihama et al., 2002). Aktivovaná NRK1 následne fosforyluje MAP65 (microtubule associated protein 65) vo fragmoplaste (Soyano et al., 2003; Sasabe et al., 2006). Aktivita tejto signálnej dráhy je spojená s dynamickými vlastnosťami MT vo fragmoplaste (Nishihama et al., 2001, 2002; Ishikawa et al., 2002; Soyano et al., 2003; Sasabe et al., 2006). *Arabidopsis* gény *AtNACK1/HINKEL*, *ANP1* (*ANP2* a *ANP3*) *ANQ1/MKK6* a *MPK4*, ktoré sú ortológmi tabakových génov *NACK1*, *NPK1*, *NQK1* a *NRK1*, sú taktiež potrebné pre cytokinézu buniek u tohto rastlinného druhu (Nishihama et al., 1997; Krysan et al., 2002; Nishihama et al., 2002; Strompen et al., 2002; Soyano et al., 2003; Tanaka et al., 2004; Kosetsu et al., 2010; Takahashi et al., 2010). Mutácia v *HIK/AtNACK1* ovplyvňuje organizáciu a expanziu fragmoplastu počas cytokinézy (Strompen et al., 2002). Podobne, ANP a MPK4 kinázy pozitívne regulujú bunkové delenie a rast a v ich mutantoch sú pozorované poruchy cytokinézy (Krysan et al., 2002, Beck et al. 2010, 2011). NRK1 u tabáku a MPK4 u *Arabidopsis* sú členmi ERK podrodiny MAPK. ERK1/2 v ľudských bunkách sú lokalizované v strednej zóne vretienka a inhibícia ERK dráhy vedie k poruchám delenia rakovinových HeLa buniek (Sharipo et al., 1998;

Zecevic et al., 1998; Kasahara et al., 2007). Tieto pozorovania podporujú hypotézu, že ERK1 potenciálne reguluje cytokinézu v bunkách živočíchov.

Cytoskelet, hlavne PPB hrajú kľúčovú úlohu v určení roviny bunkového delenia. Signály ako svetlo, elektrické pole, gravitácia a iónový gradient spôsobujú asymetrické bunkové delenia (Nick, 1999a). Po rozdelení chromozómov počas mitózy, dochádza u rastlín k vytvoreniu fragmoplastu, ktorý sa skladá hlavne z usporiadaných MT a AF. Funkcie MAP a proteínov ako kinezín (KLPs) sú počas mitózy u živočíchov a kvasiniek kontrolované pomocou fosforylácie Polo kinázami a proteín kinázami závislými na cyklínoch (CDKs). Rastliny majú unikátny typ CDK, nazývaný CDK-B, ktorý je exprimovaný špecificky v M-fáze a tvorí komplexy s cyklínom A a B. CDK-B majú modifikovanú PSTAIRE sekvenciu, ktorá je všeobecne motívom pre väzbu s cyklínmi (Hirayama et al., 1991; Proceddu et al., 1999).

Cytokinéza u rastlín je zabezpečená laterálnou expanziou fragmoplastu. Expanzia fragmoplastu je sprostredkovaná tromi hlavnými molekulárnymi procesmi: zmenou MT (Yasuhara et al., 1993; Yasuhara & Shibaoka, 2000), syntézou bunkovej steny (Zuo et al., 2000) a regeneráciou endomembrán (Lukowitz et al., 1996). Tieto tri procesy sú regulované usporiadaným spôsobom, pretože inhibícia akéhokoľvek z nich blokuje expanziu bunkovej platničky. SIMK je MAPK z *Medicago sativa*, ktorá interaguje s MT aj AF. Bola lokalizovaná do fragmoplastu po soľnom strese (Baluška et al., 2000) a po stabilizácii mikrotubulov taxolom (Šamaj et al., 2004b). Ostatné MAPK boli tiež lokalizované do fragmoplastu (Calderini et al. 1998; Bögre et al. 1999). Dynamiku MT a ich ukladanie do zväzkov regulujú proteíny z rodiny MAP65. U *A. thaliana* bolo dokázané, že MAP65-1 asociuje s kortikálnymi MT a pri cytokinéze je negatívne regulovaný pomocou MPK4 a MPK6 čo spôsobuje potrebnú dynamiku MT pri expanzii fragmoplastu (Smertenko et al., 2006).

Soľný stres môže indukovať zväzkovanie AF, avšak dlhodobé vystavenie soľnému stresu depolymerizuje AF (Wang et al., 2010). MT depolymerizujú a potom repolymerizujú keď sú semenáčky *A. thaliana* vystavené soľnému stresu. Počiatočná depolymerizácia MT vzniká pri nízkych i vysokých koncentráciách NaCl, ktorým sú semenáčky vystavené. Pri vyšších koncentráciách je oveľa nižší počet buniek s repolymerizáciou MT ako pri nízkych koncentráciách (Wang et al., 2007). Ak je počiatočné poškodenie MT vyvolané oryzalinom (inhibitor depolymerizujúci MT) počet buniek obnovujúcich MT je zvýšený. To znamená, že pôvodne narušené MT majú blízky vzťah s reorganizáciou nových MT.

EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

7. Materiál

7.1. Použité prístroje

Chemikálie na prípravu médií a roztokov boli vážené na predvážkach od firmy Belengineering (Taliansko) a na analytických váhach XA110/2X od firmy Radwag (Česká republika). Roztoky boli homogenizované prostredníctvom magnetického miešadla MSH-420 od firmy Boeco (Nemecko) a pH bolo upravené použitím pH metra PL-600 Lab pH Meter od firmy MRC Lab (Turecko). Manipulácia s látkami dráždivými, zdraviu škodlivými a prchavými prebiehala v digestore od firmy Merci (Česká republika). Práca za sterilných podmienok bola vykonávaná v laminárnom boxe firmy Faster (Taliansko). K homogenizácii vzoriek bol použitý vortex od firmy Labnet (USA). Inkubácie prebiehali v inkubátore orbital shaker incubator ES-20 od firmy Grant Bio (USA). Vzorky boli stáčané za použitia centrifúg Model 16K microcentrifuge od firmy Bio-Rad (USA), Spectrafuge™24D microcentrifuge od firmy Labnet (USA) a ScanSpeed Micro 1730R minicentrifuge firmy Labgene (Švajčiarsko). Koncentrácia proteínov bola stanovená pomocou UV/VIS sprektrofotometra SmartSpec™plus Spectrophotometer od firmy Bio-Rad (USA). Skenovanie semenáčikov bolo uskutočnené pomocou skenera Image Scanner 3 od firmy Epson (Japonsko). Mikroskopická analýza fenotypov semenáčikov bola uskutočnená pod binokulárnym mikroskopom Leica M165FC (Nemecko), ktorý bol vybavený CCD kamerou Leica Microsystem (Nemecko). Imunocytochemické vzorky boli vyhodnotené pomocou konfokálneho mikroskopu LSM 710 od firmy Zeiss (Nemecko). Natívna elektroforéza bola uskutočnená pomocou Mini-PROTEAN 3 Cell 39 od firmy Bio-Rad (USA). Gély boli fotené pomocou zariadenia ChemiDoc™Mp imaging system od firmy Bio-Rad (USA).

7.2. Chemikálie

Desert Biological:	meiceláza
Duchefa Biochemie:	Murashige&Skoog medium, Basal salt mixture, kanamycín,
Serva:	celluláza, macerozýn, nitroblue tetrazolium (NBT),
Serotec:	monoklonálna protilátka anti- α -tubulín YOL1/34
Sigma Aldrich:	chlorid sodný (NaCl), sacharóza, formaldehyd, glutaraldehyd, tetrahydroboritan sodný (NaBH ₄), hovädzí sérový albumín (BSA), hypochlorid sodný 10%, Tween 20 Bioextra, fytagél, chlorid draselný (KCl), dihydrát

dihydrogenfosforečnan sodný ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$),
dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4), nonidet P-40,
dimethylsulfoxid (DMSO), PIPES, heptahydrát síranu
horečnetého ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 4',6-Diamidino-2-
phenylindole (DAPI), paraquat, peroxid vodíka (H_2O_2),
acrylamide/bis-acrylamide, Bradfordový reagent, glycerol,
glycín, kyanid draselný (KCN), N,N,N',N'-
Tetrametyletyléndiamín (TEMED), riboflavín, kyselina
askorbová

Invitrogen: Alexa 488 konjugovaná sekundárna protilátka (goat anti-
rat)

7.3. Roztoky a média

Sterilizačný roztok

5 ml natrium hypochloridu (12%)
95 ml dH_2O
pár kvapiek TWEEN

½ MS médium

2,2 g/l MS salts (Micro and Macro elements, Duchefa M0231)
10 g/l sacharóza
6 g/l fytagél
 dH_2O , pH 5,8

PBS

0,14 M NaCl
2,7 mM KCl
6,5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
1,5 mM KH_2PO_4
 dH_2O pH 7,3

MTSB

50 mM PIPES
5 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
5 mM EGTA
 dH_2O , pH 6,9

EGTA (0,5 M zásobný roztok)

3,8 g EGTA
10 ml dH₂O
pH 8

Fixačný roztok

500 µl MTSB
188 µl paraformaldehyd (8 %)
20 µl glutaraldehyd (25 %)
292 µl dH₂O

Redukčný roztok

50 mg NaBH₄
50 ml PBS

Permeabilizačný roztok

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

DAPI (zásobný roztok)

10mM DAPI v DMSO

Zalievacie médium na preparáty

100 mg p-phenylendiamín
90 % glycerol
10 % PBS

Príprava 10% deliaceho gélu

2,5ml 40% acrylamide (37,5:1)
2,5ml 0,5M Tris-HCl, pH 8,8
4,95ml dH₂O
0,005ml TEMED
0,05ml APS

Príprava 4% zaostrovacieho gélu

0,5ml	40% acrylamide (37,5:1)
1,26ml	0,5M Tris-HCl, pH 6,8
3,23ml	dH ₂ O
0,005ml	TEMED
0,025ml	APS

Elektródový pufo

3g	Tris-base
14,4g	glycín
	dH ₂ O

8. Metódy

8.1. Povrchová sterilizácia semien

Semená *A. thaliana* boli nasýpané do eppendorfky a zaliate sterilizačný roztok. Eppendorfky so semenami boli umiestnené na trepačke počas 7 min. Po viacnásobnom premytí (minimálne 5x) semien dH₂O v laminárnom boxe boli semená prenesené na sterilný filtračný papier v Petriho miske. Po vysušení filtračného papiera bola Petriho miska uzavretá parafilmom a skladovala sa pri 4°C.

8.2. Fenotypová analýza

Na fenotypovú analýzu boli použité knockout mutanty *mpk6-2* a *mpk4* (s T-DNA inzerciami v *MPK6* a *MPK4* génoch, oba v Col-0 základe) a dvojitý homozygotný mutant v *MAPKKK* génoch *ANP2* a *ANP3* nazývaný *anp2anp3* vo Ws (Wassiljevskija) základe. Semená mutantov a divokých typov boli vysadené na štvorcové Petriho misky s 1/2 MS médiom bez vitamínov. Petriho misky s 1/2 MS médiom boli inkubované vo vertikálnej polohe v kultivačnej miestnosti pri konštantných podmienkach (22°C; 16 hodín svetlo, 8 hodín tma). Rýchlosť rastu koreňa semenáčikov divokých typov a mutantov bola zaznamenávaná pomocou skenovania po dobu 8 dní. Na fenotypové štúdium semenáčikov bol použitý binokulárny mikroskop.

8.3. Pôsobenie soľného, osmotického a chladového stresu

Semená *A. thaliana* (divoký typ Col-0 a Ws a mutanti *mpk4*, *mpk6-2* a *anp2anp3*) boli vysadené na 1/2 MS médium, uložené na 48 hod pri 4°C a potom kultivované vo vertikálnej polohe v kultivačnej miestnosti (22°C; 16 hodín svetlo, 8 hodín tma). Po 3 dňoch kultivácie boli klíčence opatrne, tak aby nedošlo k ich poškodeniu, prenesené na

štvorcové Petriho misky, ktoré obsahovali ½ MS médium bez vitamínov s pridaním 75mM, 100mM a 150mM NaCl, 3%, 5% sacharózy alebo 0,1µM paraquatu. Petriho misky boli naďalej inkubované vo vertikálnej polohe v kultivačnej miestnosti pri konštantných podmienkach (22°C; 16 hodín svetlo, 8 hodín tma). Počas chladového stresu boli Petriho misky s klíčencami inkubované pri teplote 4°C. Po dobu 5 dní boli zaznamenávané zmeny v dĺžke koreňa divokých typov a mutantov pomocou skenovania.

8.4. Imunolokalizácia mikrotubulov metódou „whole-mount“

Semená *A. thaliana* (divoký typ Col-0 a Ws a mutanti *mpk4*, *mpk6-2* a *anp2anp3*) boli vysadené na ½ MS médium, uložené na 48 hod pri 4°C a potom kultivované vo vertikálnej polohe v kultivačnej miestnosti (22°C; 16 hodín svetlo, 8 hodín tma). Po 3 dňoch kultivácie boli klíčence opatrne, tak aby nedošlo k mechanickému poškodeniu, prenesené na štvorcové Petriho misky, ktoré obsahovali ½ MS médium bez vitamínov s pridaním 75mM NaCl, 100mM NaCl, 150mM NaCl, 3%, 5% sacharózy, alebo 0,1µM paraquatu. Petriho misky boli naďalej inkubované vo vertikálnej polohe v kultivačnej miestnosti pri konštantných podmienkach (22°C; 16 hodín svetlo, 8 hodín tma). Počas chladového stresu boli Petriho misky s klíčencami inkubované pri teplote 4°C.

Po 2 dňoch (stres chladom) alebo 3 dňoch (75mM, 100 a 150 mM NaCl, 3% a 5% sacharóza, 0,1µM paraquat) boli semenáčky počas 1 hod fixované vo fixačnom roztoku za použitia vákua. Fixované rastliny boli dvakrát po 10 min premyté v ½ MTSB a trikrát po 10 min v PBS. Voľné aldehydové skupiny boli zredukované redukčným roztokom. Bunkové steny boli natrávené zmesou enzýmov, ktorá obsahovala 1% [w/v] cellulázu, 1% [w/v] meicelázu, 1% [w/v] macerozým v PBS, pri 37°C po dobu 30 min. Semenáčky boli štyrikrát premyté v PBS (každé premývanie trvalo 5min) a následne boli 1 hodinu inkubované v permeabilizačnom roztoku pri izbovej teplote. Po premytí (štyrikrát po 10 min v PBS) boli vzorky hodinu blokované roztokom 3% [w/v] BSA v PBS pri izbovej teplote. Nasledovala inkubácia s primárnou potkaňou monoklonálnou protilátkou anti-α-tubulín YOL1/34, ktorá bola rozriedená v PBS s 2% BSA v pomere 1:300. Inkubácia prebiehala pri teplote 4°C cez noc. Vzorky boli potom šesťkrát premyté v PBS a inkubované s fluorescenčne značenou sekundárnou protilátkou rozriedenou v PBS s 2% BSA v pomere 1:500. Inkubácia prebiehala po dobu 3 hodín (1,5 h pri 37°C a 1,5 h pri izbovej teplote). Semenáčky boli štyrikrát premyté po 10 min v PBS. Nasledovalo farbenie pomocou DAPI (10 min) pri izbovej teplote. Zásobný roztok DAPI bol rozriedený s PBS v pomere 1:1000. Po trojnásobnom premytí (vždy po 10 min) v PBS boli vzorky prenesené na podložné sklíčka do zalievacieho média,

prikryté krycími sklíčkami a preparáty boli uzavreté lakom na nechty. K vyhodnoteniu vzoriek bol použitý laserový konfokálny mikroskop (Zeiss LSM 710). Alexa 488 bola excitovaná laserom s vlnovou dĺžkou 488 nm a detekovaná pri 498-532 nm. Fluorescenčná farbička DAPI bola excitovaná laserom s vlnovou dĺžkou 488 nm a detekovaná v rozsahu 410-470 nm.

8.5. Farbenie nitroblue tetrazoliom (NBT)

Na farbenie boli použité celé semenáčky divokého typu *Ws* a mutanta *anp2anp3*, ktoré boli na tretí deň po vyklíčení prenesené na ½ MS médium bez vitamínov s pridaním 0,1µM paraquatu. Na 3. deň kultivácie boli korene farbené v roztoku 2mM nitroblue tetrazolia (NBT) v 20mM fosfátovom pufre (pH 6,1) počas 6 min. Reakcia bola zastavená prenesením semenáčikov do destilovanej vody. Korene boli pozorované binokulárnym mikroskopom (Leica M165FC) vybaveným CCD kamerou (Leica Microsystems).

8.6. Natívna elektroforéza

Korene a listové ružice 18 dňových semenáčikov divokého typu *Ws* a mutanta *anp2anp3* boli zamrazené v tekutom dusíku. Biologický materiál bol rozotretý vo vychladenej trecej miske pomocou tĺčika s pridaním extrakčného pufru a piesku. Následne bol homogenát prenesený do 1,5ml eppendorfky a centrifugovaný 15min pri 13 000g a 4°C. Po centrifugovaní boli supernatanty odsolené a koncentrované za použitia kolóniek AMICON ULTRA-10K. Po centrifugácií (5min, 4°C, 14 000g) boli vzorky zahustene glycerolom (výsledná koncentrácia glycerolu bola 5%) a zafarbené 0,4µl brómfenolovej modrej. Obsah bielkovín bol stanovený metódou podľa Bradfordovej. Proteíny boli separované na 10 % deliacom géle a 4 % zaostrovacom géle (600V; 30mA; 3h). Do každej dráhy bola nanosená identická koncentrácia proteínov (20 µg). Po skončení elektroforézy sa jeden gél inkuboval 15 min vo fosfátovom pufri (pH 7,8), druhý gél sa inkuboval vo fosfátovom pufri s pridaním kyanidu draselného a tretí gél sa inkuboval vo fosfátovom pufri s pridaním H₂O₂. Po skončení inkubácie boli gély prepláchnuté fosfátovým pufrom a inkubované vo fosfátovom pufri s pridaním NBT počas 15 min v tme. Nakoniec sa gély inkubovali vo fosfátovom pufri s pridaním riboflavínu, TEMEDU a EDTA 15 min v tme a následne vyvolávali za pužitia svetla.

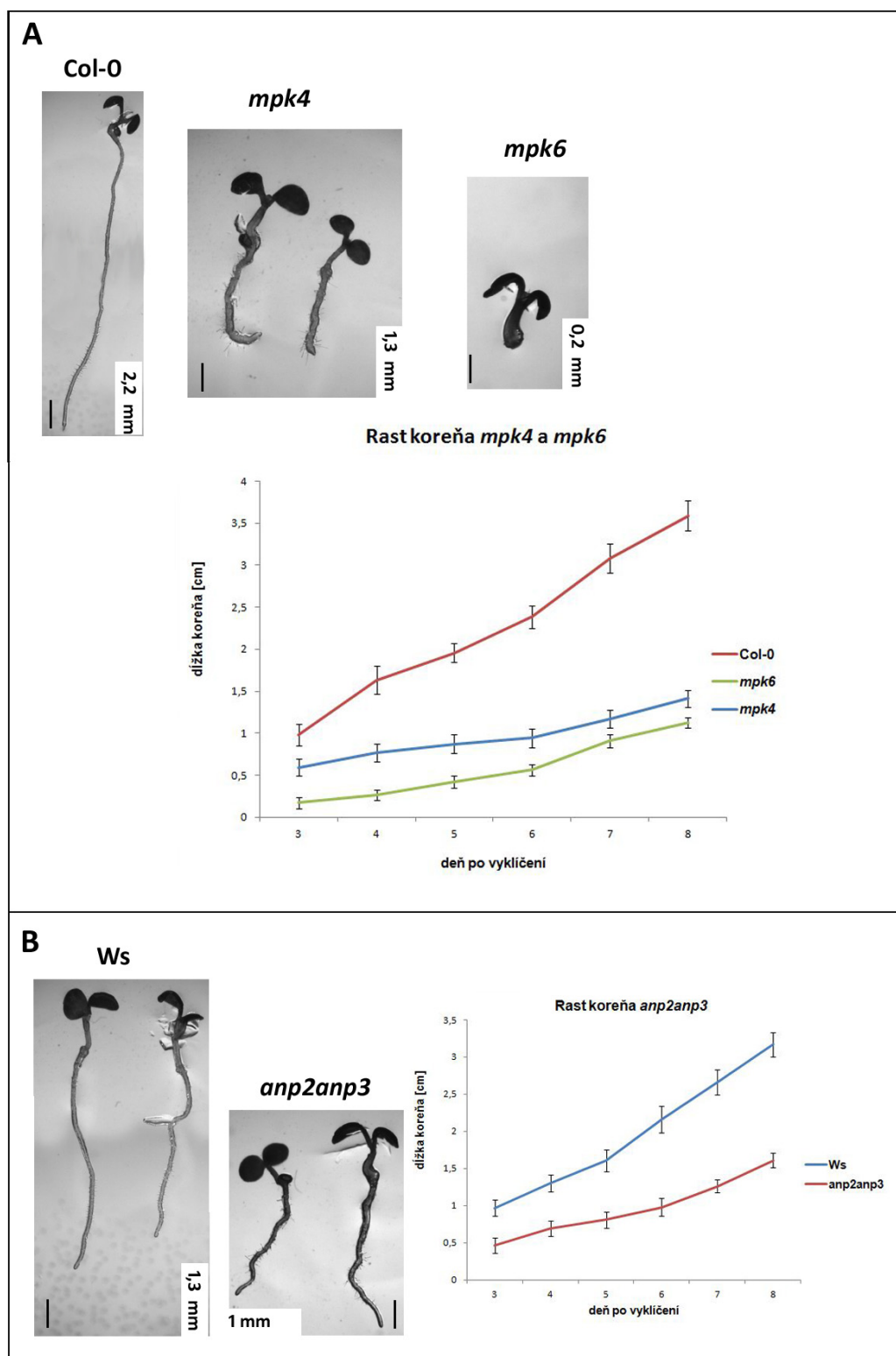
9. Výsledky

Výsledky dosiahnuté počas diplomovej práce sú uvedené v nasledujúcej kapitole a sú rozdelené na tri časti. V prvej časti boli študované fenotypy koreňov *mpk4*, *mpk6-2* a *anp2anp3* mutantov. Získané výsledky boli porovnané s doteraz známymi fenotypovými štúdiami jednotlivých mutantov. V ďalšej časti sa sledoval vplyv stresových podmienok (osmotický, oxidatívny a chladový stres) na fenotyp mutantov a divokých typov. Následne sa imunocytochemicky študoval vplyv stresových faktorov na cytoskelet jednotlivých mutantov metódou „whole mount“. V ďalšej časti sa histochemicky sledovala distribúcia superoxidu u rastlín vystavených oxidatívne stresu. V poslednej časti tejto kapitoly sú prezentované výsledky biochemických štúdií.

9.1. Charakterizácia fenotypov koreňov u *mpk4*, *mpk6-2* a *anp2anp3* mutantov

Na charakterizáciu koreňových fenotypov *mpk4*, *mpk6-2* a *anp2anp3* mutantov a príslušných divokých typov (Col 0 a Ws) boli semená vysadené na ½ MS médium bez vitamínov a spevnené fytagélom. Mikroskopickú analýzu sme začali u 3 dňových semenáčikov. V porovnaní so semenáčikmi divokého typu, semenáčky všetkých mutantov ukazujú spomalený rast a skrátene korene (Obr.3 A a B). Korene *mpk4* mutantu a *anp2anp3* dvojitého mutantu boli zdurené (Obr. 3 A a B). Typický fenotyp „bez koreňa“ alebo „skrátene koreň“ u *mpk6-2* mutantu je ukázaný na Obr. 3 A a 4 B. Tieto dva typy fenotypov sú len dočasné a u 6 dňových semenáčikov *mpk6-2* mutantu sa začínali vyvíjať normálne korene. Silná dominancia adventívnych koreňov sa začína objavovať u 10 dní starých semenáčikov *mpk6-2* mutantu (Obr. 4 B).

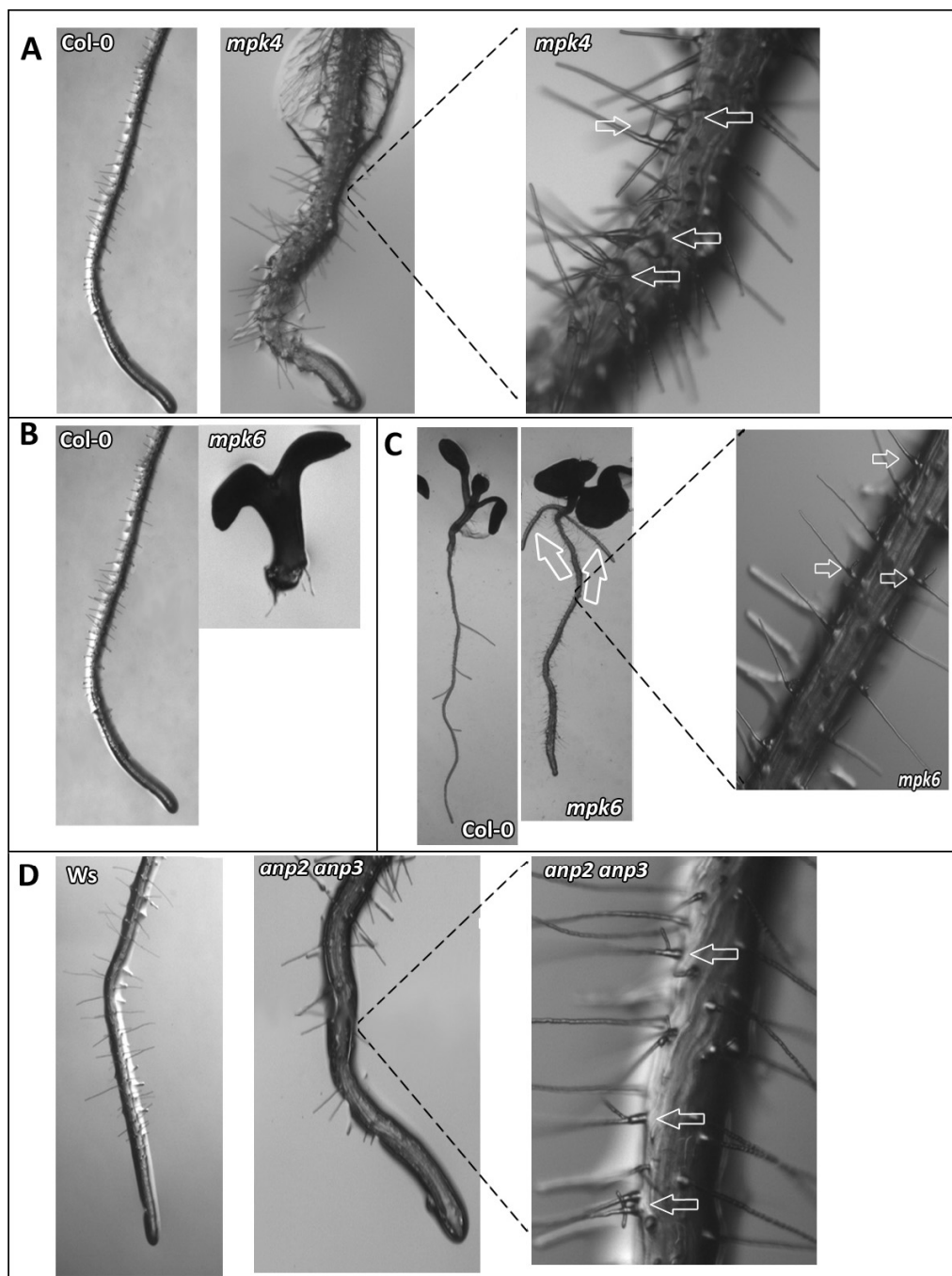
Detailnejšou mikroskopickou analýzou koreňov mutantov *mpk4*, *mpk6-2* a *anp2anp3* boli zistené abnormality vo fenotypoch koreňových vláskov v porovnaní s koreňovými vláskami u oboch divokých typov (Obr. 4 A, C a D). Väčšina koreňových vláskov *mpk4* mutantu mala atypické formy, ako sú napríklad trojité vetvenie koreňových vláskov, zhrubnuté bázy koreňových vláskov alebo atypické trubicovité formy (Obr. 4 A).



Obr.3 Fenotypy a rast koreňa kontrol, *mpk4*, *mpk6-2* a *anp2anp3* mutantov.

A Reprezentatívne obrázky 4 dňových semenáčikov Col-0, *mpk4*, *mpk6* mutantov a grafické znázornenie rastu koreňa semenáčikov. Korene *mpk4* rastlín dosiahli len $\frac{1}{3}$ z dĺžky kontrolných rastlín na 8 deň po vyklíčení. Semenáčiky *mpk6* mutanta ukazujú fenotyp "bez koreňa".

B Reprezentatívne obrázky 4 dňových semenáčikov Ws a *anp2anp3* mutanta a grafické znázornenie rastu ich koreňov. Semenáčiky mutanta majú redukovaný rast koreňa. Korene *anp2anp3* rastlín dosiahli $\frac{1}{2}$ z dĺžky kontrolných rastlín.



Obr.4 Porovnanie koreňového fenotypu medzi Col-0, *mpk4*, *mpk6-2*, *Ws* a *anp2anp3*.

A Reprezentatívne obrázky 6 dňových semenáčikov Col-0 a *mpk4* mutanta. Mutant ukazuje zdurený koreň s abnormálnymi koreňovými vláskami (šípky).

B Reprezentatívne obrázky 6 dňových semenáčikov *Ws* a *anp2anp3* mutanta. Mutant ukazuje vetvenie koreňových vláskov (šípky).

C Reprezentatívne obrázky 6 dňových semenáčikov Col-0 a *mpk6-2* mutanta.

D Obrázok rovnakých semenáčikov ako ukazuje C ale po 10 dňoch rastu. Divoký typ ukazuje normálny vývoj laterálnych koreňov pozdĺž primárneho koreňa. Semenáčik *mpk6-2* mutanta nemá laterálne korene ale namiesto nich má korene adventívne (šípky). Detailný obrázok *mpk6-2* mutanta ukazujúci abnormálne formy koreňových vláskov.

9.2. Fenotypové zmeny u *mpk4*, *mpk6-2* a *anp2anp3* mutantov a príslušných divokých typov navodené osmotickým, oxidatívnym a chladovým stresom

Na podrobnejšiu charakterizáciu koreňových fenotypov u *mpk4*, *mpk6-2* a *anp2anp3* mutantov a kontrol (Col-0 a Ws) po pôsobení osmotického, oxidatívneho a chladového stresu, boli semená najskôr vysadené na ½ MS médium bez vitamínov a spevnené fytagélom, aby sa zamedzilo vplyvu stresov na klíčenie. Tri dni po vyklíčení boli na semenáčky aplikované jednotlivé stresy a denne boli mikroskopicky analyzované. Z dôvodu vylúčenia mechanického stresu počas prenosu semenáčikov na stresové média sa prenášali aj ich kontroly.

Pôsobenie všetkých abiotických stresov použitých v našich experimentoch vyúsťuje do špecifických vplyvov na fenotypy študovaných *mpk4*, *mpk6* a *anp2anp3* mutantov a príslušných divokých typov (Obr. 5-7).

Porovnanie dĺžky koreňa jednotlivých mutantov a príslušných divokých typov v závislosti na pôsobení osmotického, oxidatívneho a chladového stresu ukázalo, že všetky použité stresy navodzujú inhibíciu rastu koreňov (Obr. 8 a 9). Inhibícia rastu koreňov mutantov i divokých typov je najvýraznejšia po pôsobení chladu. Inhibícia sa prejavuje už jeden deň po prenose.

9.2.1. Vplyv osmotického stresu

Jeden deň po prenose nastáva aj inhibícia rastu koreňa po pôsobení 150mM NaCl u Col-0 a Ws. Col-0 je najmenej citlivá na 75mM NaCl, 3% sacharózu a 100mM NaCl. Naproti tomu *mpk4* mutant je najmenej citlivý na pôsobenie osmotického stresu vyvolaného 3 a 5% sacharózou. Mutant *mpk6-2* je odolnejší na osmotický stres (navodený NaCl a sacharózou) ako *mpk4* a *anp2anp3* mutanti (Obr. 8).

Ws je najmenej citlivá na osmotický stres vyvolaný nízkymi koncentraciami soli a cukru (75mM NaCl a 3% sacharóza). Pôsobením 5% sacharózy dochádza k postupnej inhibícii rastu koreňa u Ws. Na druhej strane, *anp2anp3* mutant je najmenej citlivý na oxidatívny stres vyvolaný 0,1μM paraquatom. U mutantu *anp2anp3* nastáva na 3. deň inhibícia rastu koreňa pôsobením osmotického stresu (75, 100 a 150mM NaCl, 3 a 5% sacharóza) (Obr. 9).

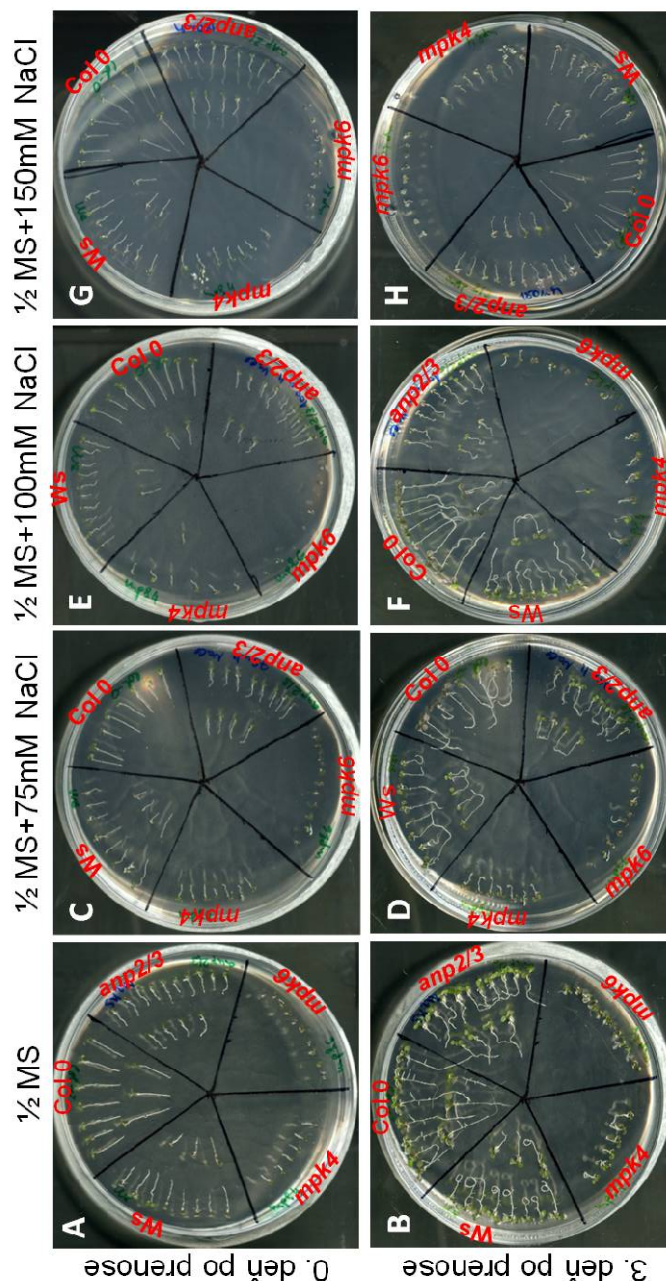
U divokých typov Col-0 a Ws, ktoré rástli na médiu s pridaním NaCl, sú fenotypové prejavy úmerné vzrastajúcej koncentrácii. Čím vyššia koncentrácia NaCl bola pridaná do média, tým dochádzalo k výraznejšej inhibícii rastu koreňových vláskov a znížil sa aj počet laterálnych koreňov (Obr. 13 A a C, 15 A a C). 75mM NaCl má najmenší inhibičný účinok na koreňové vlásky (Obr. 11 A). Na pôsobenie 150mM NaCl je viac rezistentnejšia Ws než Col-0 (Obr. 15 A a C). Divoký typ Col-0 nevytvára takmer žiadne

koreňové vlásky a laterálne korene (Obr. 14 A). Naproti tomu Ws vytvára malé a zdurené koreňové vlásky (Obr. 13 C).

U mutantov *mpk4*, *anp2anp3* a *mpk6-2* so zvyšujúcou sa koncentráciou NaCl pozorujeme redukciu počtu koreňových vláskov (Obr. 11 A-C, 13 A-C, 15 A-C). Pri aplikácii 100mM a 150mM NaCl dochádza k výraznému zhrubnutiu koreňových vláskov (Obr.13 A-C, 15 A-C). Tento efekt je najvýraznejší u *mpk4* mutantu (Obr. 15 A).

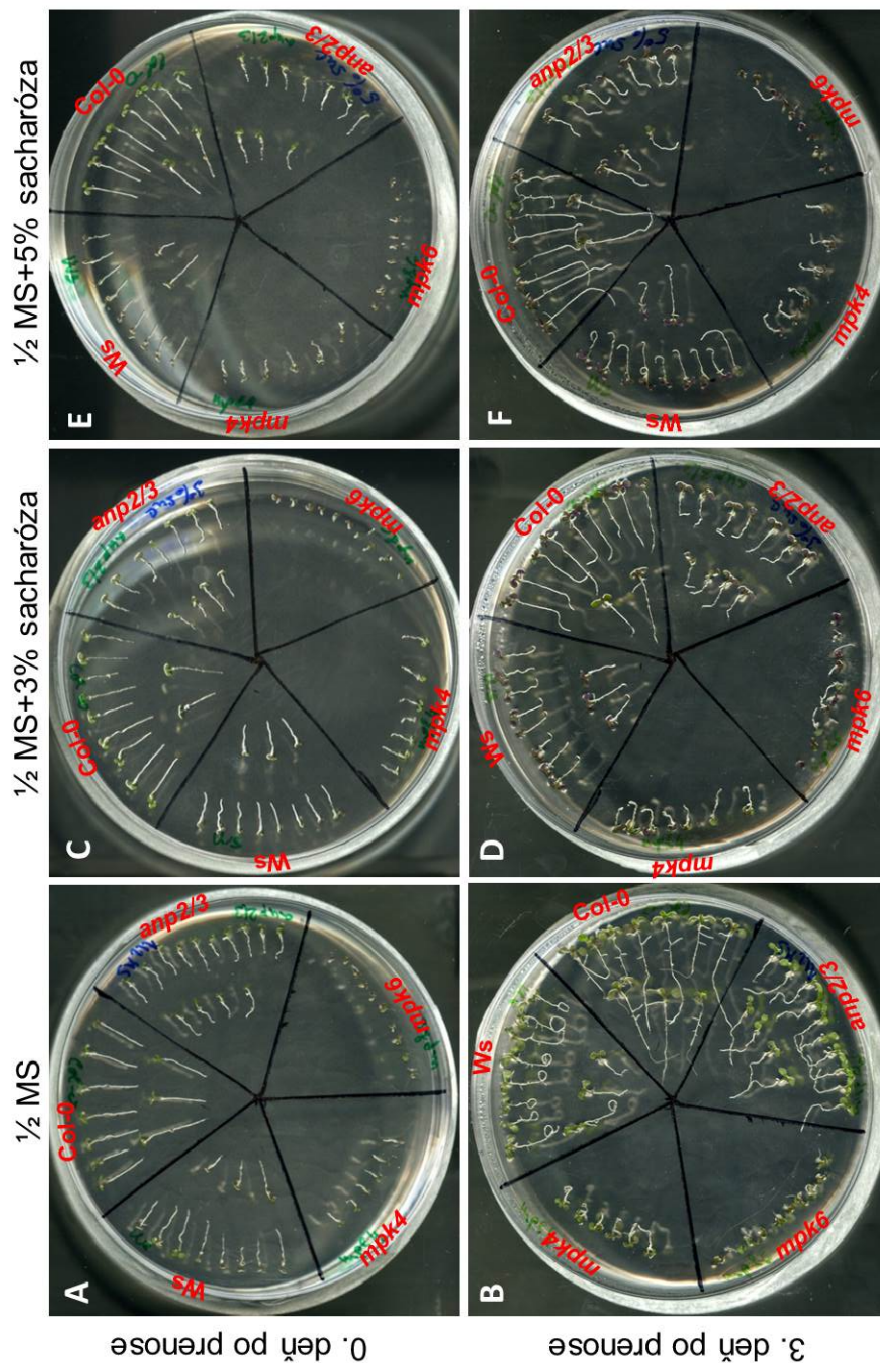
Osmotický stres vyvolaný 3% sacharózou má podobne ako u 75mM NaCl minimálny inhibičný vplyv na vyvoj a rast koreňových vláskov divokých typov (Obr. 17 A a C). Naopak, pôsobením 5% sacharózy dochádza u Ws k zhrubnutiu koreňových vláskov, čo u divokého typu Col-0 nepozorujeme (Obr.19 A a C).

U mutantu *mpk4* po pôsobení 3% sacharózy pozorujeme dva typy koreňových vláskov, tenké trubicovité alebo zdurené (Obr.17 A). U mutantu *anp2anp3* sú koreňové vlásky veľmi malé a zdurené (Obr. 17 C). Pôsobením 5% sacharózy dochádza u *mpk4* mutantu k výraznejšiemu zhrubnutiu koreňových vláskov a k ich skráteniu (Obr.19 A). Mutant *anp2anp3* má po pôsobení 5% sacharózy zhrubnuté koreňové vlásky takmer po celej dĺžke (Obr. 19 C). U *mpk6-2* mutantu dochádza po pôsobení 5% sacharózy, na rozdiel od 3% sacharózy (Obr. 17 B), k úplnej inhibícii rastu koreňových vláskov (Obr. 19 B).



Obr. 5 Vplyv osmotického stresu na celkové fenotypy *mpk4*, *mpk6-2* a *anp2anp3* mutantov a príslušných divokých typov .

- A** Reprezentatívne obrázky mutantov a divokých typov 0 deň po prenose na $\frac{1}{2}$ MS médium.
B Reprezentatívne obrázky mutantov a divokých typov 3 deň po prenose na $\frac{1}{2}$ MS médium
C Reprezentatívne obrázky mutantov a divokých typov 0 deň po prenose na médium s prídavkom 75mM NaCl.
D Reprezentatívne obrázky mutantov a divokých typov 3 deň po prenose na médium s prídavkom 75mM NaCl.
E Reprezentatívne obrázky mutantov a divokých typov 0 deň po prenose na médium s prídavkom 100mM NaCl.
F Reprezentatívne obrázky mutantov a divokých typov 3 deň po prenose na médium s prídavkom 100mM NaCl.
G Reprezentatívne obrázky mutantov a divokých typov 0 deň po prenose na médium s prídavkom 150mM NaCl.
H Reprezentatívne obrázky mutantov a divokých typov 3 deň po prenose na médium s prídavkom 150mM NaCl.



Obr. 6 Vplyv osmotického stresu na celkové fenotypy *mpk4*, *mpk6-2* a *anp2anp3* mutantov a príslušných divokých typov .

A Reprezentatívne obrázky mutantov a divokých typov 0 deň po prenose na $\frac{1}{2}$ MS médium.

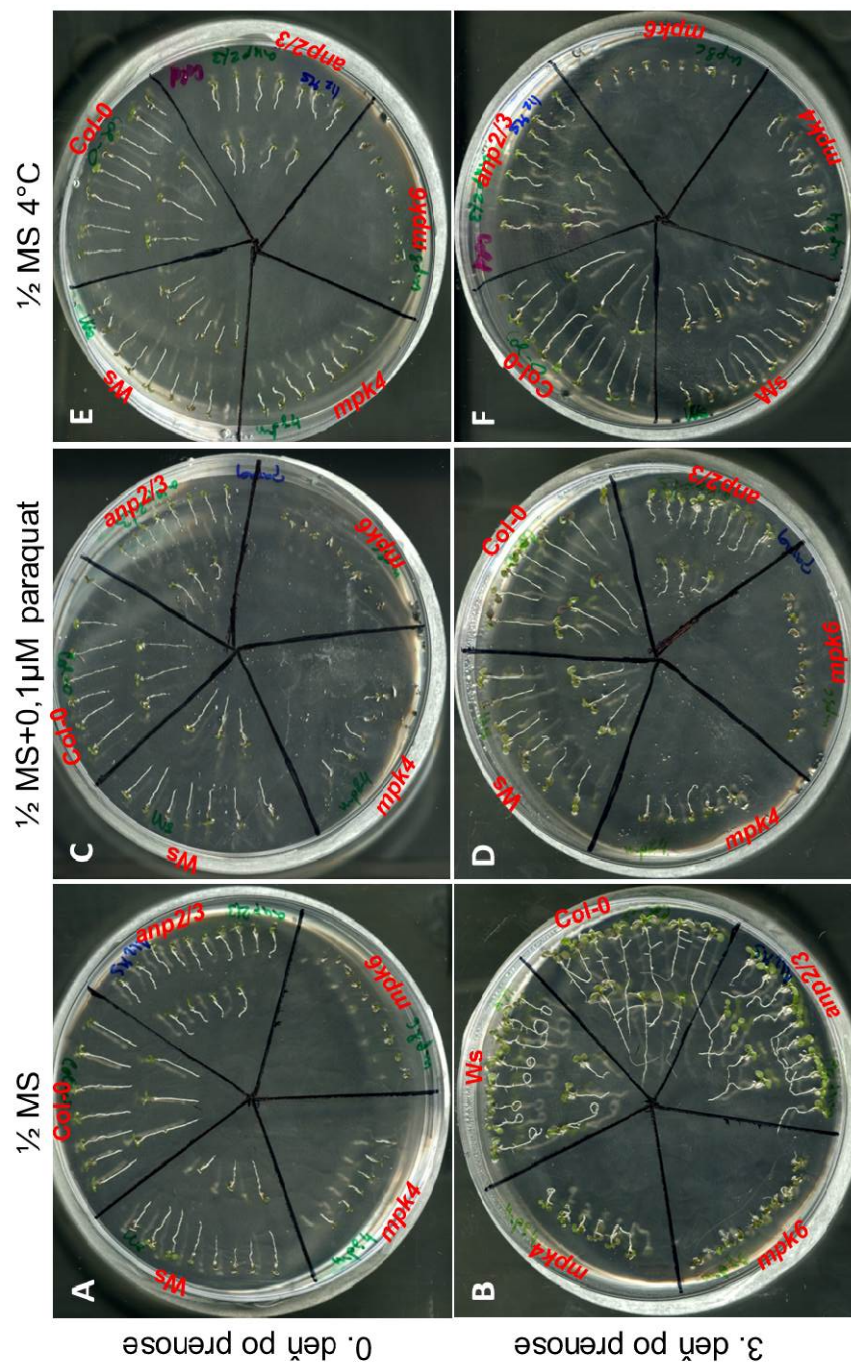
B Reprezentatívne obrázky mutantov a divokých typov 3 deň po prenose na $\frac{1}{2}$ MS médium

C Reprezentatívne obrázky mutantov a divokých typov 0 deň po prenose na médium s prídavkom 3% sacharózy.

D Reprezentatívne obrázky mutantov a divokých typov 3 deň po prenose na médium s prídavkom 3% sacharózy.

E Reprezentatívne obrázky mutantov a divokých typov 0 deň po prenose na médium s prídavkom 5% sacharózy.

F Reprezentatívne obrázky mutantov a divokých typov 3 deň po prenose na médium s prídavkom 5% sacharózy.



Obr. 7 Vplyv oxidatívneho a chladového stresu na celkové fenotypy *mpk4*, *mpk6-2* a *anp2anp3* mutantov a príslušných divokých typov .

A Repräsentatívne obrázky mutantov a divokých typov 0 deň po prenose na $\frac{1}{2}$ MS médium.

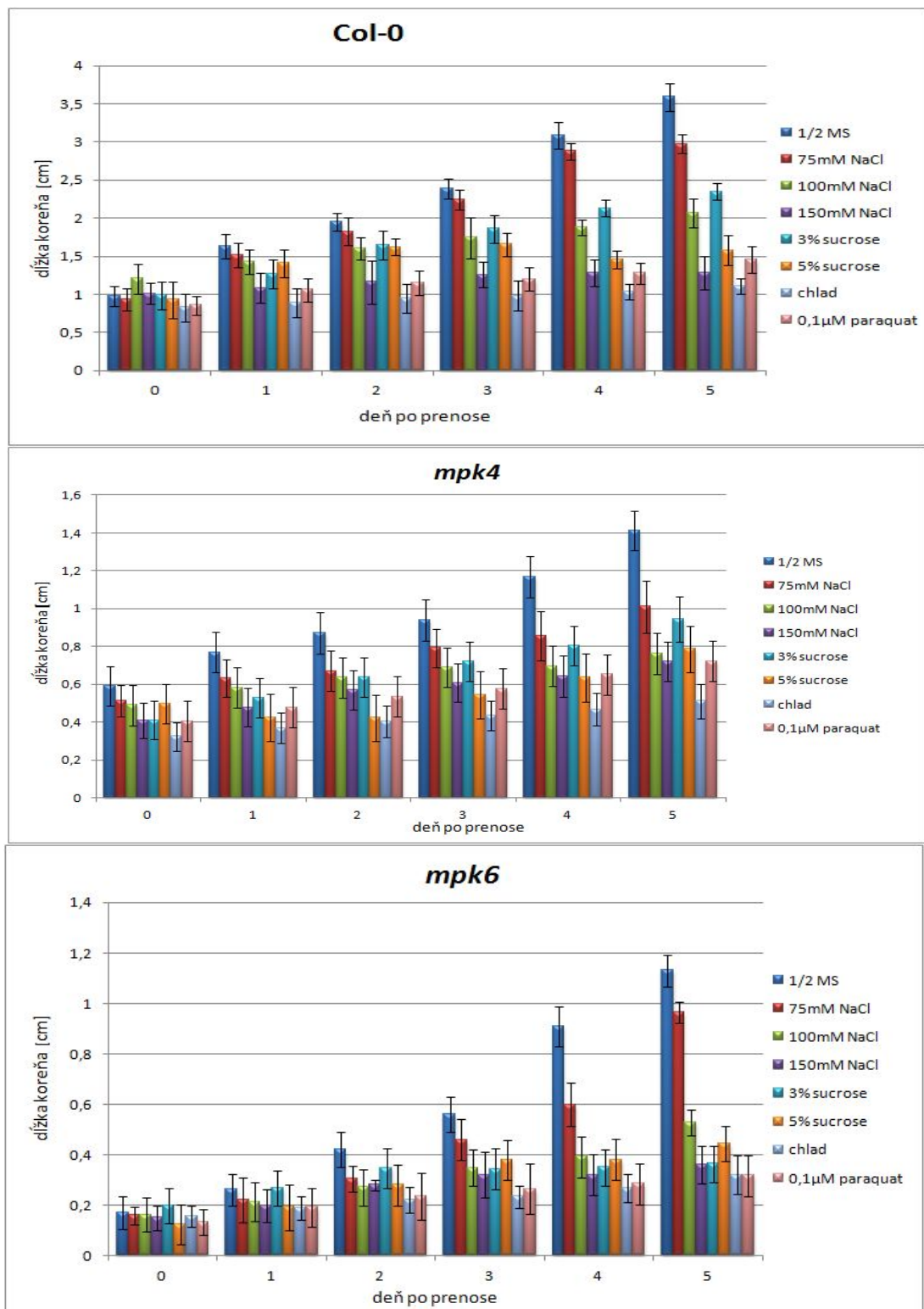
B Repräsentatívne obrázky mutantov a divokých typov 3 deň po prenose na $\frac{1}{2}$ MS médium

C Repräsentatívne obrázky mutantov a divokých typov 0 deň po prenose na médium s prídavkom $0,1\mu\text{M}$ paraquatu.

D Repräsentatívne obrázky mutantov a divokých typov 3 deň po prenose na médium s prídavkom $0,1\mu\text{M}$ paraquatu

E Repräsentatívne obrázky mutantov a divokých typov 0 deň po prenose rastúcich na médium pri 4°C .

F Repräsentatívne obrázky mutantov a divokých typov 3 deň po prenose rastúcich na médium pri 4°C .

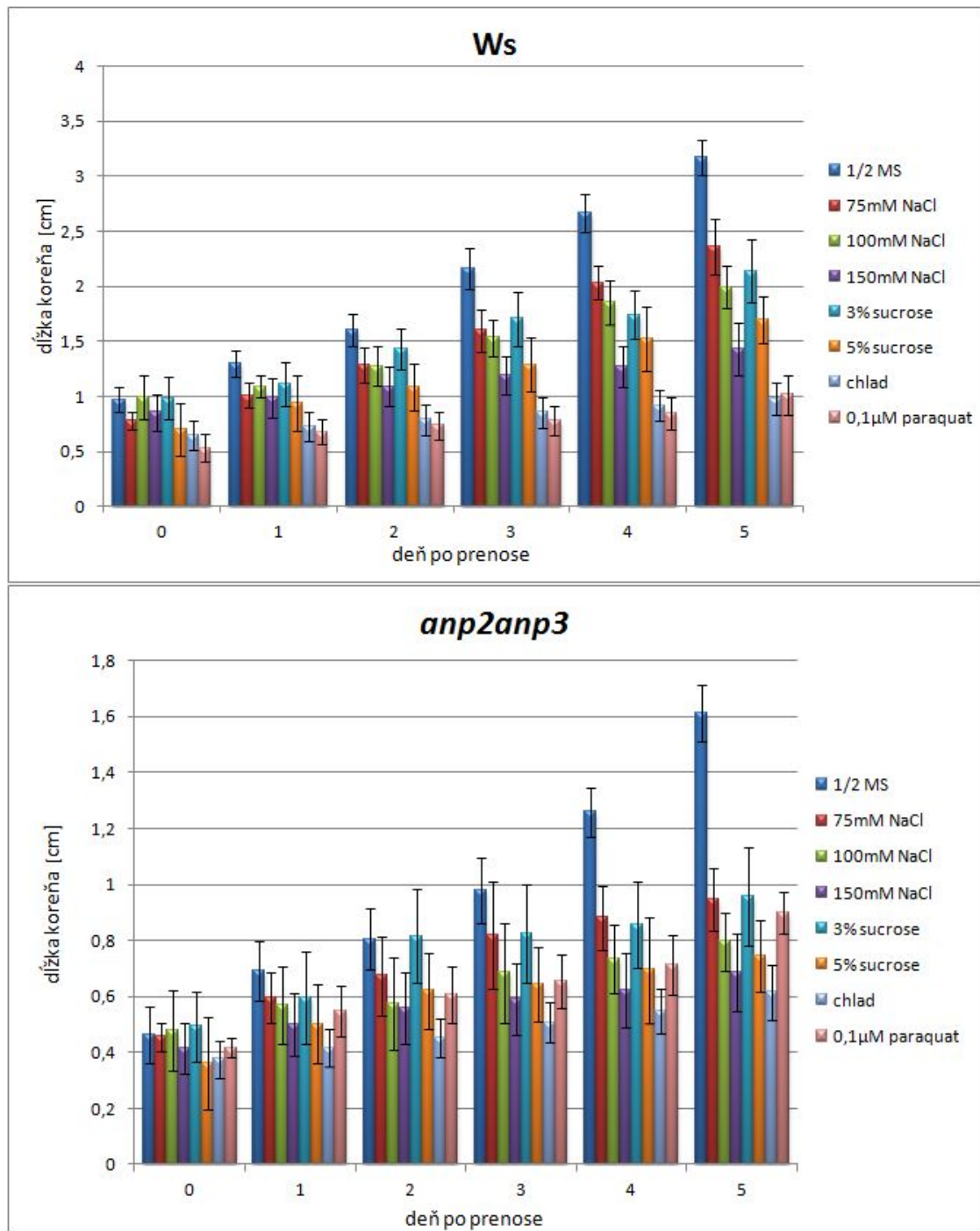


Obr. 8 Porovnanie rastu dĺžky koreňa u Col-0, *mpk4* a *mpk6-2* počas pôsobenia osmotického, oxidatívneho a chladového stresu.

A Grafické znázornenie rastu koreňov semenáčikov Col-0 v závislosti na pôsobení osmotického (NaCl a sacharóza), oxidatívneho (paraquat) a chladového stresu.

B Grafické znázornenie rastu koreňov semenáčikov *mpk4* v závislosti na pôsobení osmotického (NaCl a sacharóza), oxidatívneho (paraquat) a chladového stresu.

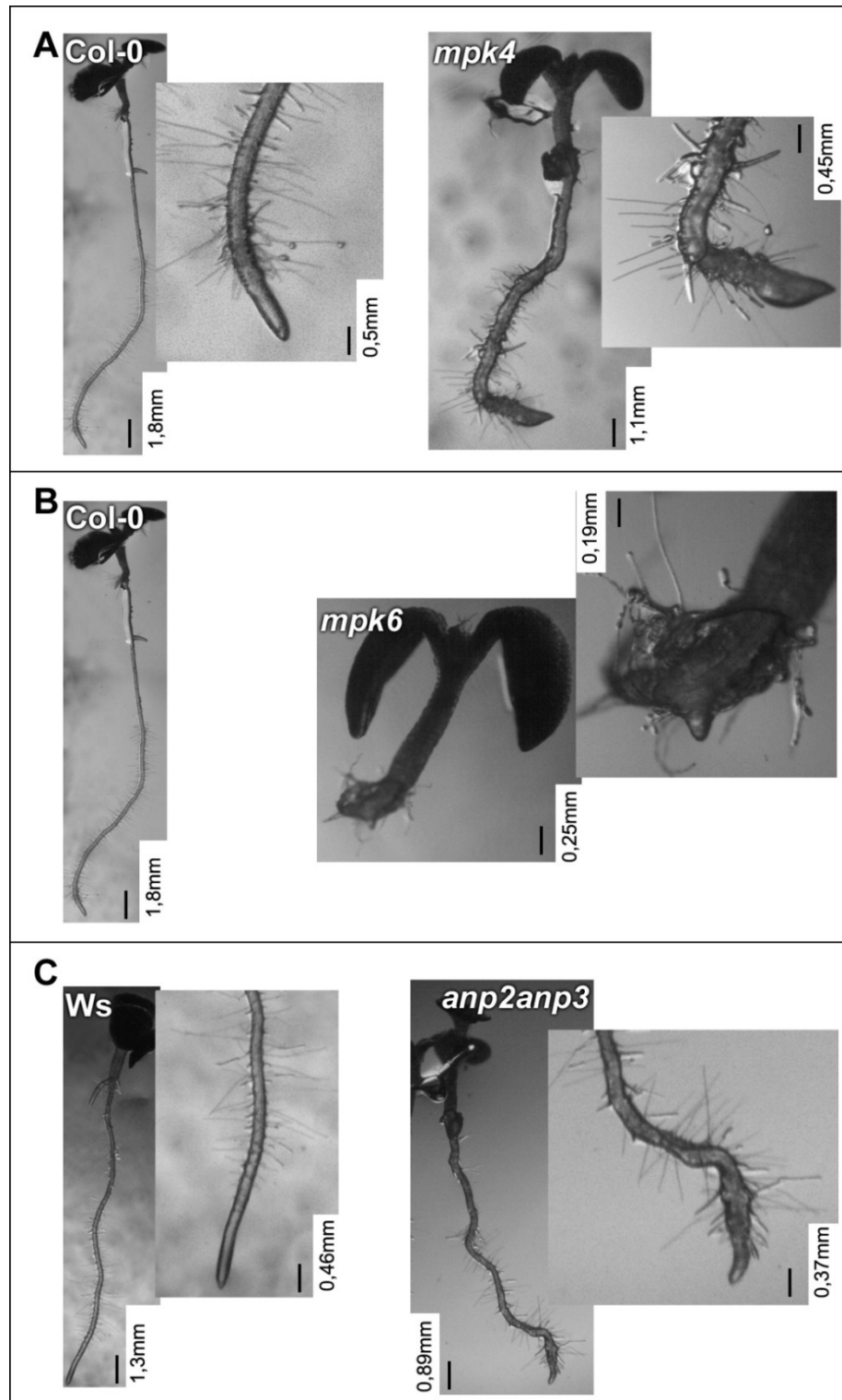
C Grafické znázornenie rastu koreňov semenáčikov *mpk6-2* v závislosti na pôsobení osmotického (NaCl a sacharóza), oxidatívneho (paraquat) a chladového stresu.



Obr. 9 Porovnanie rastu dĺžky koreňa u *Ws* a *anp2anp3* počas pôsobenia osmotického, oxidatívneho a chladového stresu.

A Grafické znázornenie rastu koreňov semenáčikov *Ws* v závislosti na pôsobení osmotického (NaCl a sacharóza), oxidatívneho (paraquat) a chladového stresu.

B Grafické znázornenie rastu koreňov semenáčikov *anp2anp3* v závislosti na pôsobení osmotického (NaCl a sacharóza), oxidatívneho (paraquat) a chladového stresu

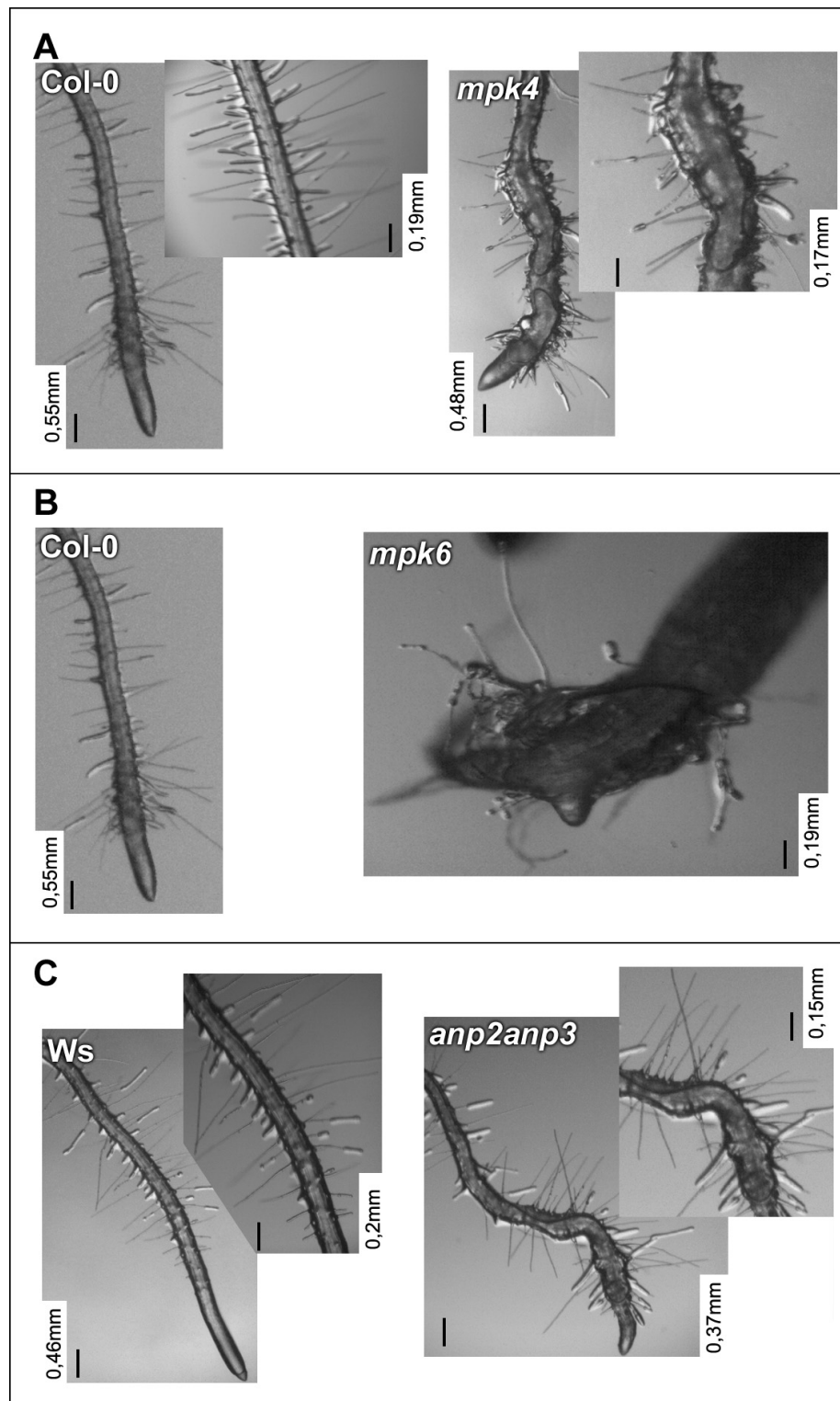


Obr . 10 Vplyv osmotického stresu na koreňové fenotypy *mpk4*, *mpk6-2* a *anp2anp3* mutantov a príslušných divokých typov rastúcich na médiu s prídavkom 75mM NaCl.

A Reprezentatívne obrázky semenáčikov *Col-0* a *mpk4* mutantu 3 deň po prenose na médium s prídavkom NaCl.

B Reprezentatívne obrázky semenáčikov *Col-0* a *mpk6-2* mutantu 3 deň po prenose na médium s prídavkom NaCl.

C Reprezentatívne obrázky semenáčikov *Ws* a *anp2anp3* mutantu 3 deň po prenose na médium s prídavkom NaCl.

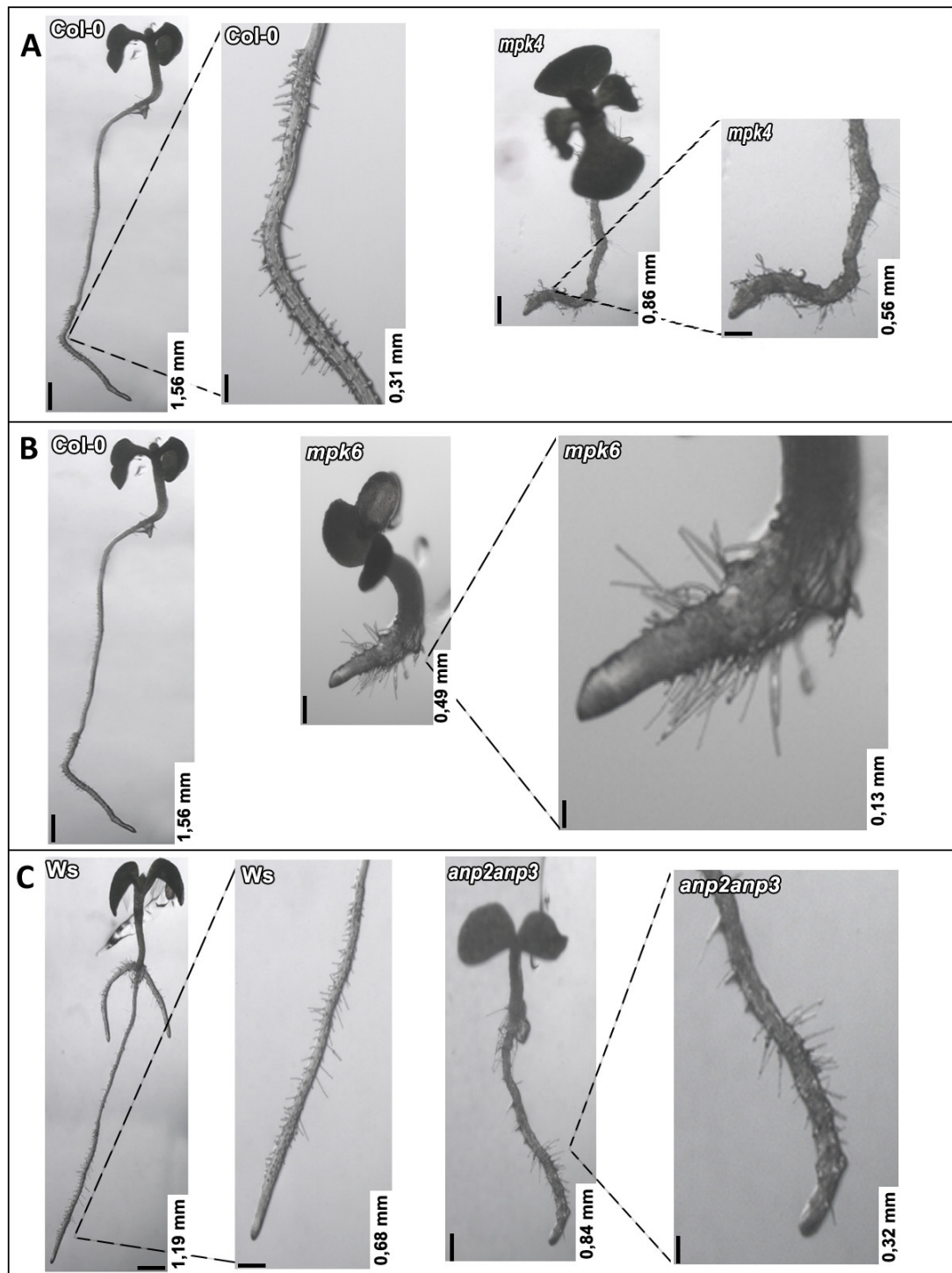


Obr. 11 Porovnanie fenotypov koreňových vlások *mpk4*, *mpk6-2* a *anp2anp3* mutantov a príslušných divokých typov rastúcich na médiu s prídavkom 75mM NaCl.

A Reprezentatívne detailné obrázky semenáčikov Col-0 a *mpk4* mutantu na 3 deň po prenose na médium s prídavkom NaCl.

B Reprezentatívne detailné obrázky semenáčikov Col-0 a *mpk6-2* mutantu na 3 deň po prenose na médium s prídavkom NaCl.

C Reprezentatívne detailné obrázky semenáčikov Col-0 a *anp2anp3* mutantu na 3 deň po prenose na médium s prídavkom NaCl.

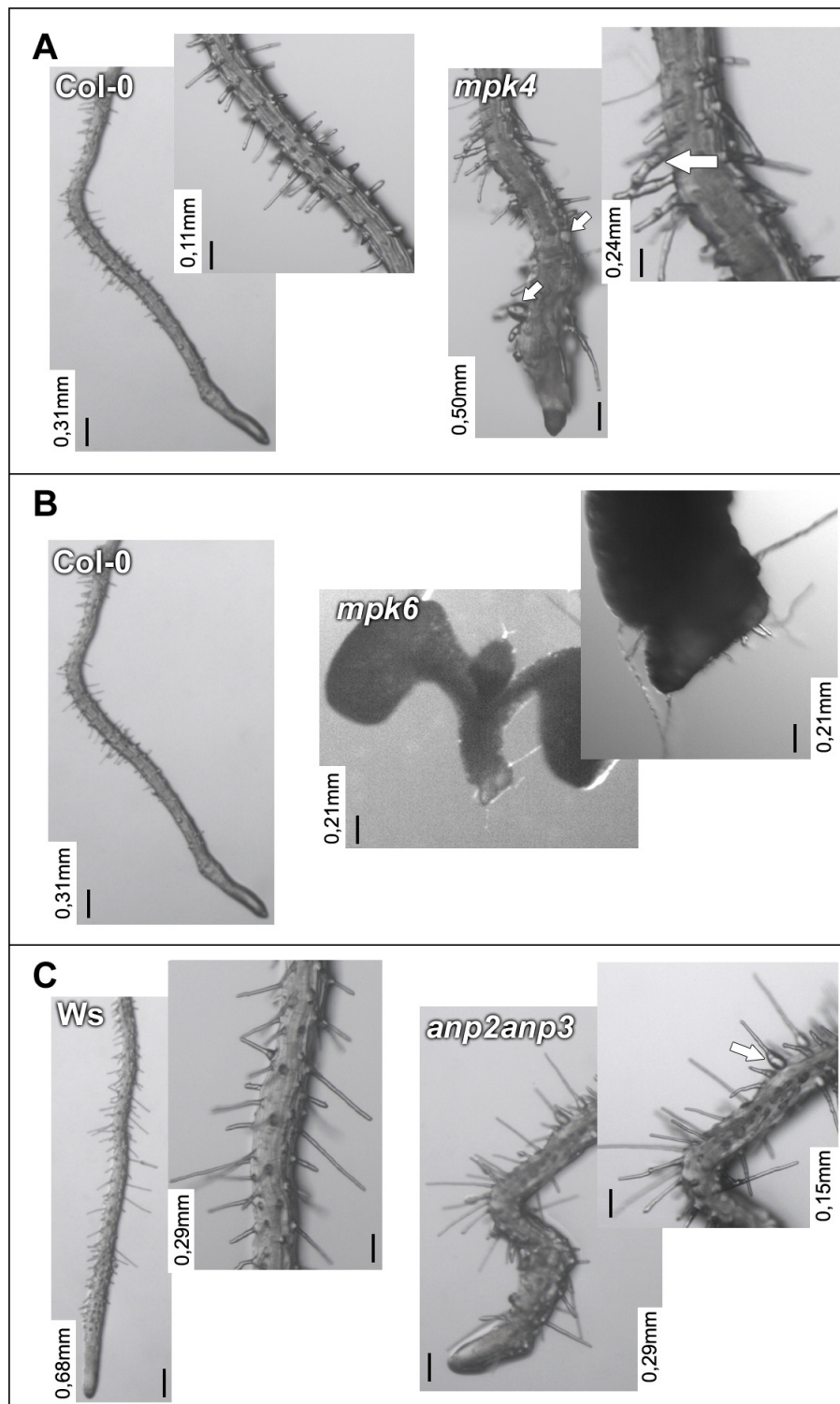


Obr. 12 Vplyv osmotického stresu na koreňové fenotypy *mpk4*, *mpk6-2* a *anp2anp3* mutantov apríslušných divokých typov rastúcich na médiu s prídavkom 100mM NaCl.

A Reprezentatívne obrázky semenáčikov *Col-0* a *mpk4* mutantu na 3 deň po prenose na médium s prídavkom NaCl.

B Reprezentatívne obrázky semenáčikov *Col-0* a *mpk6-2* mutantu na 3 deň po prenose na médium s prídavkom NaCl.

C Reprezentatívne obrázky semenáčikov *Ws* a *anp2anp3* mutantu na 3 deň po prenose na médium s prídavkom NaCl.

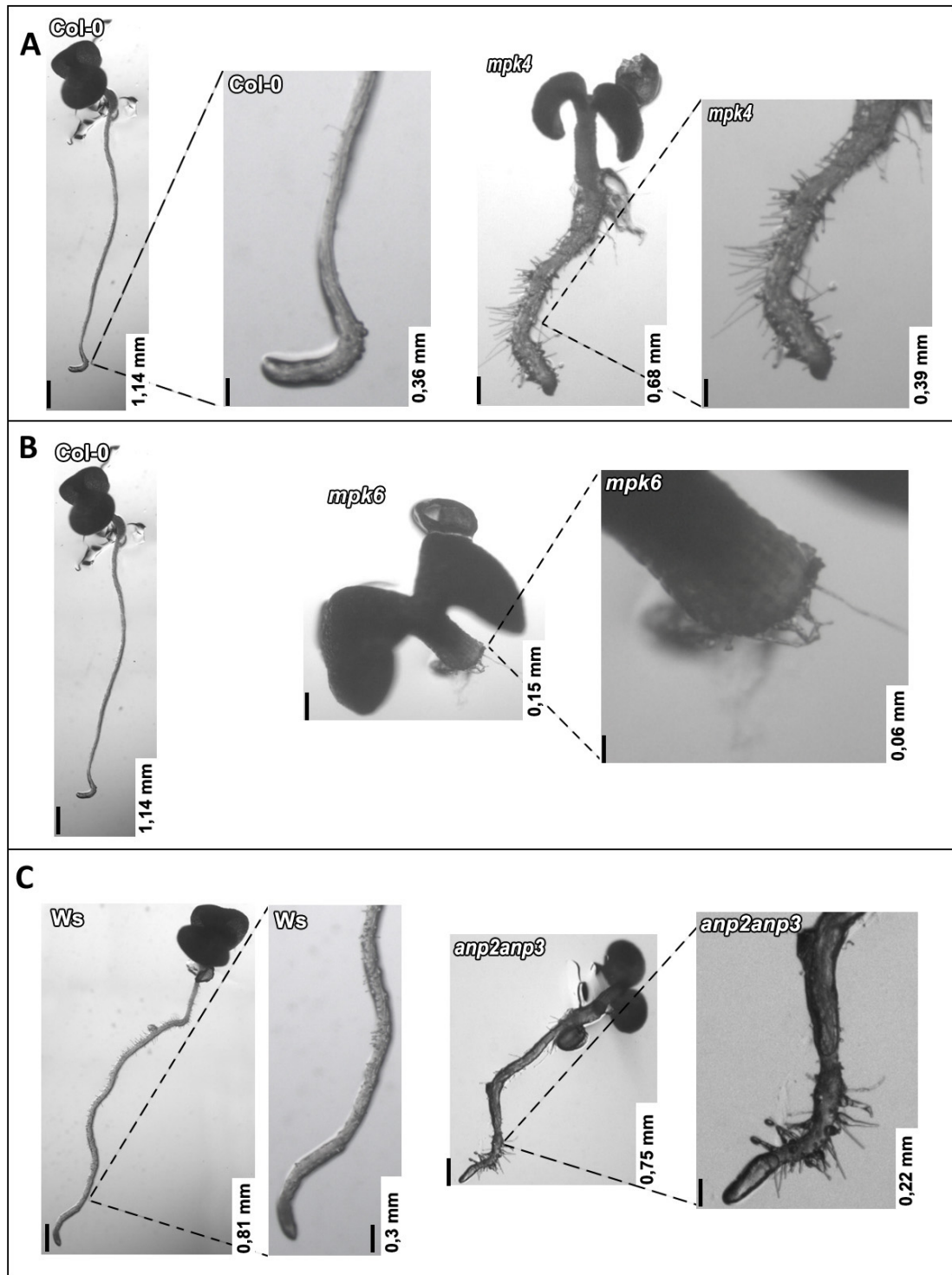


Obr. 13 Porovnanie fenotypov koreňových vláskov *mpk4*, *mpk6-2* a *anp2anp3* mutantov a príslušných divokých typov rastúcich na médiu s prídavkom 100mM NaCl.

A Repräsentatívne detailné obrázky semenáčikov Col-0 a *mpk4* mutantu na 3 deň po prenose na médium s prídavkom NaCl. Mutant ukazuje zhrubnuté koreňové vlásky (šípky).

B Repräsentatívne detailné obrázky semenáčikov Col-0 a *mpk6-2* mutantu na 3 deň po prenose na médium s prídavkom NaCl.

C Repräsentatívne detailné obrázky semenáčikov Col-0 a *anp2anp3* mutantu na 3 deň po prenose na médium s prídavkom NaCl. Mutant ukazuje zhrubnuté koreňové vlásky (šípky).

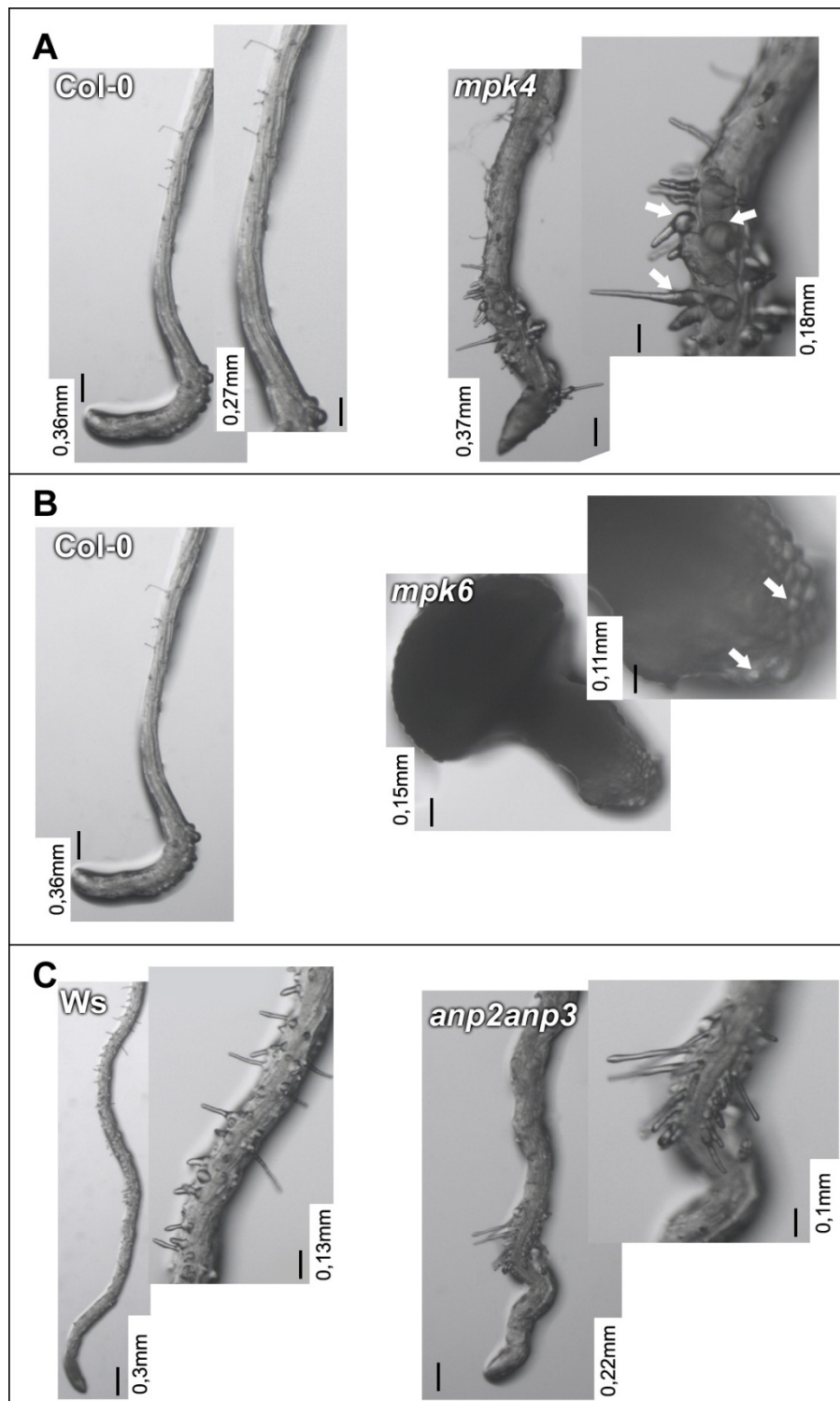


Obr. 14 Vplyv osmotického stresu na koreňové fenotypy *mpk4*, *mpk6-2* a *anp2anp3* mutantov a príslušných divokých typov rastúcich na médiu s prídavkom 150mM NaCl.

A Reprezentatívne obrázky semenáčikov Col-0 a *mpk4* mutantu na 3 deň po prenose na médium s prídavkom NaCl.

B Reprezentatívne obrázky semenáčikov Col-0 a *mpk6-2* mutantu na 3 deň po prenose na médium s prídavkom NaCl.

C Reprezentatívne obrázky semenáčikov Ws a *anp2anp3* mutantu na 3 deň po prenose na médium s prídavkom NaCl.

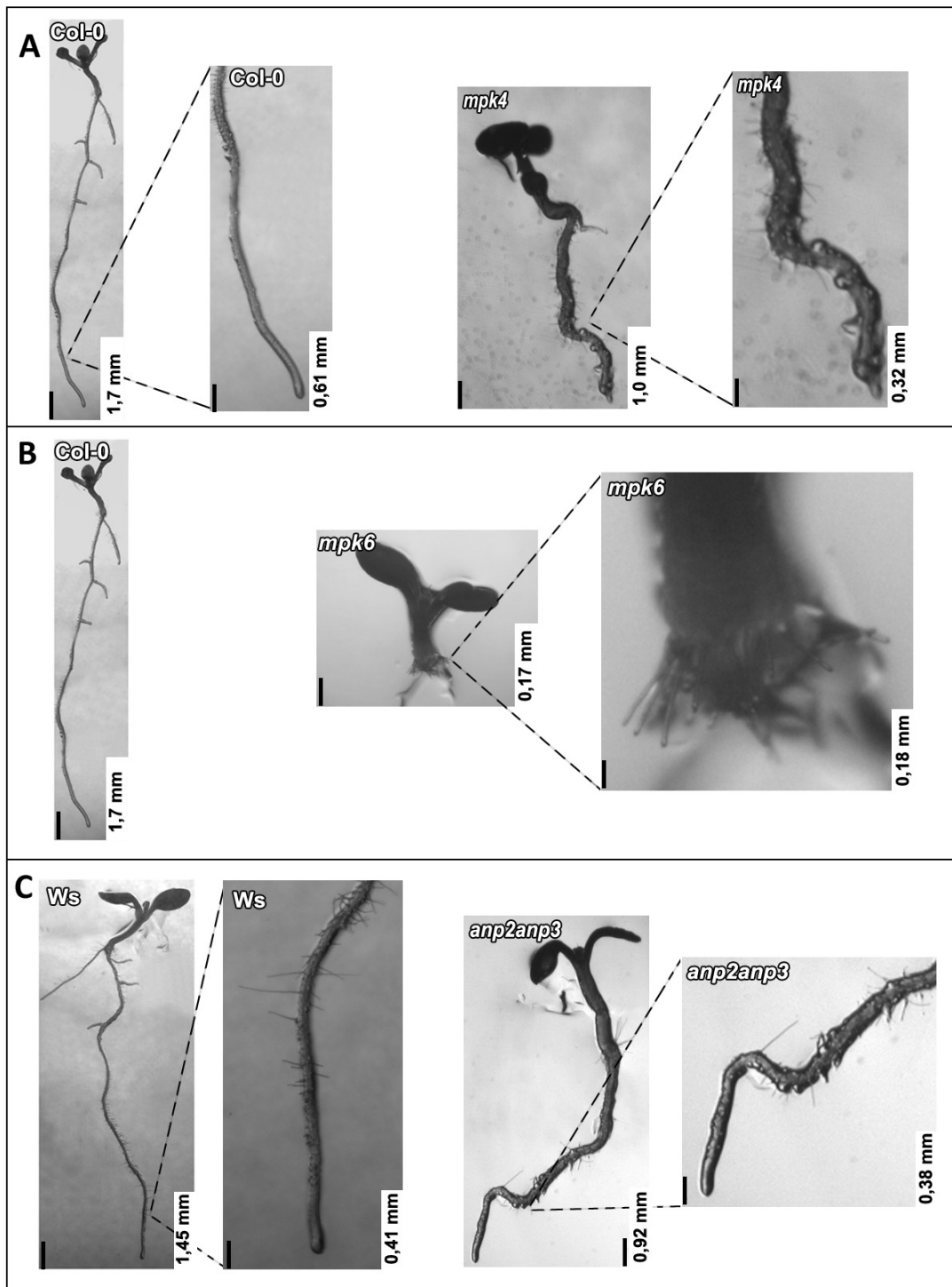


Obr. 15 Porovnanie fenotypov koreňových vláskov *mpk4*, *mpk6-2* a *anp2anp3* mutantov a príslušných divokých typov rastúcich na médiu s prídavkom 150mM NaCl.

A Reprézntatívne detailné obrázky semenáčikov Col-0 a *mpk4* mutantu na 3 deň po prenose na médium s prídavkom NaCl. Mutant ukazuje zhrubnuté koreňové vlásky (šípky).

B Reprézntatívne detailné obrázky semenáčikov Col-0 a *mpk6-2* mutantu na 3 deň po prenose na médium s prídavkom NaCl. Mutant ukazuje zdurenú koreňovú špičku (šípky).

C Reprézntatívne detailné obrázky semenáčikov Col-0 a *anp2anp3* mutantu na 3 deň po prenose na médium s prídavkom NaCl.

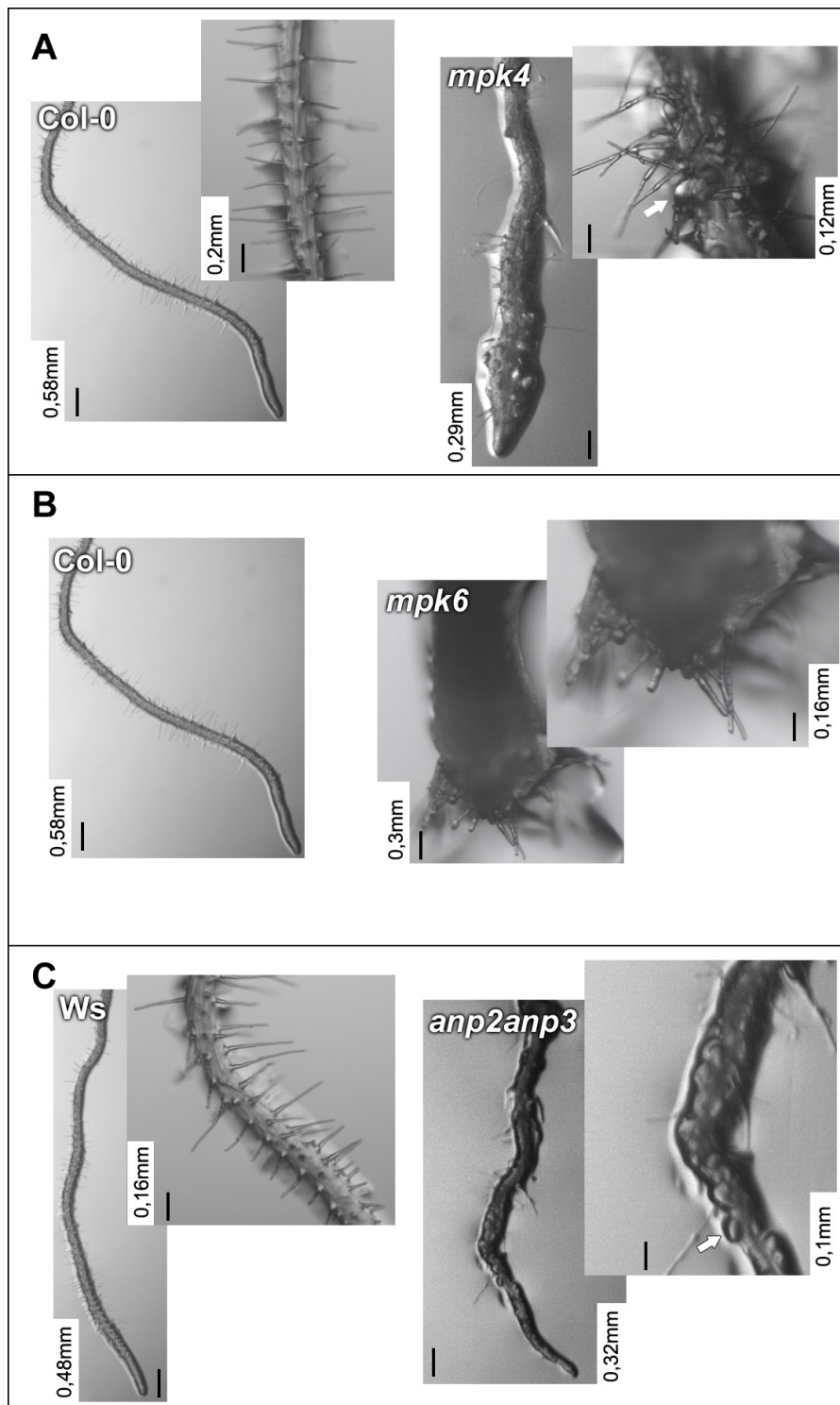


Obr. 16 Vplyv osmotického stresu na koreňové fenotypy *mpk4*, *mpk6-2* a *anp2anp3* mutantov a príslušných divokých typov rastúcich na médiu s prídavkom 3% sacharózy.

A Reprezentatívne obrázky semenáčikov Col-0 a *mpk4* mutantu na 3 deň po prenose na médium s prídavkom sacharózy.

B Reprezentatívne obrázky semenáčikov Col-0 a *mpk6-2* mutantu na 3 deň po prenose na médium s prídavkom sacharózy.

C Reprezentatívne obrázky semenáčikov Ws a *anp2anp3* mutantu na 3 deň po prenose na médium s prídavkom sacharózy.

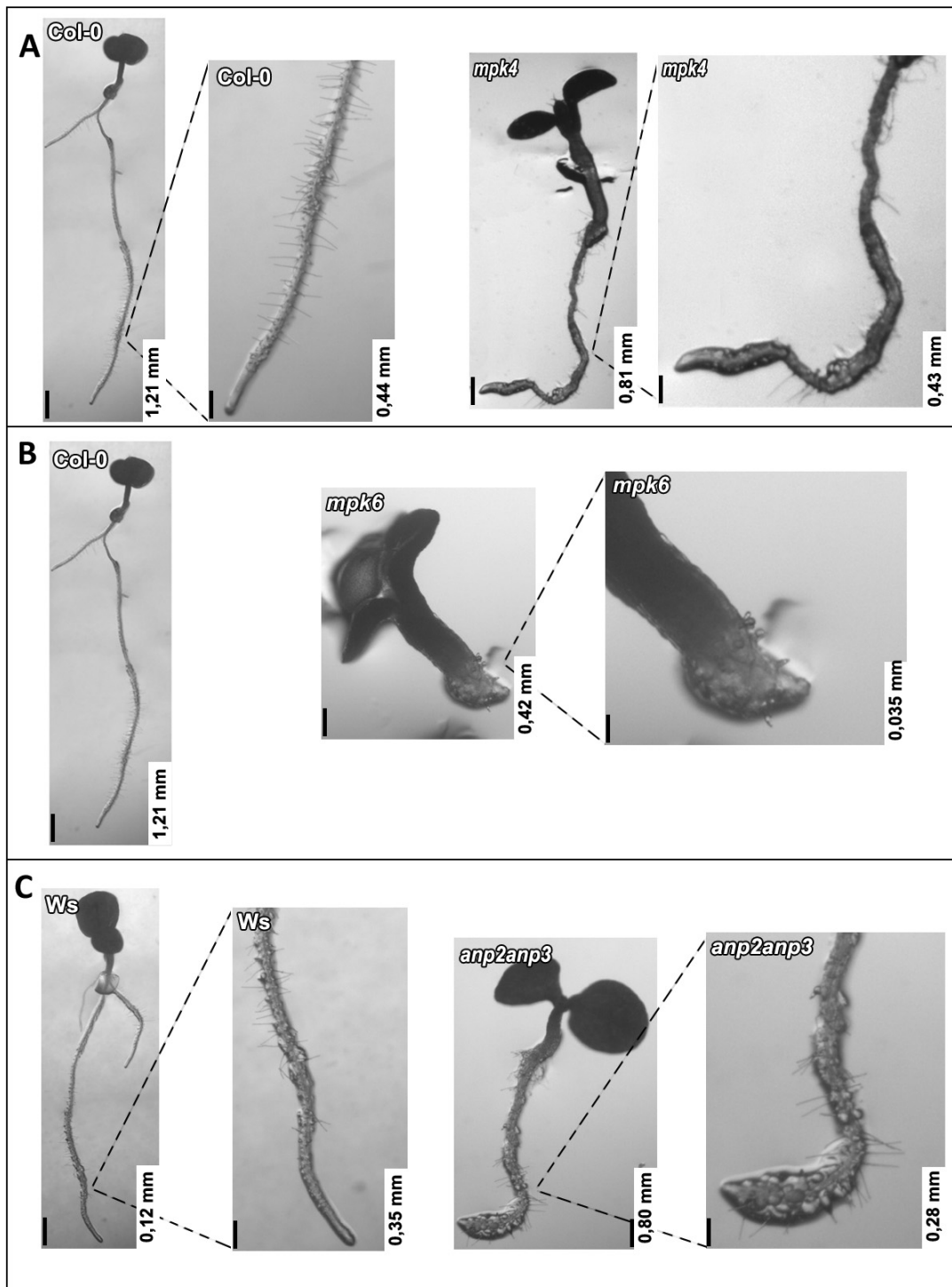


Obr. 17 Porovnanie koreňového fenotypu medzi Col-0, *mpk4*, *mpk6-2*, *Ws* a *anp2anp3* na médiu s prídavkom 3% sacharózy.

A Reprezentatívne detailné obrázky semenáčikov Col-0 a *mpk4* mutanta na 3 deň po prenose na médium s prídavkom sacharózy. Mutant ukazuje zhrubnuté koreňové vlásky (šípky).

B Reprezentatívne detailné obrázky semenáčikov Col-0 a *mpk6-2* mutanta na 3 deň po prenose na médium s prídavkom sacharózy.

C Reprezentatívne detailné obrázky semenáčikov Col-0 a *anp2anp3* mutanta na 3 deň po prenose na médium s prídavkom sacharózy. Mutant ukazuje zdureniny na primárnom koreni (šípky).

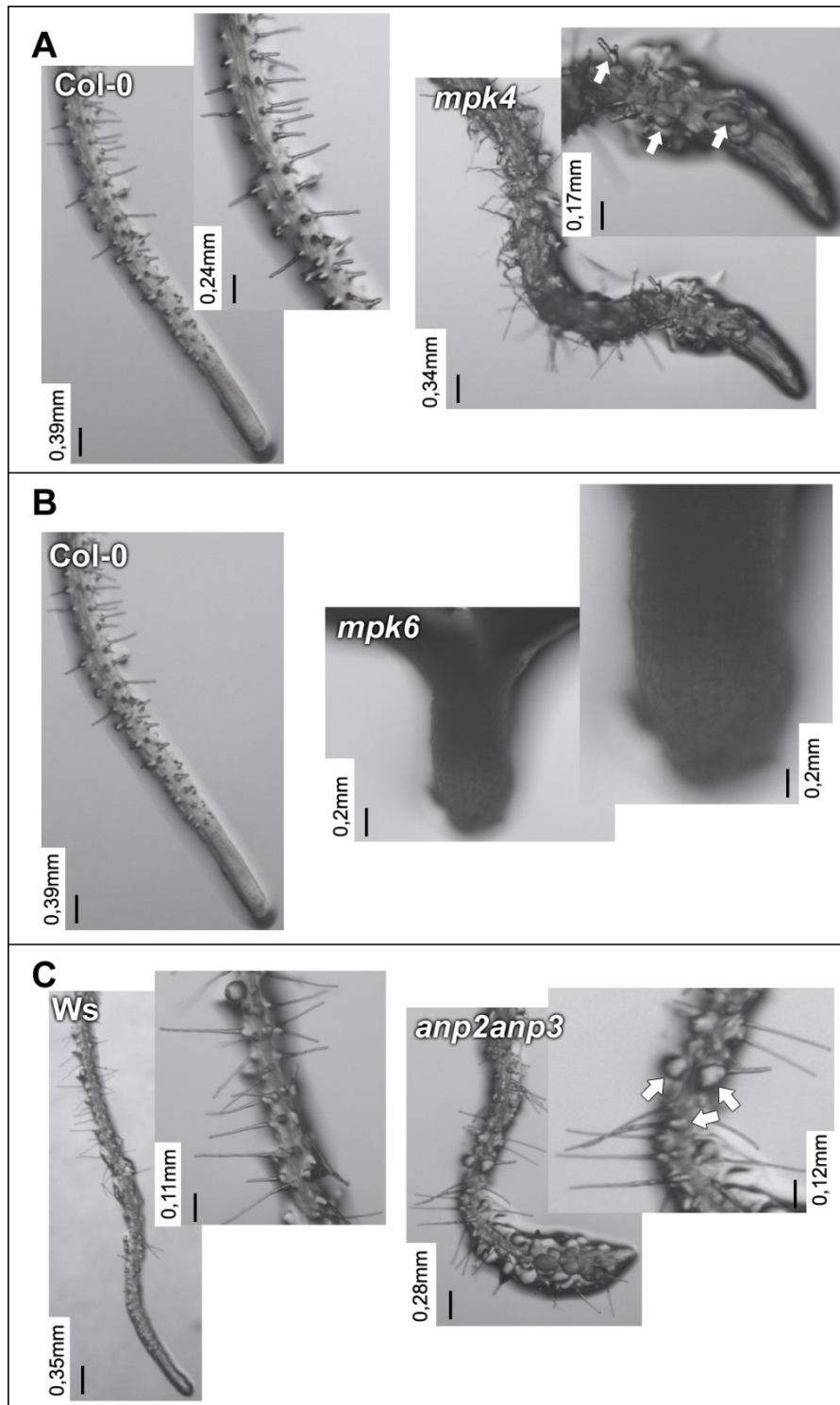


Obr. 18 Vplyv osmotického stresu na koreňové fenotypy *mpk4*, *mpk6-2* a *anp2anp3* mutantov a príslušných divokých typov rastúcich na médiu s prídavkom 5% sacharózy.

A Reprezentatívne obrázky semenáčikov Col-0 a *mpk4* mutantu na 3 deň po prenose na médium s prídavkom sacharózy.

B Reprezentatívne obrázky semenáčikov Col-0 a *mpk6-2* mutantu na 3 deň po prenose na médium s prídavkom sacharózy.

C Reprezentatívne obrázky semenáčikov Ws a *anp2anp3* mutantu na 3 deň po prenose na médium s prídavkom sacharózy.



Obr. 19 Porovnanie koreňového fenotypu medzi Col-0, *mpk4*, *mpk6-2*, *Ws* a *anp2anp3* na médiu s prídavkom 5% sacharózy.

A Reprezentatívne detailné obrázky semenáčikov Col-0 a *mpk4* mutanta na 3 deň po prenose na médium s prídavkom sacharózy. Mutant ukazuje zhrubnuté koreňové vlásky a vetvenie koreňových vlások (šípky).

B Reprezentatívne detailné obrázky semenáčikov Col-0 a *mpk6-2* mutanta na 3 deň po prenose na médium s prídavkom sacharózy

C Reprezentatívne detailné obrázky semenáčikov Col-0 a *anp2anp3* mutanta na 3 deň po prenose na médium s prídavkom sacharózy. Mutant ukazuje zhrubnutie koreňových vlások (šípky).

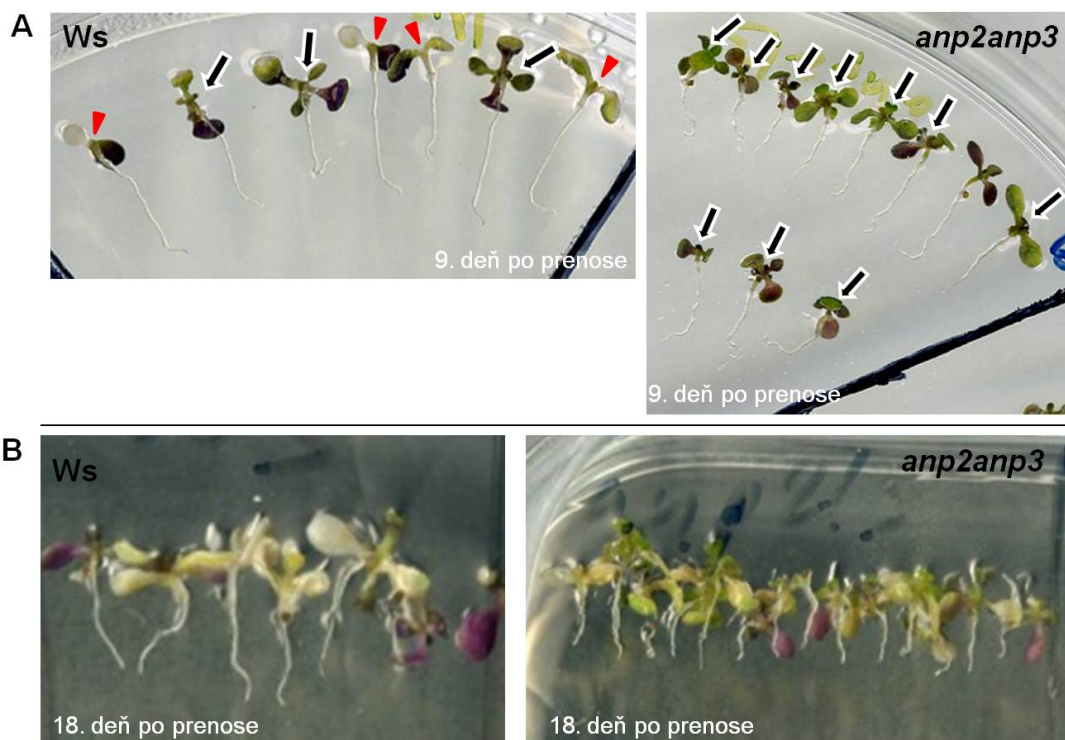
9.2.2. Vplyv chladového stresu

Pôsobením chladu tiež dochádza k inhibícii vývoja a rastu nových koreňových koreňových vláskov a tvorbe laterálnych koreňov u všetkých sledovaných mutantov a divokých typov (Obr.22 A-C). Táto inhibícia je výraznejšia z divokých typov u Ws (Obr. 22 C) a z mutantov u *mpk6-2* (Obr. 23 B).

9.2.3. Vplyv oxidatívneho stresu

Na oxidatívny stres vyvolaný 0,1µM paraquatom je najrezistentnejší *anp2anp3* mutant (Obr. 7 C a D). U tohoto mutantu sme pozorovali vytvorenie listovej ružice u 90% jedincov s priemerným počtom 6 listov na rastlinu na 9. deň po prenose na médium s prídavkom paraquatu . Naproti tomu divoký typ Ws vytvára listovú ružicu len u 60% s priemerným počtom 4 listy na rastlinu (obr. 20 A). Rastliny *anp2anp3* mutantu prežívajú aj po 18 dňoch kultivácie na médiu s pridaním 0,1µM paraquatu (obr. 20 B).

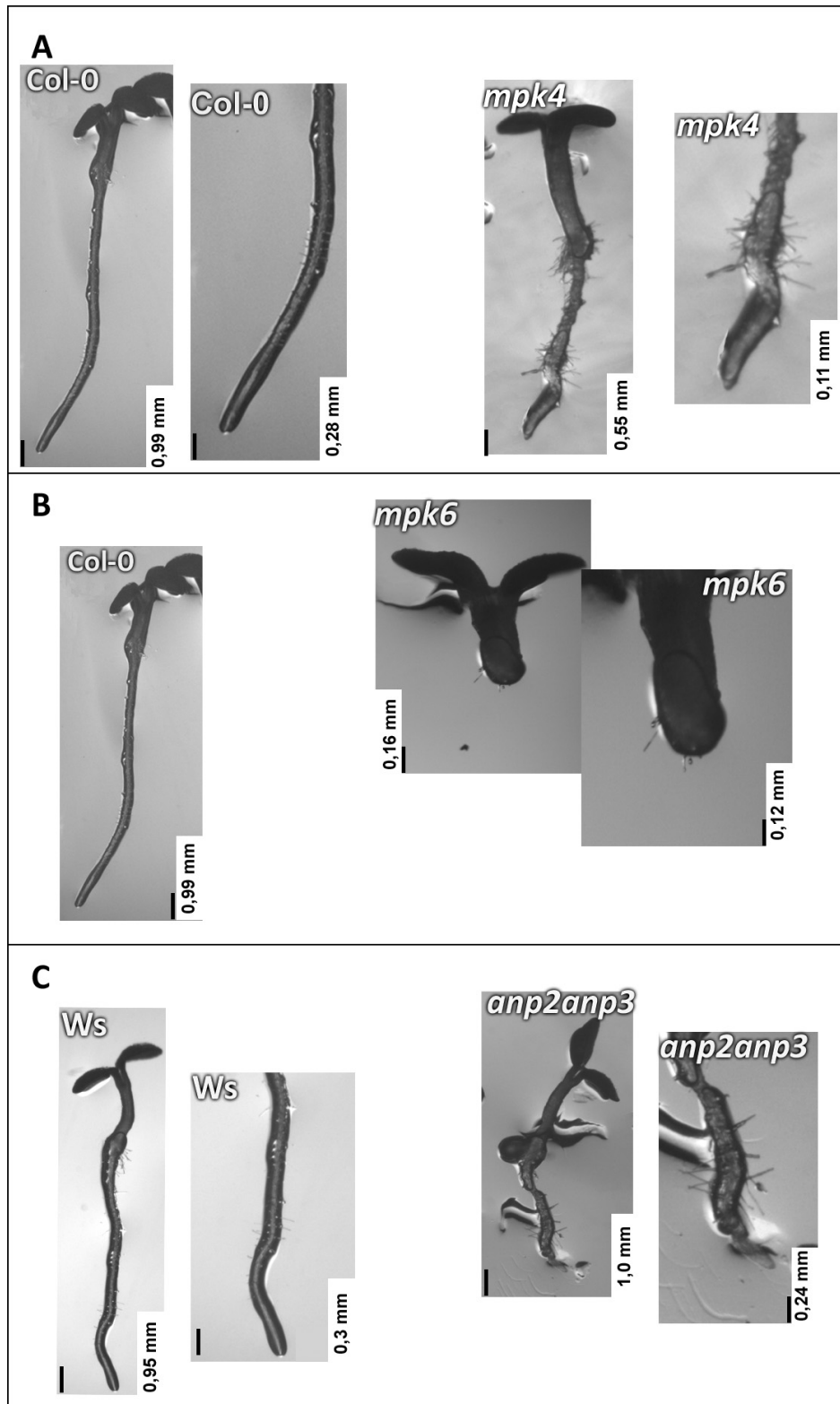
U mutantov *mpk4* a *anp2anp3*, na rozdiel od mutantu *mpk6-2* a divokých typov Col-0 a Ws, dochádza k inhibícii rastu koreňových vláskov pôsobením 0,1µM paraquatu (Obr. 24 A - C).



Obr. 20 Vplyv oxidatívneho stresu na *anp2anp3* mutantu a jeho príslušný divoký typ Ws.

A Vytváranie listovej ružice u *anp2anp3* mutantu a divokého typu Ws na 9 deň po prenose na médium s prídavkom 0,1µM paraquatu. Čierne šípky znázorňujú pravé listy.

B Prežívanie *anp2anp3* mutantu aj na 18 deň po prenose na médium s prídavkom 0,1µM paraquatu na rozdiel od divokého typu Ws.

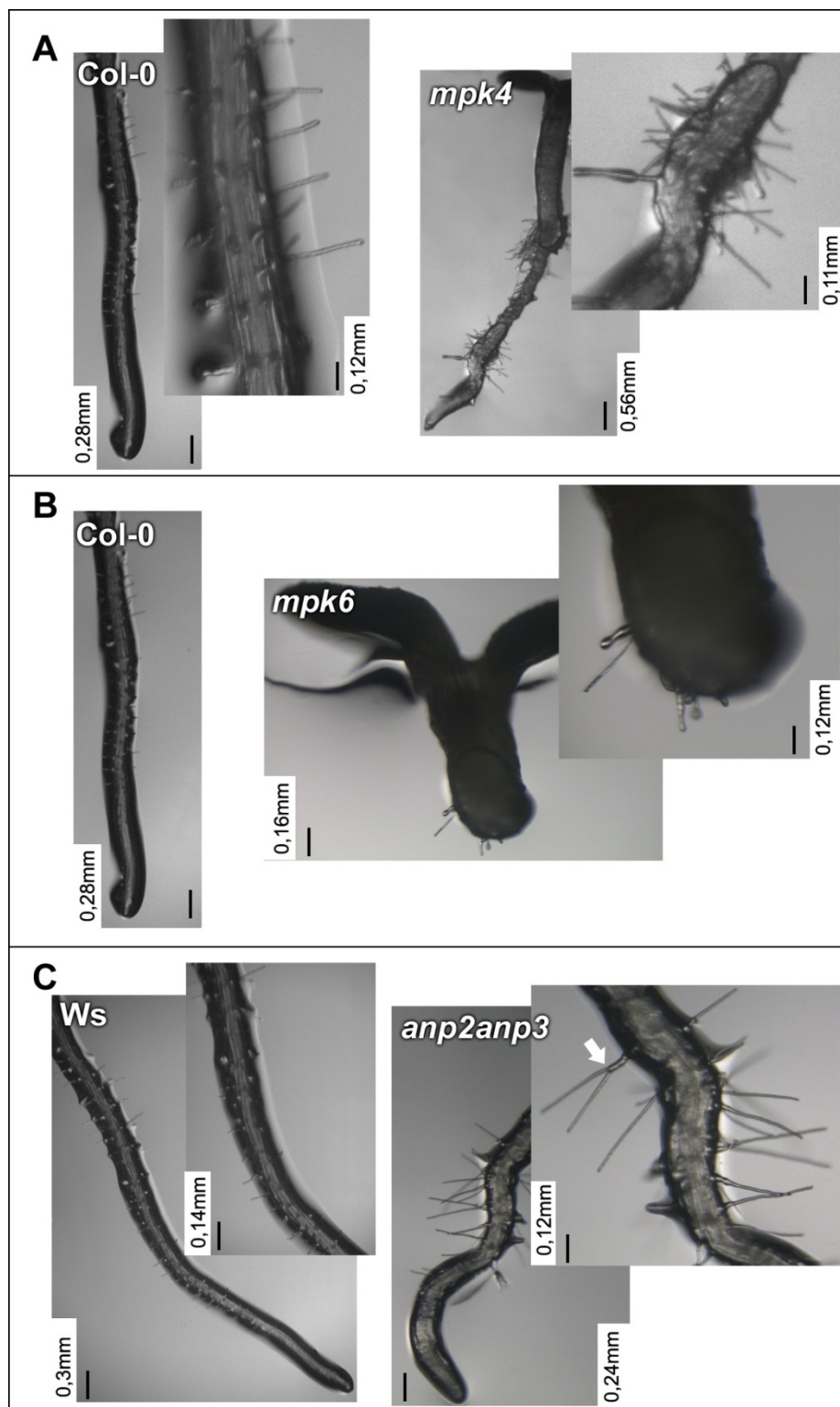


Obr. 21 Vplyv chladového stresu na koreňové fenotypy *mpk4*, *mpk6-2a* *anp2anp3* mutantov a príslušných divokých typov rastúcich na médiu pri 4°C.

A Reprezentatívne obrázky semenáčikov Col-0 a *mpk4* mutantu na 3 deň po pôsobení chladu.

B Reprezentatívne obrázky semenáčikov Col-0 a *mpk6-2* mutantu na 3 deň po pôsobení chladu.

C Reprezentatívne obrázky semenáčikov Ws a *anp2anp3* mutantu na 3 deň po pôsobení chladu.

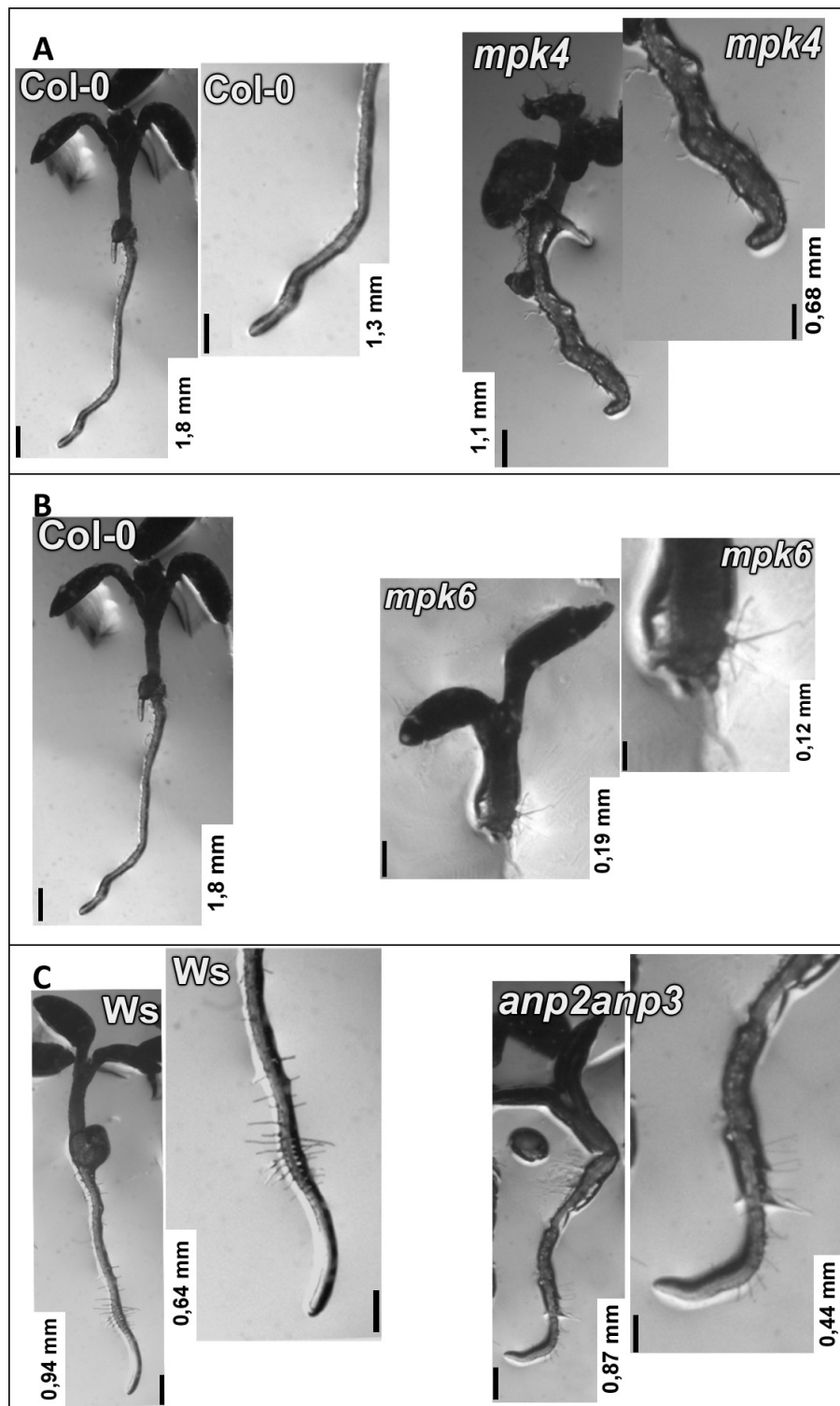


Obr. 22 Porovnanie fenotypov koreňových vlások *mpk4*, *mpk6-2* a *anp2anp3* mutantov a príslušných divokých typov rastúcich pri 4°C.

A Reprezentatívne detailné obrázky semenáčikov Col-0 a *mpk4* mutantu na 3 deň po pôsobení chladu.

B Reprezentatívne detailné obrázky semenáčikov Col-0 a *mpk6-2* mutantu na 3 deň po pôsobení chladu.

C Reprezentatívne detailné obrázky semenáčikov Col-0 a *anp2anp3* mutantu na 3 deň po pôsobení chladu. Mutant ukazuje vetvenie koreňových vlások (šípky).

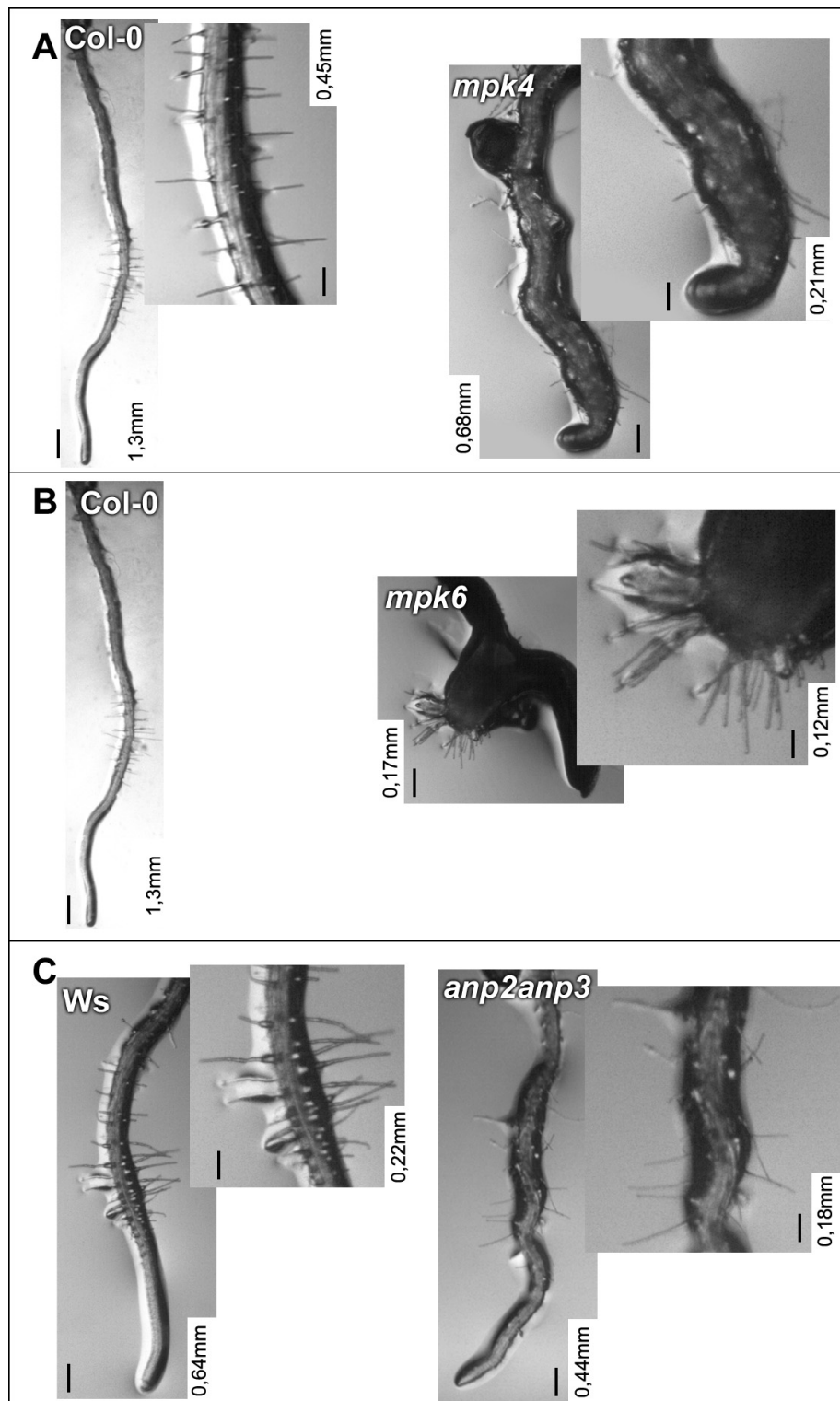


Obr. 23 Vplyv oxidatívneho stresu na koreňové fenotypy *mpk4*, *mpk6-2* a *anp2anp3* mutantov a príslušných divokých typov rastúcich na médiu s prídavkom 0,1μM paraquatu.

A Reprezentatívne obrázky semenáčikov Col-0 a *mpk4* mutantu na 3 deň po prenose na médium s prídavkom paraquatu.

B Reprezentatívne obrázky semenáčikov Col-0 a *mpk6-2* mutantu na 3 deň po prenose na médium s prídavkom paraquatu

C Reprezentatívne obrázky semenáčikov Ws a *anp2anp3* mutantu na 3 deň po prenose na médium s prídavkom paraquatu.



Obr. 24 Porovnanie fenotypov koreňových vláskov *mpk4*, *mpk6-2* a *anp2anp3* mutantov a príslušných divokých typov rastúcich na médiu s prídavkom 0,1 μ M paraquat.

A Reprézntatívne detailné obrázky semenáčikov Col-0 a *mpk4* mutantu na 3 deň po prenose na médium s prídavkom paraquat.

B Reprézntatívne detailné obrázky semenáčikov Col-0 a *mpk6* mutantu na 3 deň po prenose na médium s prídavkom paraquat.

C Reprézntatívne detailné obrázky semenáčikov Col-0 a *anp2anp3* mutantu na 3 deň po prenose na médium s prídavkom paraquat.

9.3. Imunocytochemické štúdium cytoskeletu u *mpk4*, *mpk6-2* a *anp2anp3* mutantov a u divokých typov Col-0 a Ws metódou "whole mount"

Imunocytochemicky bol sledovný vplyv osmotického (NaCl a sacharóza), oxidatívneho (paraquat) a chladového (4°C) stresu na organizáciu mikrotubulov (MT) u divokých typov (Col-0 a Ws) a vybraných mutantov (*mpk4*, *mpk6-2* a *anp2anp3*) *A. thaliana* pomocou "whole mount" metódy. MT boli vizualizované použitím primárnej protilátky proti α -tubulínu (Yol1/34). Charakteristické usporiadanie MT u divokých typov Col-0 a Ws a mutantov *mpk4*, *mpk6* a *anp2anp3* rastúcich na kontrolných podmienkach je zobrazené na Obr. 1 a 2 (Príloha).

U divokých typov (Col-0 a Ws) a mutantov (*mpk4*, *mpk6* a *anp2anp3*) osmotický stres navodený 100mM NaCl spôsobuje dezorientáciu, fragmentáciu a zväzkovanie kortikálnych mikrotubulov (Príloha Obr. 3 a 4). Fragmentácia MT je výraznejšia u divokého typu Ws, u ktorého pozorujeme väčší počet rozpadnutých MT. V koreňových bunkách divokých typov rastlín boli kortikálne MT orientované paralelne a vo väčšine prípadov priečne alebo šikmo k hlavnej osi koreňa (Príloha Obr. 3 a 4). U *mpk4* a *mpk6-2* mutantov pozorujeme zväzkovanie a fragmentáciu MT (Príloha Obr. 3). U *anp2anp3* mutanta bolo pozorované zväzkovanie MT (Príloha Obr. 4).

Pôsobením 150mM NaCl na koreňové bunky divokých typov a mutantov dochádza k zväzkovaniu, fragmentácií a postupnej depolymerizácií MT (Obr. 25 a 26). U divokého typu Col-0 dochádza k zväzkovaniu a k fragmentácií MT (Obr. 25 A a B). U *mpk4* a *mpk6-2* mutantov dochádza k zväzkovaniu MT (Obr. 25 C-F). U divokého typu Ws bolo pozorované výraznejšie zväzkovanie a rozpad MT (Obr. 26 A a B) v porovnaní s divokým typom Col-0. Depolymerizácia MT je najvýraznejšia u *anp2anp3* mutanta (Obr. 26 C a D).

Zväzkovanie, fragmentácia a dezorientácia MT v koreňových bunkách divokých typov i mutantov bola tiež pozorovaná osmotickým stresom navodeným 3% sacharózou. U divokých typov Col-0 a Ws a *mpk4* a *mpk6-2* mutantov dochádza k zväzkovaniu MT (Príloha Obr. 5 a 6). Naproti tomu u *anp2anp3* mutanta dochádza nielen k zväzkovaniu, ale aj k rozpadu MT (Príloha Obr. 6) U *mpk6* mutanta boli v meristematickej oblasti koreňa pozorované deliace vretienko a fragmoplast (Príloha Obr. 5)

Vplyvom 5% sacharózy dochádza k výraznému zväzkovaniu MT v koreňových bunkách oboch divokých typov (Obr. 27 A-B, 28 A-B). V meristematickej oblasti koreňa divokých typov (Col-0 i Ws) boli pozorované mitotické figúry, ako je deliace vretienko a fragmoplast (Obr 27 A, 28 B). U mutantov bola pozorovaná náhodná konfigurácia kortikálnych MT, ktoré stratili paralelnú orientáciu v epidermálnych bunkách. Navyiac, u mutantov sme pozorovali nielen častejšie uloženie kortikálnych MT vo zväzkoch, ale aj

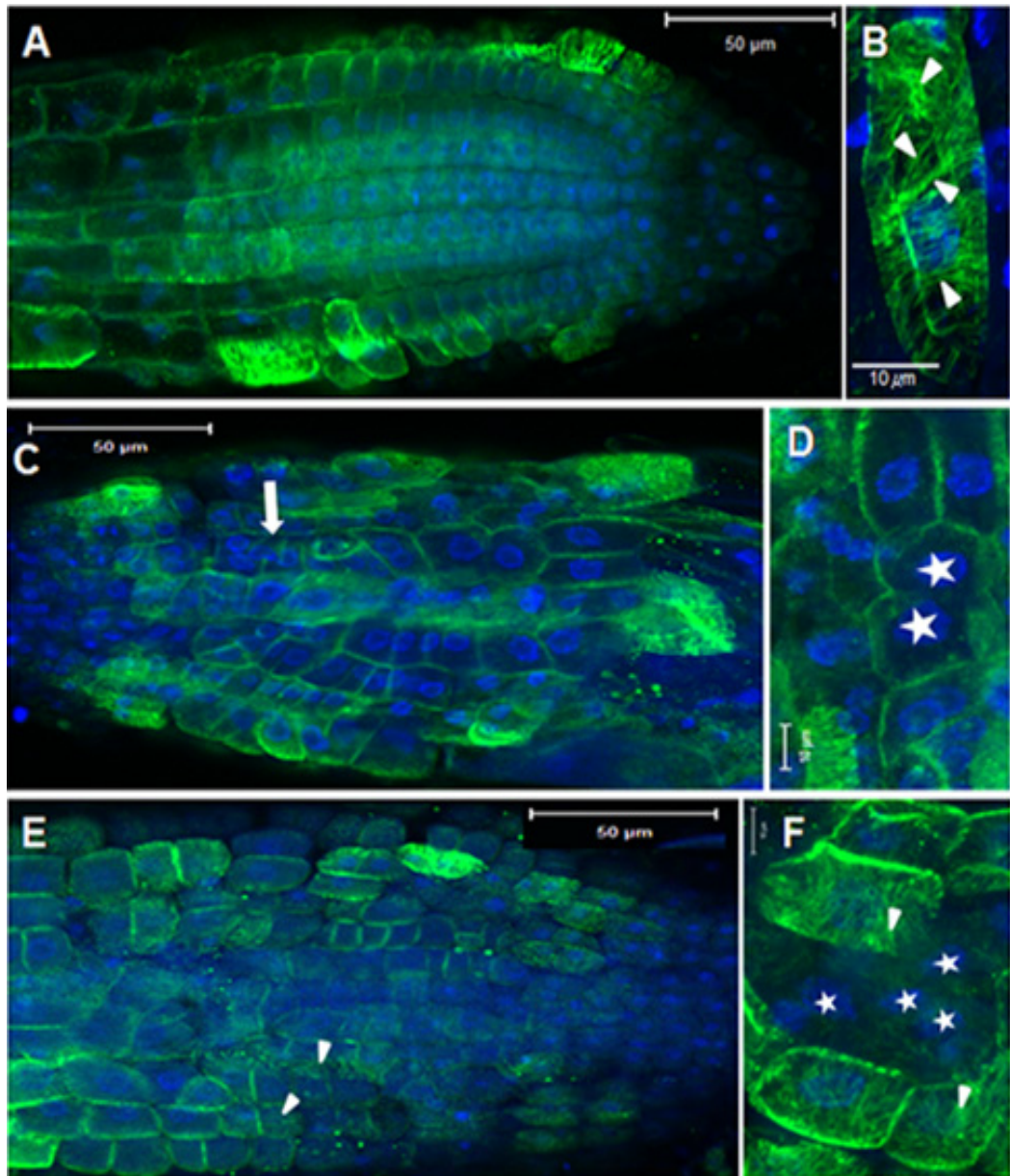
chaotické usporiadanie a fragmentáciu kortikálnych MT (Obr.27 C a E-G, 28 C). Chladový stres (4°C) spôsobuje u divokých typov zväzkovanie a fragmentáciu kortikálnych MT (Obr. 29 A a C, 30 A-B). V meristematickej oblasti koreňa divokého typu Col-0 boli pozorované mitotické figúry ako deliace vretienko a fragmoplast (Obr. 29 A a B). U všetkých mutantov dochádza k depolymerizácii kortikálnych MT (Obr. 29 D-F, 30 C-D).

Oxidatívny stres vyvolaný 0,1µM paraquatom spôsobuje u divokých typov (Col-0 a Ws) depolymerizáciu a zväzkovanie kortikálnych MT (Obr. 31 A-C, 32 A-B). všetky mutanti ukazujú depolymerizáciu kortikálnych MT (Obr. 31 D-G, 32 C-D).

9.4. Mitóza a cytokinetické poruchy

Mikroskopickou analýzou sme u *mpk4*, *mpk6-2* a *anp2anp3* mutantov pozorovali cytokinetické defekty, poruchy v tvorbe bunkovej steny, čo má za následok vznik viacjadrovej bunky u *mpk4* a *anp2anp3* mutantov (Obr. 25 C-D a F, 27 C-D, 28 C).

Pomocou imunoznačenia MT metódou "whole-mount" bol u *mpk6-2* mutantu potvrdený atypický vzor polohy roviny delenia, pri ktorom dochádza k posunutiu polohy PPBs, vretienka a fragmoplastu (Obr. 27 D), ako aj k lokálnej akumulácii mitotických MT. U mutantu *mpk6-2* je oproti divokému typu Col-0 lokálna akumulácia PPB a fragmoplastov, čo má za následok lokálne zhlukovanie buniek.



Obr. 25 Imunofluorescenčná lokalizácia MT (zelené) v koreňoch divokého typu Col-0 a *mpk4* a *mpk6-2* mutantov po ošetrení 150mM NaCl. Jadrá sú kontrastne farbené s DAPI na modro.

A Koreňová špička divokého typu Col-0 ukazujúca zväzkovanie MT po pôsobení NaCl.

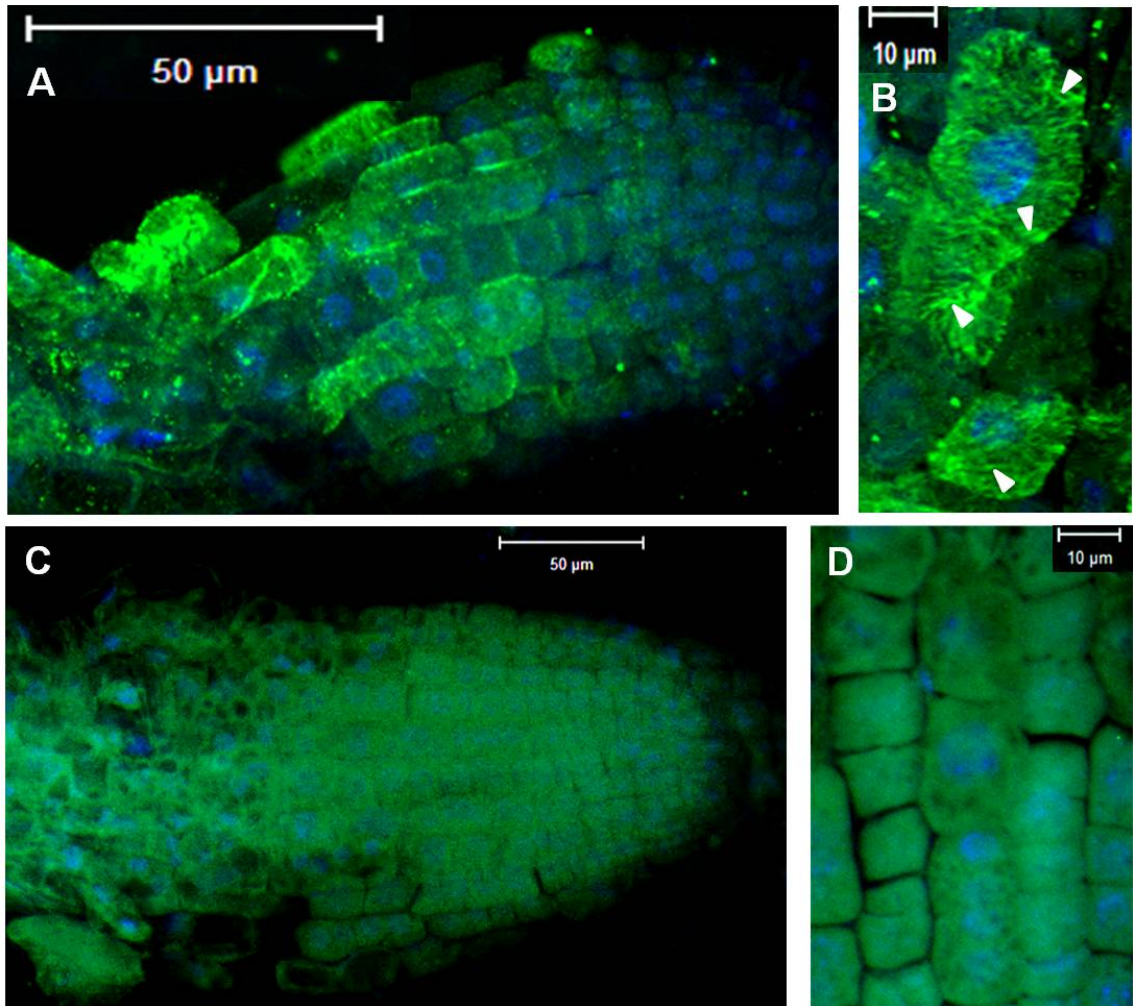
B Detail divokého typu Col-0 ukazujúci zväzkovanie MT (šípky) počas po pôsobení NaCl.

C Koreňová špička *mpk4* mutantu ukazujúca rozpad MT a prítomnosť viacjadrovej bunky (šípka) počas pôsobenia NaCl.

D Detail *mpk4* mutantu ukazujúci dvojjadrovú bunku (hviezdy).

F Koreňová špička *mpk6-2* mutantu ukazujúca zväzkovanie MT (šípky) po pôsobení NaCl.

G Detail *mpk6-2* mutantu ukazujúci viacjadrovú bunku (hviezdy) a zväzkovanie MT (šípky).



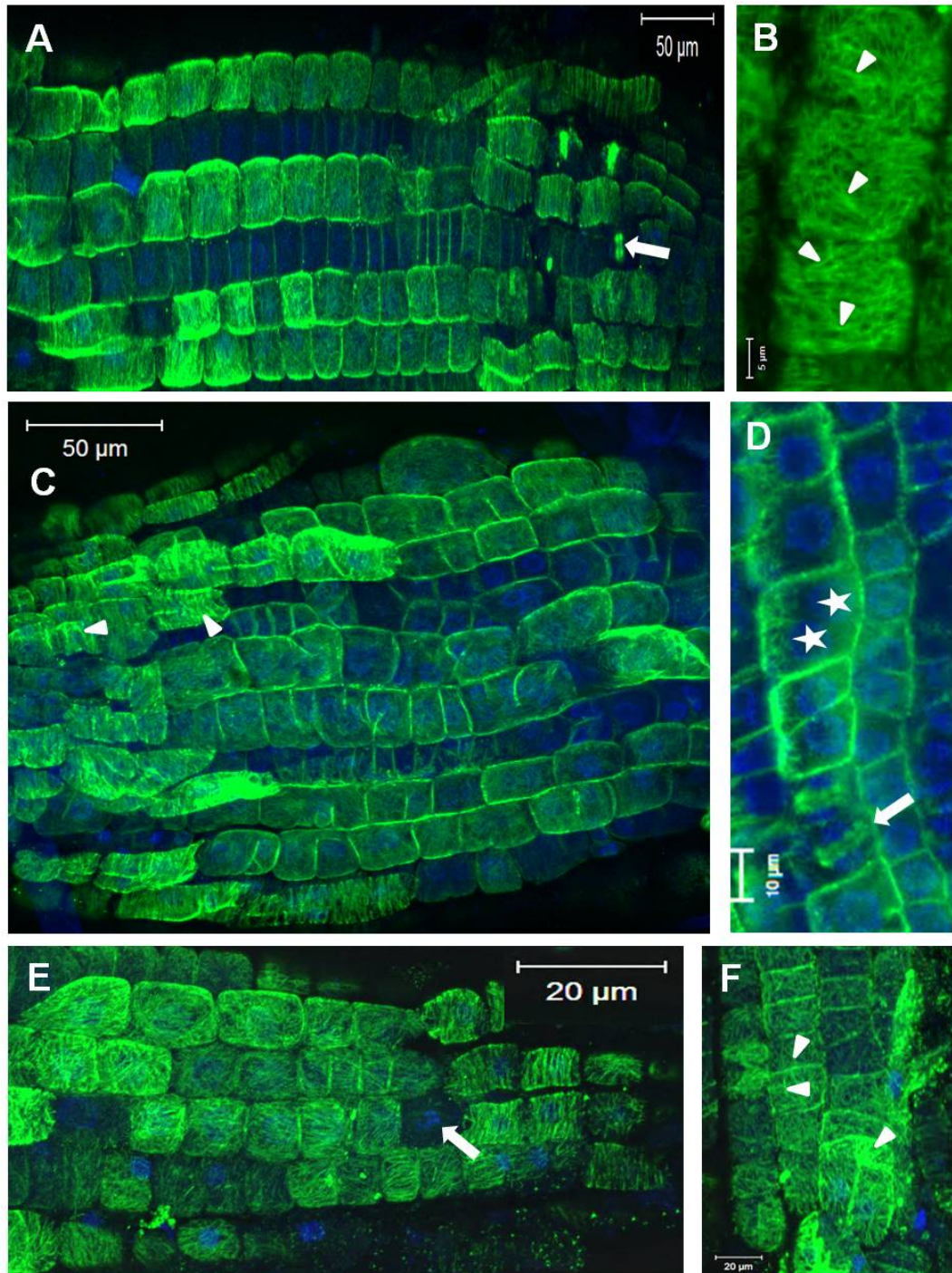
Obr. 26 Imunofluorescenčná lokalizácia MT (zelené) v koreňoch divokého typu *Ws* a *anp2anp3* mutanta po ošetrení 150mM NaCl. Jadrá sú kontrastne farbené s DAPI na modro.

A Koreňová špička divokého typu *Ws* ukazujúca zväzkovanie a rozpad MT po pôsobení NaCl.

B Detail divokého typu *Ws* ukazujúci zväzkovanie MT (šípky) po pôsobení NaCl.

C Koreňová špička *anp2anp3* mutanta ukazujúca depolymerizáciu kortikálnych MT po pôsobení NaCl.

D Detail *anp2anp3* mutanta ukazujúci rozpad kortikálnych MT počas pôsobenia NaCl.



Obr. 27 Imunofluorescenčná lokalizácia MT (zelené) v koreňoch divokého typu Col-0 a *mpk4* a *mpk6-2* mutantov po ošetrení 5% sacharózou. Jadrá sú kontrastne farbené s DAPI na modro.

A Koreňová špička divokého typu Col-0 ukazujúca zväzkovanie a rozpad MT a prítomnosť fragmoplastu (šípky) po pôsobení sacharózy.

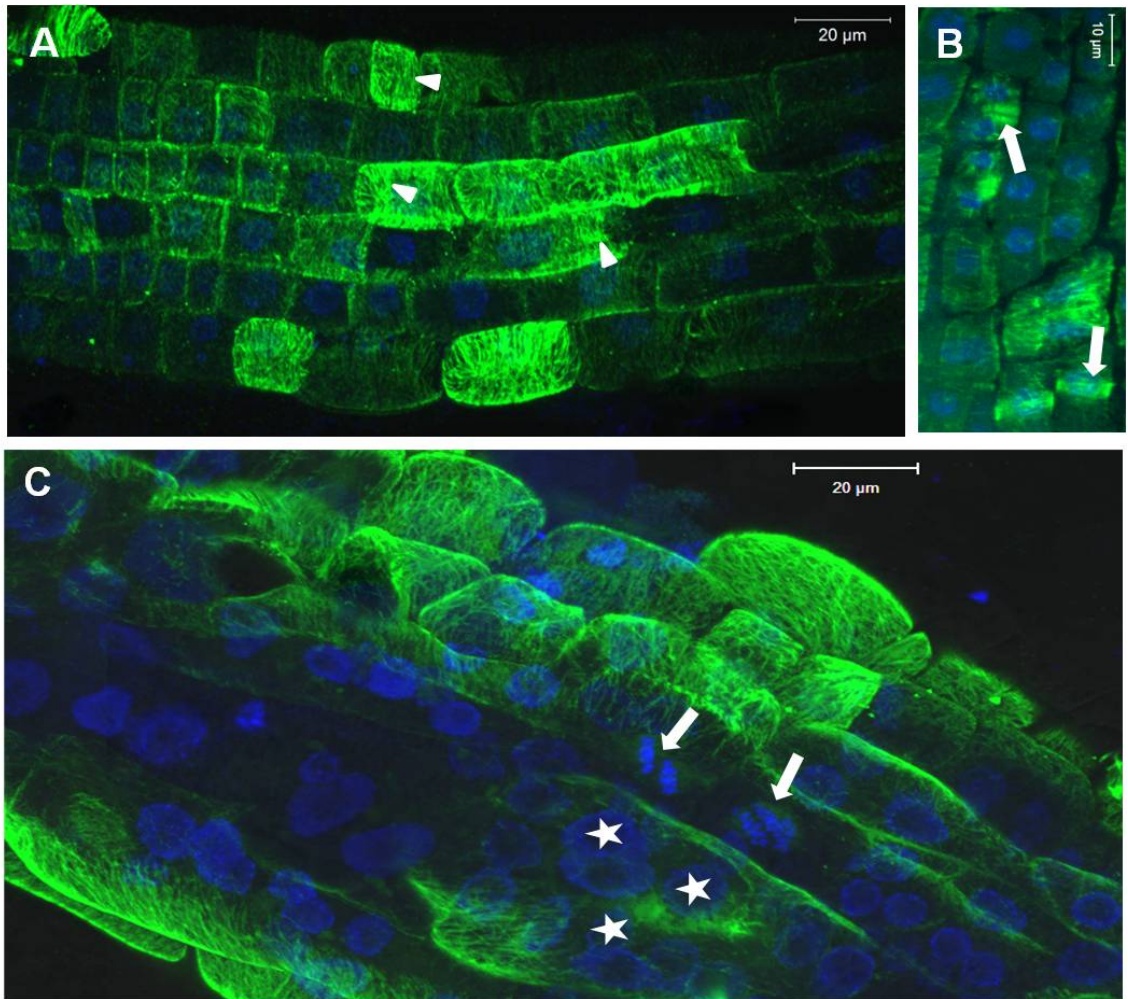
B Detail divokého typu Col-0 ukazujúci zväzkovanie MT (šípky) po pôsobení sacharózy.

C Koreňová špička *mpk4* mutantu ukazujúca zväzkovanie MT (šípky) po pôsobení sacharózy.

D Detail *mpk4* mutantu ukazujúci dvojjadrovú bunku (hviezdy) a prítomnosť šikmo orientovaného fragmoplastu (šípka) po pôsobení sacharózy.

E Koreňová špička *mpk6-2* mutantu ukazujúca rozpad MT po pôsobení sacharózy. Deliace vretienko je označené šípkou.

F Detail *mpk6-2* mutantu ukazujúci zväzkovanie a rozpad MT (šípky).

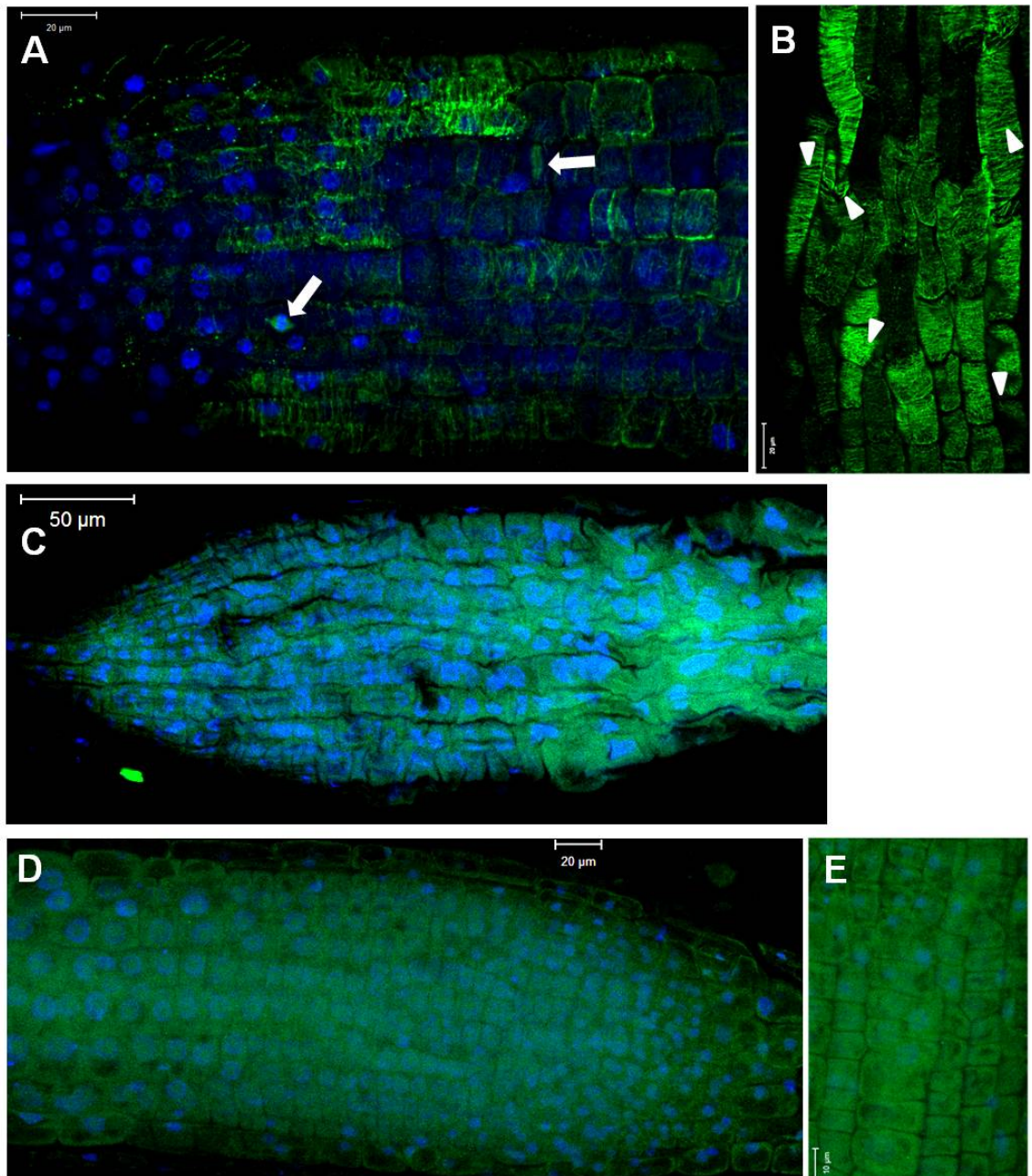


Obr. 28 Imunofluorescenčná lokalizácia MT (zelené) v koreňoch divokého typu *Ws* a *anp2anp3* mutanta po ošetrení 5% sacharózou. Jadrá sú kontrastne farbené s DAPI na modro.

A Koreňová špička divokého typu *Ws* ukazujúca zväzkovanie kortikálnych MT (šípky) po pôsobení sacharózy.

B Detail divokého typu *Ws* ukazujúci vytvorenie PPB a fragmoplastov (šípky) po pôsobení sacharózy.

C Koreňová špička *anp2anp3* mutanta ukazujúca zväzkovanie kortikálnych MT a prítomnosť mnohoadrovej bunky (hviezdy) a synchronizovaných anafáz (šípky) po pôsobení sacharózy.



Obr. 29 Imunofluorescenčná lokalizácia MT (zelené) v koreňoch divokého typu Col-0 a *mpk4* a *mpk6-2* mutantov po navodení chladového stresu. Jadrá sú kontrastne farbené s DAPI na modro.

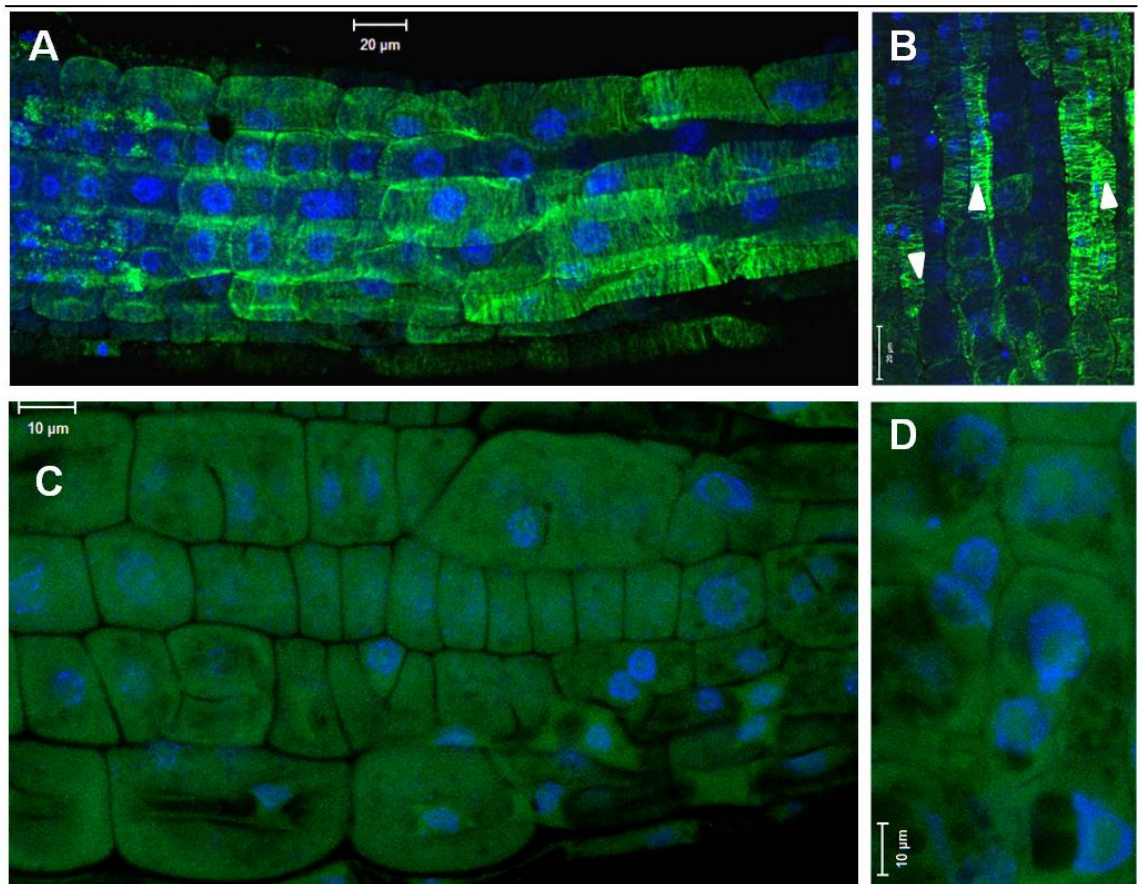
A Koreňová špička divokého typu Col-0 ukazujúca zväzkovanie a rozpad MT (šípky) navodením chladu. Mitotické vretienko a fragmoplast sú označené šípkami.

B Detail divokého typu Col-0 ukazujúci zväzkovanie MT (šípky) pôsobením chladu.

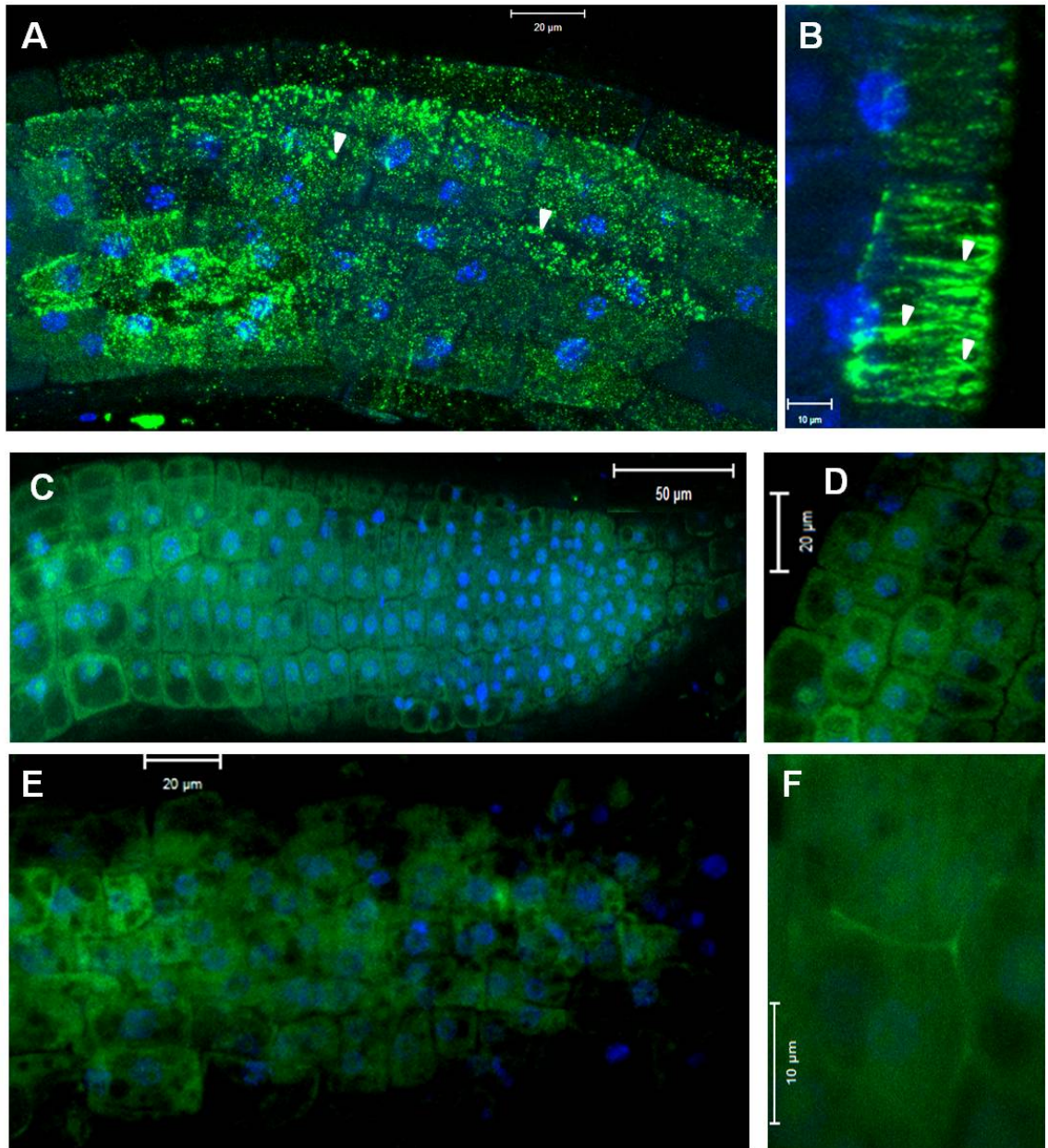
C Koreňová špička *mpk4* mutantu ukazujúca rozpad kortikálnych MT pôsobením chladu.

D Koreňová špička *mpk6-2* mutantu ukazujúca rozpad MT pôsobením chladu.

E Detail *mpk6-2* mutantu ukazujúci rozpad MT pôsobením chladu.



Obr. 30 Imunofluorescenčná lokalizácia MT (zelené) v koreňoch divokého typu *Ws* a *anp2anp3* mutanta po navodení chladového stresu. Jadrá sú kontrastne farbené s DAPI na modro.
A Koreňová špička divokého typu *Ws* ukazujúca zväzkovanie a rozpad MT pôsobením chladu.
B Detail divokého typu *Ws* ukazujúci zväzkovanie kortikálnych MT (šípky) pôsobením chladu.
C Koreňová špička *anp2anp3* mutanta ukazujúca rozpad MT pôsobením chladu.
D Detail *anp2anp3* mutanta ukazujúci rozpad MT pôsobením chladu.



Obr. 31 Imunofluorescenčná lokalizácia MT (zelené) v koreňoch divokého typu Col-0 a *mpk4* a *mpk6-2* mutantov po ošetrení 0,1μM paraquatom. Jadrá sú kontrastne farbené s DAPI na modro.

A Koreňová špička divokého typu Col-0 ukazujúca zväzkovanie a rozpad MT (šípky) pôsobením paraquatu.

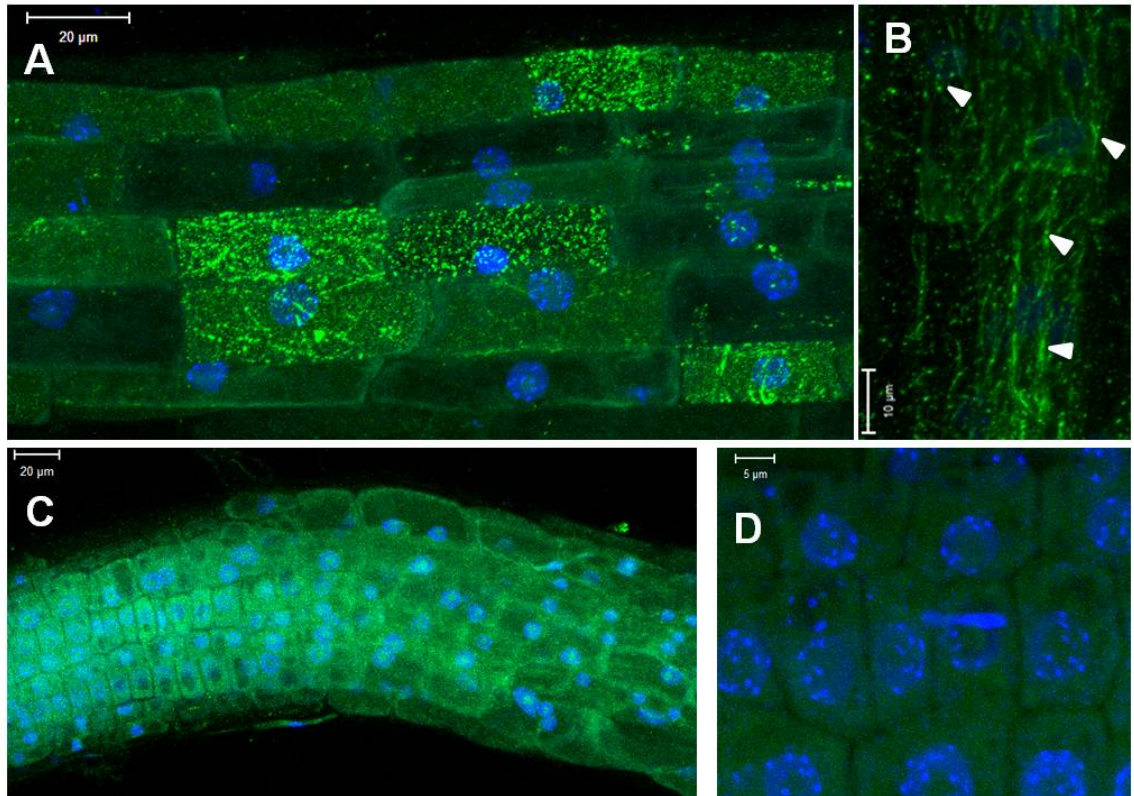
B Detail divokého typu Col-0 ukazujúci zväzkovanie MT (šípky) po ošetrení paraquatom.

C Koreňová špička *mpk4* mutantu ukazujúca rozpad MT po ošetrení paraquatom.

D Detail *mpk4* mutantu ukazujúci rozpad MT po ošetrení paraquatom.

E Koreňová špička *mpk6-2* mutantu ukazujúca rozpad MT po ošetrení paraquatom.

F Detail *mpk6-2* mutantu ukazujúci rozpad MT po ošetrení paraquatom.



Obr. 32 Imunofluorescenčná lokalizácia MT (zelené) v koreňoch divokého typu *Ws* a *anp2anp3* mutanta po ošetrení 0,1 μ M paraquatom. Jadrá sú kontrastne farbené s DAPI na modro.

A Koreňová špička divokého typu *Ws* ukazujúca zväzkovanie a rozpad MT po ošetrení paraquatom.

B Detail divokého typu *Ws* ukazujúci zväzkovanie a rozpad kortikálnych MT (šípky) po ošetrení paraquatom.

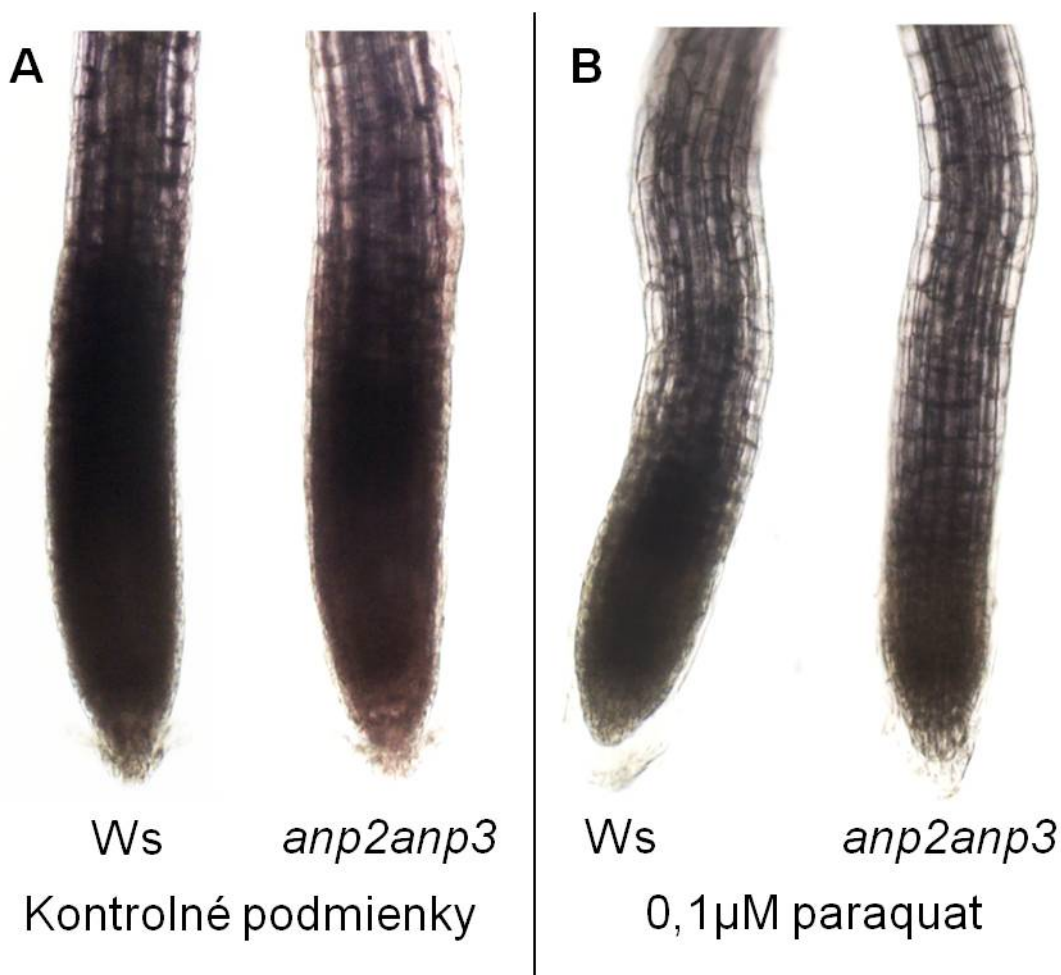
C Koreňová špička *anp2anp3* mutanta ukazujúca rozpad MT po ošetrení paraquatom.

D Detail *anp2anp3* mutanta ukazujúci rozpad MT po ošetrení paraquatom.

9.5. Histochemická lokalizácia superoxidu

Sledovaním fenotypových zmien spôsobených oxidatívnym stresom (navodeným 0,1 μ M paraquatom) u jednotlivých mutantov a príslušných divokých typov sme zistili, že *anp2anp3* mutant je najrezistentnejší (Obr. 7 CaD a Obr. 20 A a B). Preto sme sledovali distribúciu O₂⁻ v koreňoch divokého typu *Ws* a *anp2anp3* mutantu za použitia NBT.

NBT vytvára tmavomodrú až modročierne zrazeninu formazánu v kontakte s superoxidom. Modročierne zafarbenie označujúce prítomnosť O₂⁻ sme pozorovali v koreňovej špičke divokého typu *Ws* a *anp2anp3* mutantu kultivovaných v kontrolných podmienkach. Sfarnenie koreňových špičiek u *anp2anp3* mutantu malo slabšiu intenzitu. U divokého typu *Ws* pôsobením oxidatívneho stresu pozorujeme silnejšie zafarbenie koreňovej špičky ako u *anp2anp3* mutantu (Obr. 32 B).



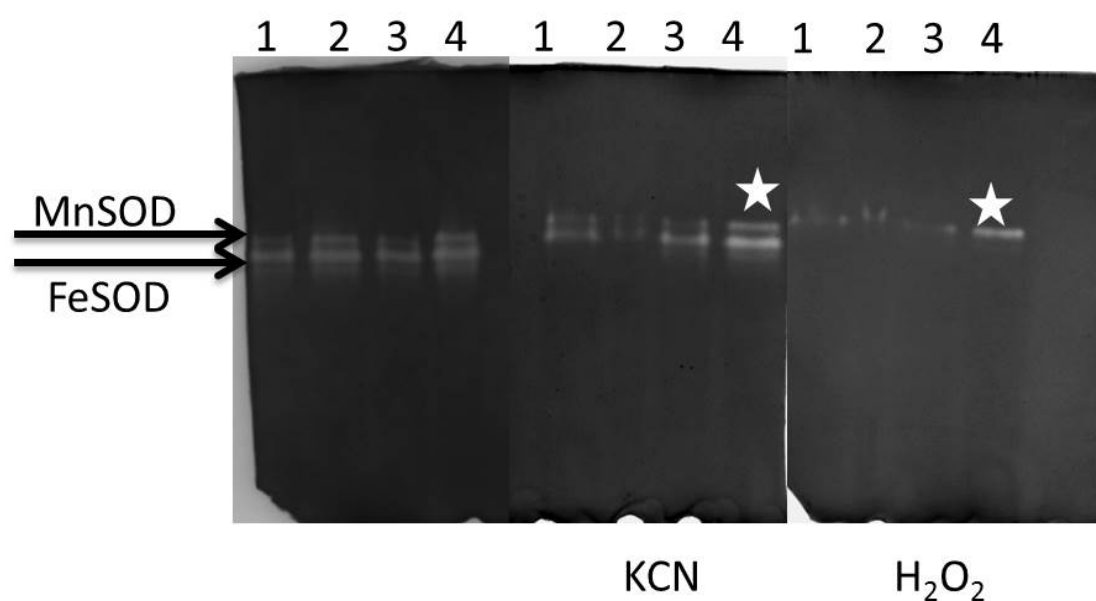
Obr. 32 Histochemická lokalizácia distribúcie superoxidu v koreňoch divokého typu *Ws* a *anp2anp3* mutantu.

A Distribúcia superoxidu v koreňoch divokého typu *Ws* a *anp2anp3* mutantu, ktoré rástli na ½ MS médiu.

B Distribúcia superoxidu v koreňoch divokého typu *Ws* a *anp2anp3* mutantu, ktoré rástli na ½ MS médiu s prídavkom 0,1 μ M paraquatu.

9.6. Biochemická analýza aktivity superoxid dismutázy

Proteíny z listov a koreňov divokého typu *Ws* a *anp2anp3* mutanta boli separované na 10% natívnom polyakrylamidovom gély. Počas elektroforetickej separácie došlo k odeleniu dvoch izoformiem SOD. Izozýmy boli určené na základe rezistencie k inhibítorm KCN a H_2O_2 . Po aplikácii inhibítora KCN na gél boli určené, dve izoformy, ktoré sú rezistentné voči tomuto inhibítoru, MnSOD a FeSOD. Po aplikácii inhibítora H_2O_2 , bol určený izozým MnSOD, ktorý je rezistentný na H_2O_2 . U *anp2anp3* mutanta bola pozorovaná zvýšená aktivita izozým FeSOD i MnSOD oproti divokému typu *Ws*. Táto aktivita bola zvýšená v koreňoch i listoch. (Obr. 33, dráha 2 a 4.).



Obr.33 Natívna PAGE, farbená na aktivitu SOD izozýmom v koreňoch a listoch divokého typu *Ws* a *anp2anp2* mutanta prostredníctvom inhibítorm KCN a H_2O_2 .

Dráha 1- korene divokého typu *Ws*, dráha 2- korene *anp2anp3* mutanta, dráha 3- listy divokého typu *Ws*, dráha 4- listy *anp2anp3* mutanta. Hviezda označuje zvýšenú aktivitu izozýmu MnSOD

10. Diskusia

Koreňový fenotyp *mpk4*, *mpk6-2* a *anp2anp3* mutantov bol v súlade s fenotypmi, ktoré boli predtým pozorované u týchto mutantov (Krysan et al., 2002; Beck et al., 2010; Müller et al., 2010). Mutanti *mpk4* a *anp2anp3* majú veľmi podobný fenotyp, nielen na úrovni celých orgánov, ale aj jednotlivých buniek. Korene ukazujú spomalený rast a sú značne kratšie v porovnaní so semenáčikmi divokých typov (Obr. 3 A a B). Mutant *mpk6-2* má zníženú fertilitu a dĺžku šesule (Bush & Krysan, 2007) a koreňový fenotyp "bez koreňa" alebo "skrátенý koreň" (Obr. 3 A). Avšak tento fenotyp je len dočasný a na 6. deň začína vyvíjať primárny koreň a na 10. deň pozorujeme vývoj adventívnych koreňov (Obr. 4 C).

Defekty v cytoskelete MT úzko súvisia s radiálnou expanziou buniek (Baskin et al., 1994; Whittington et al., 2001; Sugimoto et al., 2003; Collings et al., 2006; Gardiner et al., 2008). Rozdielne fenotypy koreňových vláskov a porucha bunkovej expanzie u *mpk4* a *anp2anp3* mutantov naznačujú aberantnú organizáciu MT.

Je známe, že MPK4 môže byť aktivovaná MEKK1 počas abiotického a biotického stresu, ale podľa genetických a transkripčných štúdií to nie je jediná stresom aktivovaná MAPK dráha u *Arabidopsis*. (Ichimura et al., 2006; Mészáros et al., 2006; Nakagami et al., 2006; Su et al., 2007; Suarez-Rodriguez et al., 2007). Na rozdiel od *mkk1* mutanta, u ktorého so vzrastajúcou koncentráciou NaCl dochádza k záchrane rastu, rast *mpk4* mutanta je NaCl inhibovaný (Su et al., 2007). Mutanti *mkk1* a *mpk4* nemajú podobný fenotyp koreňov a ružice listov (Nakagami et al., 2006; Beck et al., 2010), z toho vyplýva, že MEKK1 nie je s MPK4 začlenená do rovnakej dráhy počas vývoja rastliny.

Analýza organizácie MT bola uskutočnená *in situ* imunofluorescenčným značením tubulínu metódou „whole mount“ (Müller et al., 2010) u *mpk4*, *mpk6-2* a *anp2anp3* mutantov a porovnaná s odpovedajúcimi divokými typmi.

Je známe, že mutanti *mpk4* a *anp2anp3* majú cytokinetické defekty (Krysan et al., 2002; Beck et al., 2010). Dochádza u nich k neúplným a aberantným tvorbám bunkovej roviny (šikmé bunkové roviny). Napriek podobnostiam mutantov v mitotických a cytokinetických defektoch, zdá sa, že sú tieto defekty častejšie u *mpk4* mutanta, ako u *anp2anp3* mutanta. Z toho plynie, že ANP2, ANP3 a MPK4 pravdepodobne fungujú spoločne vo vývojovej dráhe, ktorá reguluje morfogézu, tvar a zväzkovanie kortikálnych MT. Pri porovnaní *mpk4* mutanta s dvojitým *anp2anp3* mutantom, u ktorého sú známe cytokinetické defekty (Krysan et al., 2002) a ich podobnosť v organizácii MT, sa zdá, že ANP2/ANP3, MPK4 (Beck et al., 2011) a MPK6 (Müller et

al., 2010) a možno aj MAP65-1 ako jeden zo substrátov MAPK, môžu byť dôležité pre organizáciu a dynamiku mitotických MT vo vegetatívnych orgánoch.

Všeobecne je známe, že PPB a fragmoplast reprezentujú cytoskeletálne štruktúry fungujúce v bunkovom delení rastlín (Müller et al., 2009). Každá z týchto štruktúr sa formuje v určitom štádiu bunkového cyklu a má veľmi špecifickú funkciu (Goddard et al., 1994). U mutanta *mpk6-2* sa vyskytujú ektopické bunkové delenia. MPK6 sa hromadí v štruktúrach, ktoré sú spojené s MT v PPB a fragmoplaste počas bunkového delenia v koreňoch *Arabidopsis* (Müller et al., 2010).

Rastliny, ktoré znesú teplotu pod nulou potrebujú určitý čas na aklimatizovanie. Abdrakhamanova et al., (2003) zistili, že prechodný rozklad MT môže byť súčasťou aklimatizácie na chlad. Ukázali, že pri 4°C dochádza na chlad odolnej odrody pšenice k rýchlej ale prechodnej dezorganizácii kortikálnych MT v kortexových bunkách koreňa. Počas aklimatizácie dochádza k zmene zloženia α -tubulínu.

Pôsobením chladového stresu dochádza u divokých typov k zväzkovaniu a rozpadu mikrotubulov, ale u všetkých troch mutantov bola pozorovaná depolymerizácia mikrotubulov. Pôsobenie chladového stresu, nemá podobný priebeh na organizáciu mikrotubulov ako teplotný stres.

Vplyvom tepelného stresu dochádza k zmenám nielen v organizácii MT, ale aj v dynamike bunkového cyklu (Smertenko et al., 1997). Mikrotubuly, ktorú majú šikmú a hlavne pozdĺžnu orientáciu sú odolnejšie voči tepelnému stresu v bunkách mladých semenáčikov (Müller et al., 2007). To odpovedá predchádzajúcim štúdiám, pri ktorých sa zistilo, že stabilita kortikálnych MT závisí na ich orientácii (Wiesler et al., 2002). Krátkodobým pôsobením, rádovo minúty, tepelného stresu a následnou obnovou, sa zistilo, že MT, ktoré prežívajú môžu slúžiť ako vzor pre orientáciu nových MT (Müller et al., 2007). Avšak dlhodobým pôsobením chladu dochádza k úplnej depolymerizácii MT. Mechanizmus stabilizácie MT zostáva zatiaľ neznámy, predpokladá sa vplyv MAP proteínov, čo by vysvetľovalo obnovu MT u dospelých buniek koreňových vláskov, ktoré pôsobením tepla strácajú väčšiu časť MT. U týchto buniek musia byť nové MT tvorené a orientované bez vzoru. Vplyv MAP proteínov by sa mohol potvrdiť pri obnove MT, ktoré boli depolymerizované chladovým stresom.

Reaktívne formy kyslíka (ROS) sú produkované nielen v stresovaných bunkách, ale aj v nestresovaných a podieľajú sa na vnímaní stresu a na aktivácii antioxidantného systému (Jacquard et al., 2009). V rámci bunky je SOD prvým obrancom voči ROS. SOD je enzým odbúravajúci superoxid za vzniku peroxidu. Superoxid vzniká priamou redukciou O_2 v chloroplastoch a je premieňaný na H_2O_2 a O_2 superoxid dismutázou. MPK6 je ovplyvnená intracelulárnou produkciou ROS v systéme fotosyntézy. Pomocou natívnej elektroforézy sme v semenáčikoch divokého typu *Ws* a mutanta *anp2anp3*

sledovali aktivitu izozýmů superoxid dismutázy. Mutant *anp2anp3* mal v koreňoch aj v listoch zvýšenú aktivitu SOD. Tým by sa vysvetlila rezistencia *anp2anp3* mutanta voči oxidatívne mu stresu, ktorý bol navodený 0,1 μ M paraquatom, v porovnaní s divokým typom *Ws*. Korene *anp2anp3* mutanta a divokého typu, ktoré boli ošetrované paraquatom a sledovaním distribúciu superoxidu sa potvrdilo, že *anp2anp3* mutant má v koreni nižšiu distribúciu superoxidu ako divoký typ. Avšak schopnosť *anp2anp3* mutanta znižovať hladinu superoxidu a prežívať na oxidatívnom strese, nie je v spojitosti s organizáciou mikrotubulov. U tohto mutanta dochádza k úplnej depolymerizácii mikrotubulov.

11. Záver

V teoretickom úvode boli zhrnuté základné poznatky o MAPK signalingu, cytoskelete rastlín a o spôsoboch odpovede rastlinných buniek na vybrané abiotické stresy.

V praktickej časti bol najskôr charakterizovaný fenotyp *mpk4*, *mpk6* a *anp2anp3* mutantov. Následne prebehla optimalizácia kultivácie vybraných mutantov a príslušných divokých typov v stresových podmienkach. Na semenáčky bol aplikovaný osmotický (75, 100 a 150mM NaCl, 3 a 5% sacharóza), oxidatívny (0,1μM paraquat) a chladový (4°C) stres.

Fenotypová analýza pôsobenia osmotického, oxidatívneho a chladového stresu odhalila, že u *mpk4*, *mpk6* a *anp2anp3* mutantov, tak isto ako aj divokých typov Col-0 a Ws má naväčší inhibičný účinok na rast koreňa chladový stres a to už deň po prenose do stresových podmienok. Z divokých typov je Ws citlivejšia na osmotický stres spôsobený 5% sacharózou, naproti tomu Col-0 je citlivejšia na osmotický stres spôsobený 150mM NaCl. Mutanti *mpk4* a *anp2anp3* sú rovnako citlivé na osmotický stres vyvolaný sacharózou (3% a 5% sacharóza) a soľou (75mM, 100mM a 150mM NaCl). Na oxidatívny stres spôsobený 0,1μM paraquatom je najmenej citlivý mutant *anp2anp3*. Mutant *mpk6-2* je najmenej citlivý na osmotický stres vyvolaný soľou. Mutant *mpk6-2* je odolnejší na osmotický stres (soľný i cukorný) ako mutanti *mpk4* a *anp2anp3*. Zatiaľ čo *mpk4* a *anp2anp3* mutanti vykazujú rovnakú senzitivitu na osmotický stres (NaCl a sacharóza).

Ďalšou časťou bolo imunocytochemické štúdium vplyvu osmotického, oxidatívneho a chladového stresu na cytoskelet metódou „whole mount“. Pôsobením osmotického (NaCl a sacharóza) stresu dochádza k zväzkovaniu a rozpadu kortikálnych MT nielen u mutantov, ale aj príslušných divokých typov. Pôsobením chladového a oxidatívneho stresu dochádza u mutantov *mpk4*, *mpk6* a *anp2anp3* k úplnej depolymerizácii kortikálnych MT, zatiaľ čo u divokých typov Col-0 a Ws len k zväzkovaniu a k rozpadu kortikálnych MT.

Na základe získaných výsledkov z fenotypovej analýzy, kedy bolo zistené, že *anp2anp3* mutant je rezistentný na pôsobenie oxidatívneho stresu. Preto sa u tohto mutantu a jeho príslušného divokého typu sledovala distribúcia O_2^- v koreňoch za použitia NBT. Bolo zistené, že pôsobením oxidatívneho stresu dochádza u *anp2anp3* mutantu k nižšej distribúcii superoxidu v porovnaní v divokým typom Ws. Následne bola stanovená aktivita enzýmu superoxid dismutázy v koreňoch a listoch *anp2anp3* mutantu a divokého typu Ws. U mutantu *anp2anp3* bola pozorovaná zvýšená aktivita izozýmu MnSOD v koreňoch aj v listoch.

12. Zoznam použitej literatúry

Abdrakhamanova A., Wang Q.Y., Khokhlova L., Nick P. (2003) Is microtubule disassembly a trigger for cold acclimation? *Plant Cell Physiol.* **44**, 676-686.

Allen R. D. (1995) Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiol.* **107**, 1049–1054.

Alvarez M. E., Pennell R. I., Meijer P. J., Ishikawa A., Dixon R. A., Lamb C. (1998) Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell.* **92**, 773–784.

Ambrose J.C., Shoji T., Kotzer A.M., Pighin J.A., Wasteneys G.O. (2007) The *Arabidopsis* *CLASP* gene encodes a microtubule-associated protein involved in cell expansion and division. *Plant Cell.* **19**, 2763–2775.

Anderson J.C., Bartels S., Besteiro M.A.G., Shahollari B., Ulm R., Peck S.C. (2011) *Arabidopsis* MAP kinase phosphatase 1 (*AtMKP1*) negatively regulates MPK6-mediated PAMP responses and resistance against bacteria. *Plant J.* **67**, 258-268.

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

Baluška F., Salaj J., Mathur J., Braun M., Jasper F., Šamaj J., Chua N.H., Barlow P.W., Volkmann D. (2000) Root hair formation: F-actin-dependent tip growth is initiated by local assembly of profilin-supported F-actin meshworks accumulated within expansin-enriched bulges. *Dev Biol.* **227**, 618-632.

Bardwell A.J., Flatauer .L.J., Matsukuma K., Thorner J., Bardwell L. (2001) A conserved docking site in MEKs mediates high-affinity binding to MAP kinases and cooperates with a scaffold protein to enhance signal transmission. *J. Biol. Chem.* **276**, 10374–10386.

Bargmann B.O., Munnik T. (2006) The role of phospholipase D in plant stress responses. *Curr Opin Plant Biol.* **9**, 515-522.

Bartels S., Anderson J.C., Besteiro M.A.G., Carreri A., Hirt H., Buchala A., Mettraux J.P., Peck S.C., Ulm R. (2009) MAP kinase phosphatase1 and protein tyrosine phosphatase1 are repressors of salicylic acid synthesis and SNC1-mediated responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. **21**, 2884-2897.

Bartels S., Besteiro M.A.G., Lang D., Ulm R. (2010) Emerging functions for plant MAP kinases phosphatases. *Trends Plant Sci*. **15**, 322-329.

Baskin T.I., Wilson J.E., Cork A., Williamson R.E. (1994) Morphology and microtubule organization in *Arabidopsis* roots exposed to oryzalin or taxol. *Plant Cell Physiol*. **35**, 935–942.

Beck M., Komis G., Müller J., Menzel D., Šamaj J. (2010) Arabidopsis homologs of nucleus- and phragmoplast-localized kinase 2 and 3 and mitogen-activated protein kinase 4 are essential for microtubule organization. *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.

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

Bögre L., Calderini O., Binarova P., Mattauch M., Till S., Kiegerl S.,Jonak C., Pollaschek C., Barker P., Huskisson N.S., Hirt H., Heberle-Bors E. (1999) A MAP kinase is activated late in plant mitosis and becomes localized to the plane of cell division. *Plant Cell*. **11**, 101-113.

Bolwell G. P., Wojtaszek P. (1997) Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence – a broad perspective.*Physiol. Mol. Plant Pathol*. **51**,347–366.

Bush S.M., 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.

Calderini O., Bögre L., Vicente O., Binarova P., Heberle-Bors E., Wilson C. (1998) A cell cycle regulated MAP kinase with a possible role in cytokinesis in tobacco cells. *J. Cell Sci.* **111**, 3091-3100.

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

Colcombet J., Hirt H. (2008) Arabidopsis MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochem J.* **413**, 217-226.

Dhonukshe P., Laxalt A.M., Goedhart J., Gadella T.W., Munnik T. (2003) Phospholipase D activation correlates with microtubule reorganization in living plant cells. *Plant Cell.* **15**, 2666–2679.

Dickinson R.J., Keyse S.M. (2006) Diverse physiological functions for dual-specificity MAP kinase phosphatases. *J Cell Sci.* **119**, 4607–4615.

Droillard M., Boudsocq M., Barbier-Brygoo H., Laurière C. (2002) Different protein kinase families are activated by osmotic stresses in *Arabidopsis thaliana* cell suspensions. Involvement of the MAP kinases AtMPK3 and AtMPK6. *FEBS Lett.* **527**, 43-50.

Droillard M.J., Boudsocq M., Barbier-Brygoo H., Lauriere C.(2004) Involvement of MPK4 in osmotic stress response pathways in cell suspensions and plantlets of *A. thaliana*: activation by hypoosmolarity and negative role in hyperosmolarity tolerance. *FEBS Lett.* **574**, 42-48.

Duckett C.M., Lloyd C.W. (1994) Gibberellic acid-induced microtubule orientation in dwarf peas is accompanied by rapid modification of an α -tubulinisotype. *Plant J.* **5**, 363-372.

Fischer K., Schopfer P. (1998) Physical strain-mediated microtubule reorientation in the epidermis of gravitropically stimulated maize coleoptiles. *Plant J.* **15**, 119-123.

Foyer C.H., Halliwell B. (1976) The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta.* **133**, 21-25.

Foyer C. H., Descourvières P., Kunert K. J.(1994) Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. *Plant, Cell & Environ.* **17**, 507-523.

Gerthoffer W.T. (2008) Migration of airway smooth muscle cells. *Proc. Am. Thorac Soc.* **5**, 97-105.

Gill S.S., Tuteja N. (2010) Reactive oxygen species and anti-oxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* **48**, 909-930.

Goddard R.H., Wick S.M., Silflow C.D., Snustad D.P. (1994) Microtubule Components of the Plant Cell Cytoskeleton. *Plant Physiol.* **104**, 1-6.

Gupta R., Huang Y., Kieber J., Luan S. (1998) Identification of a dual-specificity protein phosphatase that inactivates a MAP kinase from Arabidopsis. *Plant J.* **16**, 581–589.

Gustin M. C., Albertyn J., Alexander M., Davenport K. (1998) MAP kinase pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 1264 –1300.

Hai C.M., Gu Z. (2006) Caldesmon phosphorylation in actin cytoskeletal remodeling. *Eur. J. Cell Biol.* **85**, 305-309.

Hamada T. (2007) Microtubule-associated proteins in higher plants. *J. Plant Res.* **120**, 79-98.

Hammond J.W., Cai D., Verhey K.J.(2008) Tubulin modifications and their cellular functions. *Curr. Opin. Cell Biol.* **20**, 71-76.

Hannah M.A., Heyer A.G., Hinch D.K. (2005) A global survey of gene regulation during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet.* **1**, e26.

Heimovaara-Dijkstra S., Testerink C., Wang M.(2000) Mitogen-activated protein kinase and abscisic acid signal transduction. *Results Probl. Cell DiVer.* **27**,131–144.

Higaki T., Sano T., Hasezawa S. (2007) Actin microfilament dynamics and actin side-binding proteins in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **10**, 549-556.

Hirayama T., Imajuku Y., Anai T., Matsui M., Oka A. (1991) Identification of two cell-cycle-controlling cdc2 gene homologs in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*. **105**, 159-165.

Howe C.L., Valletta J.S., Rusnak A.S., Mobley W.C. (2001) NGF signaling from clathrin-coated vesicles: evidence that signaling endosomes serve as a platform for the Ras-MAPK pathway. *Neuron*. **32**, 801-814.

Hussey P.J., Hawkins T.J., Igarashi H., Kaloriti D., Smertenko A. (2002) The plant cytoskeleton: recent advances in the study of the plant microtubule-associated proteins MAP-65, MAP-190 and the *Xenopus* MAP215-like protein, MOR1. *Plant Mol. Biol.* **50**, 915–924.

Chamnongpol S., Willekens H., Moeder W., Langebartels C., Sandermann H., Montagu M. V., Inze D., Camp W. V. (1998) Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by H₂O₂ in transgenic tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**, 5818 –5823.

Chang L., Karin M. (2001) Mammalian MAP kinase signaling cascades. *Nature*. **410**, 37-40.

Chu, Z., Chen, H., Zhang, Y., Zhang, Z., Zheng, N., Yin, B., Yan, H., Zhu, L., Zhao, X., Yuan, M., Zhang, X., and Xie, Q. (2007). Knockout of the AtCESA2 gene affects microtubule orientation and causes abnormal cell expansion in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **143**, 213–224.

Ichimura K., Mizoguchi T., Yoshida R., Yuasa T., Shinozaki K. (2000) Various abiotic stresses rapidly activate *Arabidopsis* MAP kinases ATMPK4 and ATMPK6. *Plant J.* **24**, 655-665.

Ichimura K., Shinozaki K., Tena G., Sheen J., Henry Y., Champion A., Kreis M., Zhang S., Hirt H., Wilson C., Heberle-Bors E., Ellis B.E., Morris P.C., Innes R.W., Ecker J.R., Scheel D., Klessig D.F., Machida Y., Mundy J., Ohashi Y., Walker J.C. (2002) Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends Plant Sci.* **7**, 301-308.

Ichimura K., Casais C., Peck S.C., Shinozaki K., Shirasu K. (2006) MEKK1 is required for MPK4 activation and regulates tissue-specific and temperature-dependent cell death in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* **281**, 36969–36976.

Ishikawa M., Soyano T., Nishihama R., Machida Y. (2002) NPK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase contains a functional nuclear localization signal at the binding site for the NACK1 kinesin-like protein. *Plant J.* **32**, 789-798.

Jabs T., Dietrich R. A., Dangl J. L. (1996) Initiation of runaway cell death in an *Arabidopsis* mutant by extracellular sepeeroxide. *Science.* **273**,1853–1856.

Jonak C., Ökresz L., Bögre L., Hirt H. (2002) Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling. *Curr. Opin. Plant Biol* **5**, 415–424.

Jouannic S., Hamal A., Leprince A.S., Tregaer J.W., Kreis M., Henry Y. (1999) Plant MAP kinase kinase kinases structure, classification and evolution. *Gene.* **233**, 1-112.

Jovanovič A.M., Durst S., Nick P. (2010) Plant cell division is specifically affected by nitrotyrosine. *J. Exp. Bot.* **61**,901–909.

Karpinski S., Reynolds H., Karpinska B., Wingsle G., Creissen G., Mullineaux, P. (1999) systematic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. *Science.* **284**, 654 – 657.

Kasahara K., Nakayama Y., Nakazato Y., Ikeda K., Kuga T., Yamaguchi N. (2007) Src signaling regulates completion of abscission in cytokinesis through ERK/MAPK activation at the midbody. *J. Biol. Chem.* **282**, 5327-5339.

Keyse S.M. (2008) The regulation of stress-activated MAP kinase signalling by protein phosphatases. *Topics Cur. Genet.* **20**, 33–49.

Knight M.R., Campbell A.K., Smith S.M., Trewavas A.J. (1991) Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium. *Nature.* **352**, 524–526.

Knight H., Trewavas A.J., Knight M.R.(1997) Calcium signalling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. *Plant J.* **12**,1067-1078.

Kosetsu K., Matsunaga S., Nakagami H., Colcomber J., Sasabe M., Soyano T., Takahashi Y., Hirt H., Machida Y. (2010) The MAP kinase MPK4 is required for cytokinesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*. **22**, 3778-3790.

Krysan P.J., Jester P.J., Gottwald J.R., Sussman M.R. (2002) An *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinase kinase gene family encodes essential positive regulators of cytokinesis. *Plant Cell*. **14**, 1109-1120.

Kurepa J., Smalle J., Van Montagu M., Inzé D. (1998) Oxidative stress tolerance and longevity in *Arabidopsis*: the late-flowering mutant *gigantea* is tolerant to paraquat. *Plant J*. **14**, 759-764.

Kyriakis J. M., Avruch J. (1996) Sounding the alarm: protein kinase cascades activated by stress and inflammation. *J. Biol. Chem*. **271**, 24313–24316.

Lee J.S., Ellis B.E. (2007) *Arabidopsis* MAPK phosphatase 2 (MKP2) positively regulates oxidative stress tolerance and inactivates the MPK3 and MPK6 MAPKs. *J. Biol. Chem*. **282**, 25020-25029.

Leung J., Bouvier-Durand M., Morris P.C., Guerrier D., Cheddor F., Giraudat J. (1994) *Arabidopsis* ABA response gene ABI1: features of a calcium-modulated protein phosphatase. *Science*. **264**, 1448–1452.

Limmongkon A., Giuliani C., Valenta R., Mittermann I., Heberle-Bors E., Wilson C. (2004) MAP kinase phosphorylation of plant profilin. *Biochem Biophys Res Commun*. **324**, 382-386.

Luan S. (2003) Protein phosphatases in plants. *Annu. Rev. Plant Biol*. **54**, 63-92.

Lukowitz W., Mayer U., Jürgens G. (1996) Cytokinesis in the *Arabidopsis* embryo involves the syntaxin-related KNOLLE gene product. *Cell*. **84**, 61-71.

Lumbreras V., Vilela B., Irar S., Sole M., Capellades M., Valls M., Coca M., Pages M. (2010) MAPK phosphatase MKP2 mediates disease responses in *Arabidopsis* and functionally interacts with MPK3 and MPK6. *Plant J*. **63**, 1017-1030.

Marshall C.J. (1995) Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell*. **80**, 179–185.

McClinton R.S., Sung Z.R. (1997) Organization of cortical microtubules at the plasma membrane in *Arabidopsis*. *Planta*. **201**, 252–260.

Meskiene I, Bögre L., Glaser W., Balog J., Brandstötter M., Zwerger K., Ammerer G., Hirt H. (1998) MP2C, a plant protein phosphatase 2C, functions as a negative regulator of mitogen-activated protein kinase pathways in yeast and plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**, 1938–1943.

Mészáros T., Helfer A., Hatzimasoura E., Magyar Z., Serazetdinova L., Rios G., Bardóczy V., Teige M., Koncz C., Peck S., Bögre L. (2006) The *Arabidopsis* MAP kinase kinase MKK1 participates in defence responses to the bacterial elicitor flagellin. *Plant J*. **48**, 485–498.

Meyer K., Leube M.P., Grill E. (1994) A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Science*. **264**, 1452–1455.

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**, 230–237.

Mishra N.S., Tuteja R., Tuteja N. (2006) Signaling through MAP kinase networks in plants. *Arch Biochem Biophys*. **452**, 55–68.

Mittler R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci*. **7**, 405–410.

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 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. USA*. **93**, 765–769.

Mizoguchi T, Ichimura K, Yoshida R, Shinozaki K. MAP kinase cascades in *Arabidopsis*: their roles in stress and hormone responses, in: Hirt H, (Ed.), Results and

Problems in Cell Differentiation: MAP Kinases in Plant Signal Transduction, Heidelberg, Springer 2000; 29-38.

Morrison D.K., Davis R.J. (2003) Regulation of map kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annu Cell Dev Biol.* **19**, 91-118.

Müller J., Menzel D., Šamaj J. (2007) Cell-type-specific disruption and recovery of the cytoskeleton in *Arabidopsis thaliana* epidermal root cells upon heat shock stress. *Protoplasma.* **230**, 231-242.

Müller J., Isermann B., Dücker C., Salehi M., Meyer M., Friedrich M., Madhusudhan T, Oldenburg J., Mayer G., Pötzsch B. (2009) An exosite-specific ssDNA aptamer inhibits the anticoagulant functions of activated protein C and enhances inhibition by protein C inhibitor. *Chem. Biol.* **16**, 442-451.

Müller J., Beck M., Mettbach U., Komis G., Hause G., Menzel D., Šamaj J. (2010) *Arabidopsis* MPK6 is involved in cell division plane control during early root development, and localizes to the pre-prophase band, phragmoplast, trans-Golgi network and plasma membrane. *Plant J.* **61**, 234-248.

Nakagami H., Kiegerl S., Hirt H. (2004) OMTK1, a novel MAPKKK, channels oxidative stress signaling through direct MAPK interaction. *J. Biol. Chem.* **279**, 26959-26966.

Nakagami H., Soukupova H., Schikora A., Zarsky V., Hirt H. (2006) A mitogen-activated protein kinase kinase kinase mediates reactive oxygen species homeostasis in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* **281**, 38697–38704.

Naoi K., Hashimoto T. (2004) A semidominant mutation in an *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase phosphatase-like gene compromises cortical microtubule organization. *Plant Cell.* **16**, 1841-1853.

Nick P. (1999) Signals, motors, morphogenesis- the cytoskeleton in plant development. *Plant Biol.* **1**, 169-179.

Nishihama R., Banno H., Kawahara E., Irie K., Machida Y. (1997) Possible involvement of differential splicing in regulation of the activity of *Arabidopsis* ANP1 that is related to mitogen-activated protein kinase kinase kinases (MAPKKKs). *Plant J.* **12**, 39–48.

Nishihama R., Machida Y. (2000) The MAP kinase cascade that includes MAPKKK-related protein kinase NPK1 controls a mitotic process in plant cells. *Results Probl. Cell Differ.* **27**, 119–130.

Nishihama R., Ishikawa M., Araki S., Soyano T., Asada T., Machida Y. (2001) The NPK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase is a regulator of cell-plate formation in plant cytokinesis. *Genes Dev.* **15**, 352-363.

Nishihama R., Soyano T., Ishikawa M., Araki S., Tanaka H., Asada T., Irie K., Ito M., Terada M., Banno H., Yamazaki Y., Machida Y. (2002) Expansion of the cell plate in plant cytokinesis requires a kinesin-like protein/MAPKKK complex. *Cell.* **109**, 87-99.

Noctor G., Foyer C. H. (1998) Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**, 249 –279.

Orozco-Cardenas M., Ryan C. A. (1999) Hydrogen peroxide is generated systematically in plant leaves by wounding and systemin via actadecanoid pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**, 6553– 6557.

Orvar B.L., Sangwan V., Omann F., Dhindsa R.S. (2000) Early steps in cold sensing by plant cells: The role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *Plant J.* **23**, 785–794.

Owens D.M., Keyse S.M. (2007) Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene.* **26**, 3203–3213.

Paredes, A.R., Persson, S., Ehrhardt, D.W., and Somerville, C.R. (2008). Genetic evidence that cellulose synthase activity influences microtubule cortical array organization. *Plant Physiol.* **147**, 1723–1734.

Panteris E. (2008) Cortical actin filaments at the division site of mitotic plant cells: a reconsideration of the 'actin-depleted zone'. *New Phytol.* **179**, 334-341.

Pitzschke A., Hirt H. (2010) Disentangling the complexity of mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species signaling. *Plant Physiol.* **149**, 606–615.

Proceddu A., De Veylder L., Hayles J., Van Montagu M., Inzé D., Mironov V. (1999) Mutational analysis of two *Arabidopsis thaliana* cyclin-dependent kinases in fission yeast. *FEBS Lett.* **446**, 182-188.

Pullikuth A.K., Catling A.D. (2007) Scaffold mediated regulation of MAPK signaling and cytoskeletal dynamics: a perspective. *Cell Signal.* **19**, 1621-1632.

Quan L.J., Zhang B., Shi W.W., Li H.Y. (2008) Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. *J. Integrat. Plant Biol.* **50**, 2-18.

Ryals J. A., Neuenschwander U. H., Willits M. G., Molina A., Steiner H.Y., Hunt M. D. (1996) Systemic acquired resistance. *Plant Cell.* **8**, 1809 –1819.

Sangwan V., Foulds I., Singh J., Dhindsa R.S. (2001) Cold-Activation of *Brassica napus* BN115 promoter is mediated by structural changes in membranes and cytoskeleton, and requires Ca²⁺influx. *Plant J.* **27**, 1–12.

Sasabe M., Soyano T., Takahashi Y., Sonobe S., Igarashi H., Itoh T.J., Hidaka M., Machida Y. (2006) Phosphorylation of NtMAP65-1 by a MAP kinase down-regulates its activity of microtubule bundling and stimulates progression of cytokinesis in tobacco cells. *Genes Dev.* **20**, 1004-1014.

Scandalios J.G. (1993) Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiol.* **101**, 7-12.

Sharipo P.S., Vaisberg E., Hunt A.J., Tolwinski N.S., Whalen A.M., McIntosh J.R., Ahn N.G. (1998) Activation of the MKK/ERK pathway during somatic cell mitosis: direct interactions of active ERK with kinetochores and regulation of the mitotic 3F3/2 phosphoantigen. *J. Cell Biol.* **142**, 1533-1545.

Sharma Y. K., Leon J., Raskin I., Davis K. R. (1996) Ozone-induced responses in *Arabidopsis thaliana*: the role of salicylic acid in the accumulation of defense-related transcripts and induced resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**, 5099 –5104.

Shaw S. L., Kamyar R., Ehrhardt D. W. (2003) Sustained microtubule treadmilling in *Arabidopsis* cortical arrays. *Science.* **300**, 1715-1718.

Schweizer P., Buchala A., Dudler R., Metraux J.-P. (1998) Induced systemic resistance in wounded rice plants. *Plant J.* **14**, 475– 481.

Sieberer B.J., Kieft H., Franssen-Verheijen T., Emons A.M.C., Vos, J.W. (2009). Cell proliferation, cell shape, and microtubule and cellulose microfibril organization of tobacco BY-2 cells are not altered by exposure to near weightlessness in space. *Planta.* **230**, 1129-1140.

Skoufias D.A., Wilson L. (1998) Assembly and colchicine binding characteristics of tubulin with maximally tyrosinated and detyrosinated alpha-tubulins. *Arch. Biochem. Biophys.* **351**, 115-122.

Smertenko A., Dráber P., Viklický V., Opatrný Z. (1997) Heat stress affects the organization of microtubules and cell division in *Nicotiana tabacum* cells. *Plant, Cell and Environment.* **20**, 1534-1542.

Smertenko A.P., Chang H.Y., Sonobe S., Fenyk S.I., Weingartner M., Bögre L., Hussey P.J. (2006) Control of the AtMAP65-1 interaction with microtubules through the cell cycle. *J. Cell Sci.* **119**, 3227-3237.

Smertenko A.P., Kaloriti D., Chang H.Y., Fiserova J., Opatrný Z., Hussey P.J. (2008) The C-terminal variable region specifies the dynamic properties of Arabidopsis microtubule-associated protein MAP65 isoforms. *Plant Cell.* **20**, 3346–3358.

Soyano T., Nishihama R., Morikiyo K., Ishikawa M., Machida Y. (2003) NQK1/NtMEK1 is a MAPKK that acts in the NPK1 MAPKKK-mediated MAPK cascade and is required for plant cytokinesis. *Genes Dev.* **17**, 1055-1067.

Strompen G., El Kasmi F., Richter S., Lukowitz W, Assaad F.F., Jürgens G., Mayer U. (2002) The *Arabidopsis* HINKEL gene encodes a kinesin-related protein involved in cytokinesis and is expressed in a cell cycle-dependent manner. *Curr. Biol.* **12**, 153-158.

Suarez-Rodriguez M.C., Adams-Phillips L., Liu Y., Wang H., Su S.H., Jester P.J., Zhang S., Bent A.F., Krysan P.J. (2007) MEKK1 is required for flg22-induced MPK4 activation in Arabidopsis plants. *Plant Physiol.* **143**, 661–669.

Suarez-Rodriguez M.C., Petersen M., Mundy J. (2010) Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **61**, 621-649.

Sugimoto K., Himmelspach R., Williamson R.E., Wasteneys G.O. (2003) Mutation or drug-dependent microtubule disruption causes radial swelling without altering parallel cellulose microfibril deposition in *Arabidopsis* root cells. *Plant Cell.* **15**, 1414–1429.

Sun AQ, Yüksel KU, Gracy RW.(1993) Limited proteolysis of triose-phosphate isomerase and characterization of the catalytically active peptide complex. *J. Biol Chem.* **268**, 26872-26878.

Šamaj J., Ovečka M., Hlavacka A., Lecourieux F., Meskiene I., Lichtscheidl .I, Lenart P., Salaj J., Volkmann D., Bögre L., Baluška F., Hirt H. (2002) Involvement of the mitogen-activated protein kinase SIMK in regulation of root hair tip growth. *EMBO J.* **21**, 3296-3306.

Šamaj J., Baluška F., Voigt B., Schlicht M., Volkmann D., Menzel D. (2004a) Endocytosis, actin cytoskeleton, and signaling. *Plant Physiol.* **135**,1150-1161.

Šamaj J., Baluška F., Hirt H. (2004b) From signal to cell polarity: mitogen-activated protein kinases as sensors and effectors of cytoskeleton dynamicity. *J. Exp. Bot.* **55**, 189-98.

Šamaj J., Müller J., Beck M., Bohm N., Menzel D. (2006) Vesicular trafficking, cytoskeleton and signalling in root hairs and pollen tubes. *Trends Plant Sci.* **11**, 594–600.

Šamajová O., Plíhal O., Al-Yousif M., Hirt H., Šamaj J. (2013a) Improvement of stress tolerance in plants by genetic manipulation of mitogen-activated protein kinases. *Biotechnol. Adv.* **31**, 118-128.

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

Takahashi Y., Soyano T., Kosetsu K., Sasabe M., Machida Y. (2010) HINKEL kinesin, ANP MAPKKs and MKK6/ANQ MAPKK, pathway that is required for cytokinesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **51**, 1766-1776.

Takekawa M., Tatebayashi K., Saito H. (2005) Conserved docking site is essential for activation of mammalian MAP kinase kinases by specific MAP kinase kinase kinases. *Mol. Cell.* **18**, 295–306.

Tanaka H., Ishikawa M., Kitamura S., Takahashi Y., Soyano T., Machida C., Machida Y. (2004) The *AtNACK1/HINKEL* and *STUD/TETRASPORE/AtNACK2* genes, which encode functionally redundant kinesins, are essential for cytokinesis in *Arabidopsis*. *Genes Cells.* **9**, 1199-1211.

Taub N., Teis D., Ebner H.L., Hess M.W., Huber L.A. (2007) Late endosomal traffic of the epidermal growth factor receptor ensures spatial and temporal fidelity of mitogen-activated protein kinase signaling. *Mol. Biol. Cell.* **18**, 4698-4710.

Teige M., Scheikl E., Eulgem T., Doczi 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.

Teis D., Wunderlich W., Huber L.A. (2002) Localization of the MP1-MAPK scaffold complex to endosomes is mediated by p14 and required for signal transduction. *Dev. Cell.* **3**, 803-814.

Teis D., Taub N., Kurzbauer R., Hilber D., de Araujo M.E., Erlacher M., Offterdinger M., Villunger A., Geley S., Bohn G., Klein C., Hess M.W., Huber L.A. (2006) p14-MP1-MEK1 signaling regulates endosomal traffic and cellular proliferation during tissue homeostasis. *J. Cell Biol.* **175**, 861-868.

Theodosiou A., Ashworth A. (2002) MAP kinase phosphatases. *Genome Biol.* **3**, REVIEWS3009.1-3009.10.

Thomashow M.F. (1999) Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**, 571–599.

Ulm R., Ichimura K., Mizoguchi T., Peck S.C., Zhu T., Wang X., Shinozaki K., Paszkowski J. (2002) Distinct regulation of salinity and genotoxic stress responses by *Arabidopsis* MAP kinase phosphatase 1. *EMBO J.* **21**, 6483-6493.

Van Damme D., Bouget F.Y., Van Poucke K., Inzé D., Geelen D. (2004) Molecular dissection of plant cytokinesis and phragmoplast structure: a survey of GFP-tagged proteins. *Plant J.* **40**, 386–398.

Wang H., Li J., Bostock R. M., Gilchrist D. G. (1996) Apoptosis: a functional paradigm for programmed plant cell death induced by a host-selective phytotoxin and invoked during development. *Plant Cell.* **8**, 375–391.

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 C., Li J., Yuan M. (2007) Salt tolerance requires cortical microtubule reorganization in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* **48**, 1534–1547.

Wang C., Zhang L., Yuan M., Ge Y., Liu Y., Fan J., Ruan Y., Cui Z., Tong S., Zhang S. (2010) The microfilament cytoskeleton plays a vital role in salt and osmotic stress tolerance in Arabidopsis. *Plant Biol.* **12**, 70–78.

Wasteneys G.O., Fujita M. (2006) Establishing and maintaining axial growth: wall mechanical properties and the cytoskeleton. *J. Plant Res.* **119**, 5–10.

Wasteneys G.O., Ambrose J.C. (2009) Spatial organization of plant cortical microtubules: close encounters of the 2D kind. *Trends Cell Biol.* **19**, 62–71.

Whitmarsh A.J., Davis R.J. (1998) Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 481–485.

Whittington A.T., Vugrek O., Wei K.J., Hasenbein N.G., Sugimoto K., Rashbrooke M.C., Wasteneys G.O. (2001) MOR1 is essential for organizing cortical microtubules in plants. *Nature.* **411**, 610–613.

Wiesler B., Wang W., Nick P. (2002) The stability of cortical microtubules depends on their orientation. *Plant J.* **32**, 1023–1032.

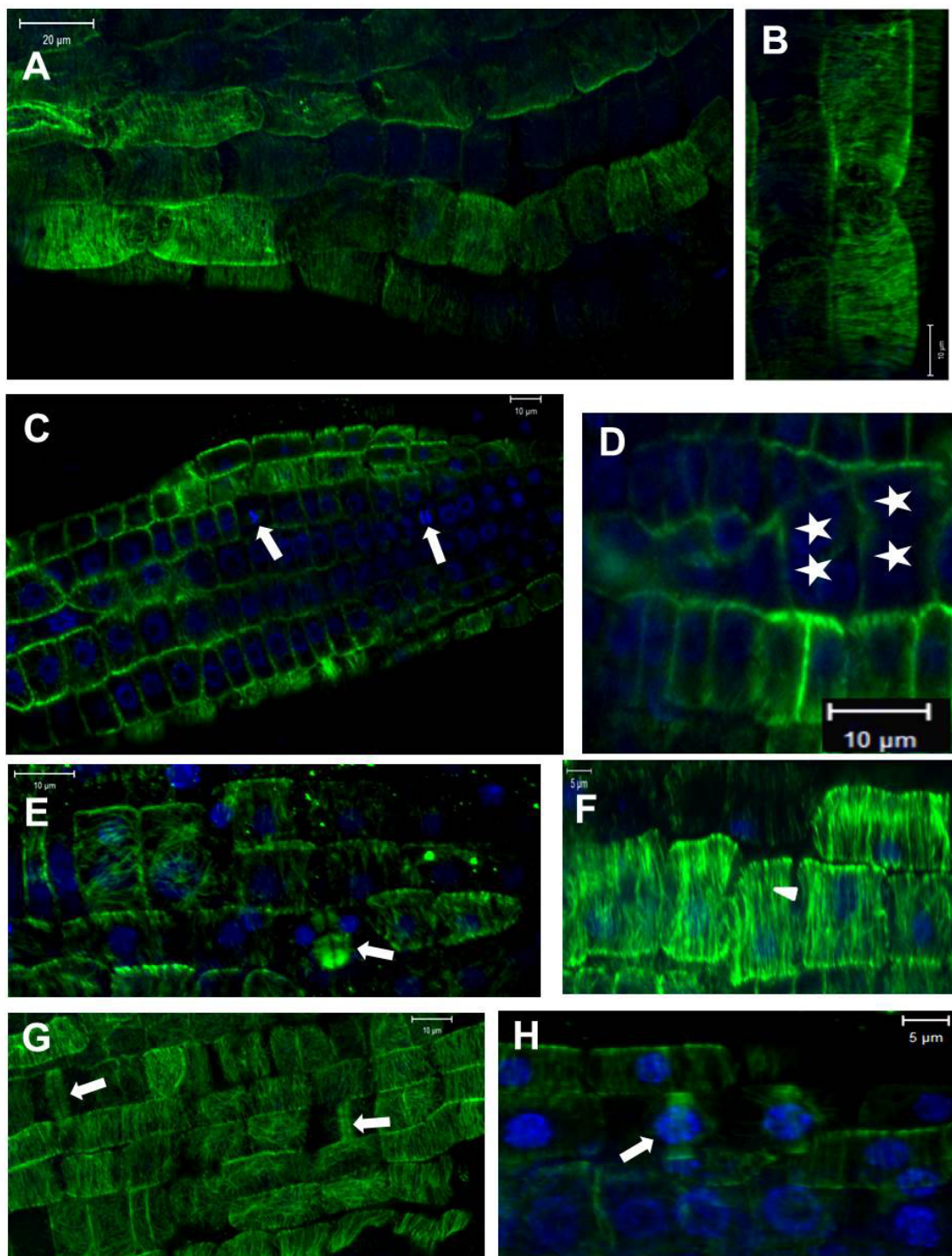
Xin Z., Browse J. (2000) Cold comfort farm: The acclimation of plants to freezing temperatures. *Plant Cell Environ.* **23**, 893–902.

13. Zoznam použitých skratiek

ABA	abscisová kyselina
ABI1	ABAinsenzitívny1
ABP	proteín viažúci aktín
AF	aktínové vlákna
ANP1	<i>Arabidopsis</i> NPK1 homológ
AtMKP1	<i>Arabidopsis thaliana</i> MAP kináza fosfatáza
BSA	hovädzí sérový albumín
CAT	kataláza
CDK	kináza závislá na cyklínoch
Col-0	Columbia-0
COR	odpovedajúci na chlad
CTR1	konštitutívna trojitá odpoveď1
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMSO	dimetylsulfoxid
DSP	dvojito špecifická fosfatáza
DsPTP1	dvojito špecifická proteín tyrozín fosfatáza
EDR1	zlepšená rezistencia voči chorobám1
EDTA	chelatační činidlo, ethylendiamintetraoctová kyselina
GA	glutaraldehyd
GST	glutation S-transferáza
HR	hypersenzitívna odpoveď
JA	jasmónová kyselina
KLP	proteín ako kinezín
LB agar	Luria-Bertani agar
MAP	proteíny asociované s mikrotubulmi
MAPK	mitogén aktivované proteín kinázy
MF	mikrovlákna
MS-Médium	Murashige and Skoog Médium
MT	mikrotubuly
MTSB	mikrotubuly stabilizačný pufor
NACK1	NPK1-aktivujúci kinezín 1
NBT	Nitroblue Tetrazolium
NPK1	<i>Nicotiana</i> proteín kináza
PA	kyselina fosfatidová

PAMP	„Pathogen-associated-molecular-pattern“
PBS	fosfátom tlmený soľný roztok
PFA	paraformaldehyd
PLD	fosfolipáza
PPB	preprofázny zväzok
PSTP	proteín serín-treonín fosfatázy
PTP	proteín tyrozín fosfatáza
ROS	reaktívne formy kyslíka
rpm	otáčky za minútu
SA	salicylová kyselina
SIMK	soľným stresom indukovaná MAPK
SOD	superoxid dismutáza
SOS	precitlively na soľ
TRIS	pufor, (tris-hydroxymethyl)aminomethan
Ws	Wassilewskija

14. PRÍLOHY



Obr. 1 Imunofluorescenčná lokalizácia MT (zelené) v koreňoch divokého typu Col-0 a *mpk4* a *mpk6-2* mutantov, ktoré rástli na kontrolnom médiu. Jadrá sú kontrastne farbené s DAPI na modro.

A Koreňová špička divokého typu Col-0 ukazujúca paralelné usporiadanie MT.

B Detail divokého typu Col-0 ukazujúci paralelné usporiadanie MT.

C Koreňová špička *mpk4* mutantu ukazujúca mitotické vretienka (šípky).

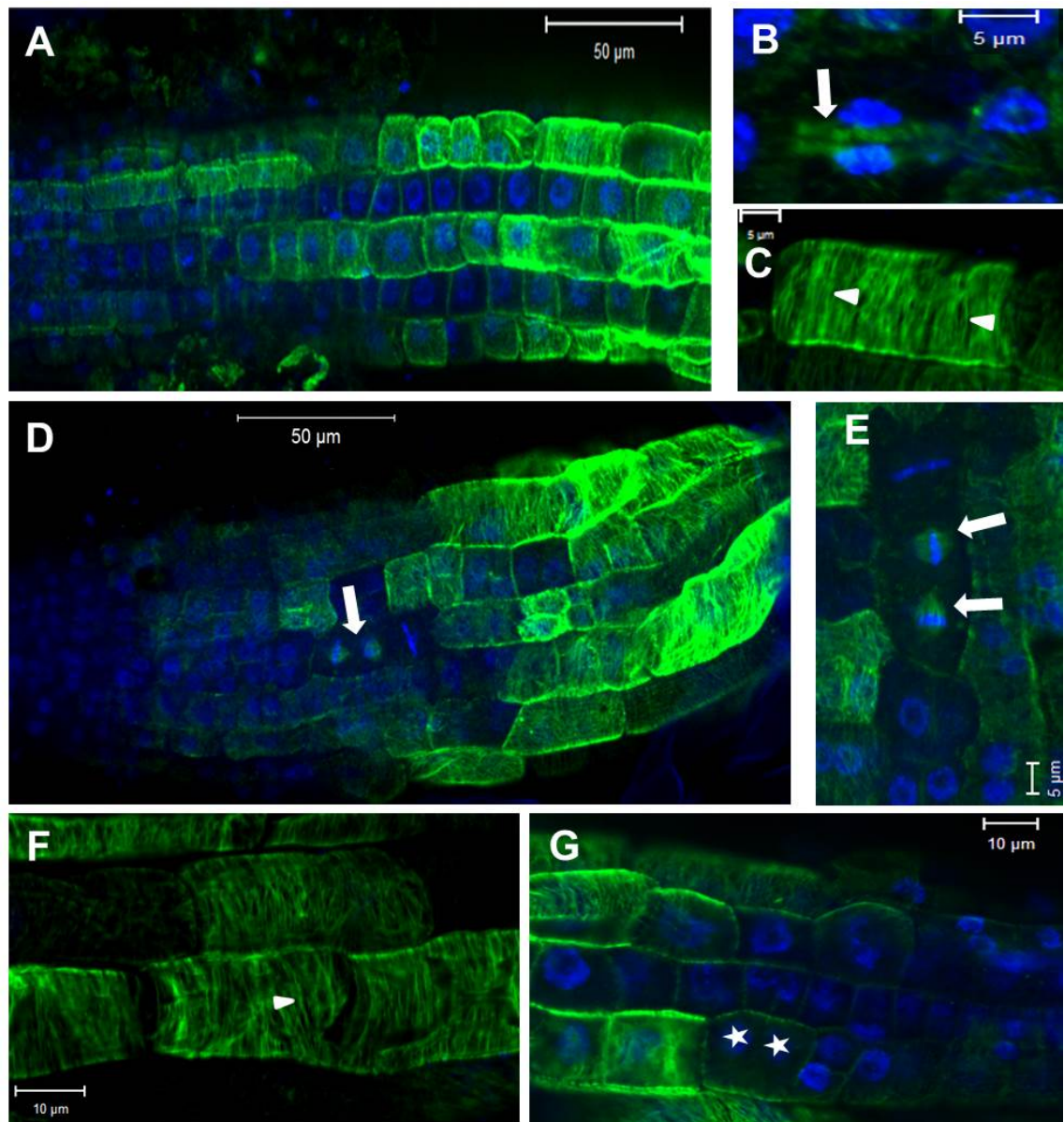
D Detail *mpk4* mutantu ukazujúci dvojjadrové bunky (hviezdy).

E Detail *mpk4* mutantu ukazujúci fragmoplast (šípka).

F Detail *mpk4* mutantu ukazujúci usporiadanie MT.

G Detail *mpk6-2* mutantu ukazujúci fragmoplasty (šípky).

H Detail *mpk6-2* mutantu ukazujúci preprofázny zväzok (šípka).



Obr. 2 Imunofluorescenčná lokalizácia MT (zelené) v koreňoch divokého typu *Ws* a *anp2anp3* mutanta, ktoré rástli na kontrolnom médiu. Jadrá sú kontrastne farbené s DAPI na modro.

A Koreňová špička divokého typu *Ws* ukazujúca paralelné usporiadanie MT.

B Detail divokého typu *Ws* ukazujúci fragmoplast (šípka).

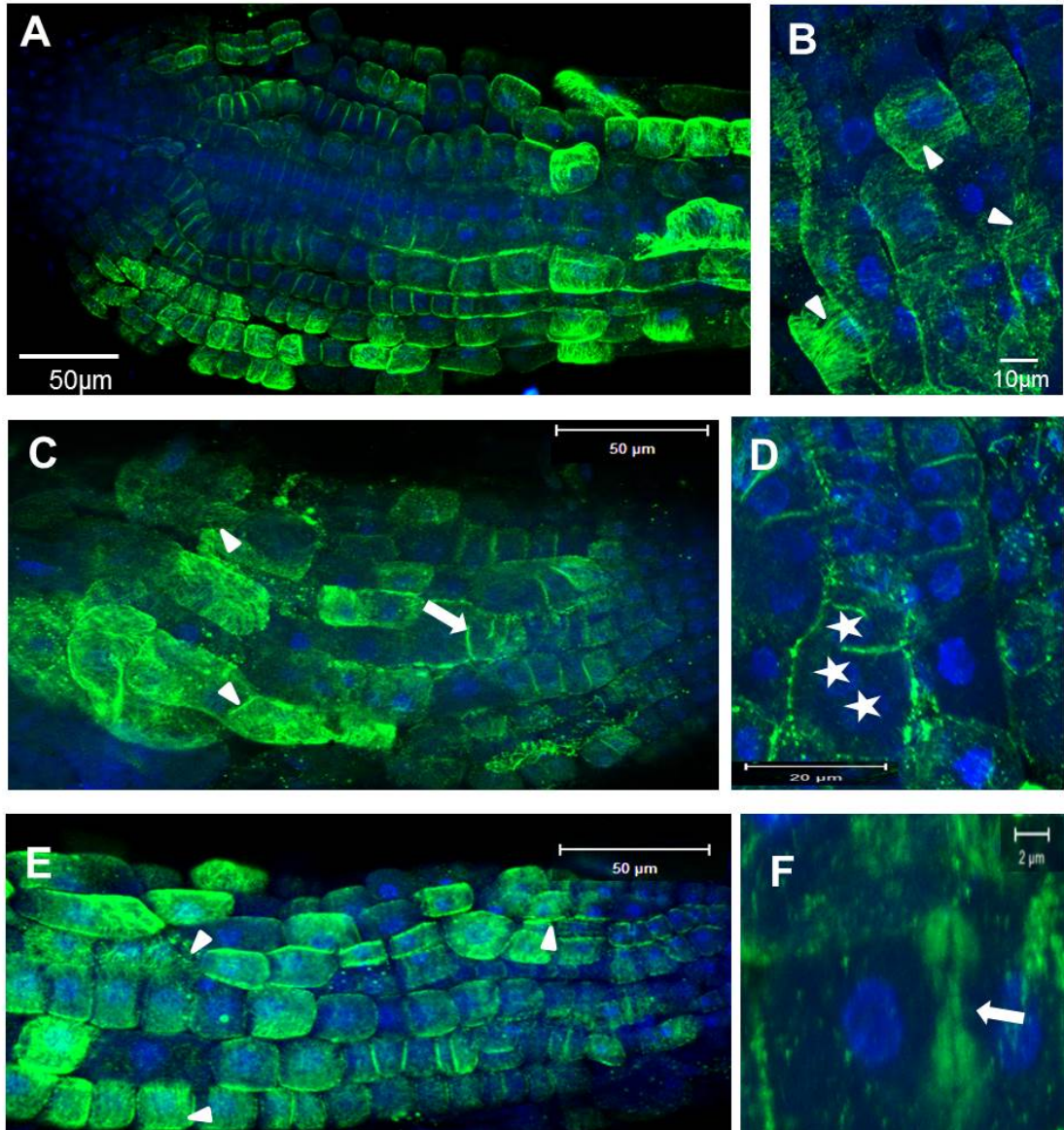
C Detail divokého typu *Ws* ukazujúci paralelné usporiadanie MT (šípky).

D Koreňová špička *anp2anp3* mutanta ukazujúca deliace vretienko (šípka)

E Detail *anp2anp3* mutanta ukazujúci deliace vretienka (šípky).

F Detail *anp2anp3* mutanta ukazujúci usporiadanie MT.

G Detail *anp2anp3* mutanta ukazujúci dvojjadrovú bunku (hviezdy).



Obr. 3 Imunofluorescenčná lokalizácia MT (zelené) v koreňoch divokého typu Col-0 a *mpk4* a *mpk6-2* mutantov po ošetroení 100mM NaCl. Jadrá sú kontrastne farbené s DAPI na modro.

A Koreňová špička divokého typu Col-0 ukazujúca zväzkovanie MT po pôsobení NaCl.

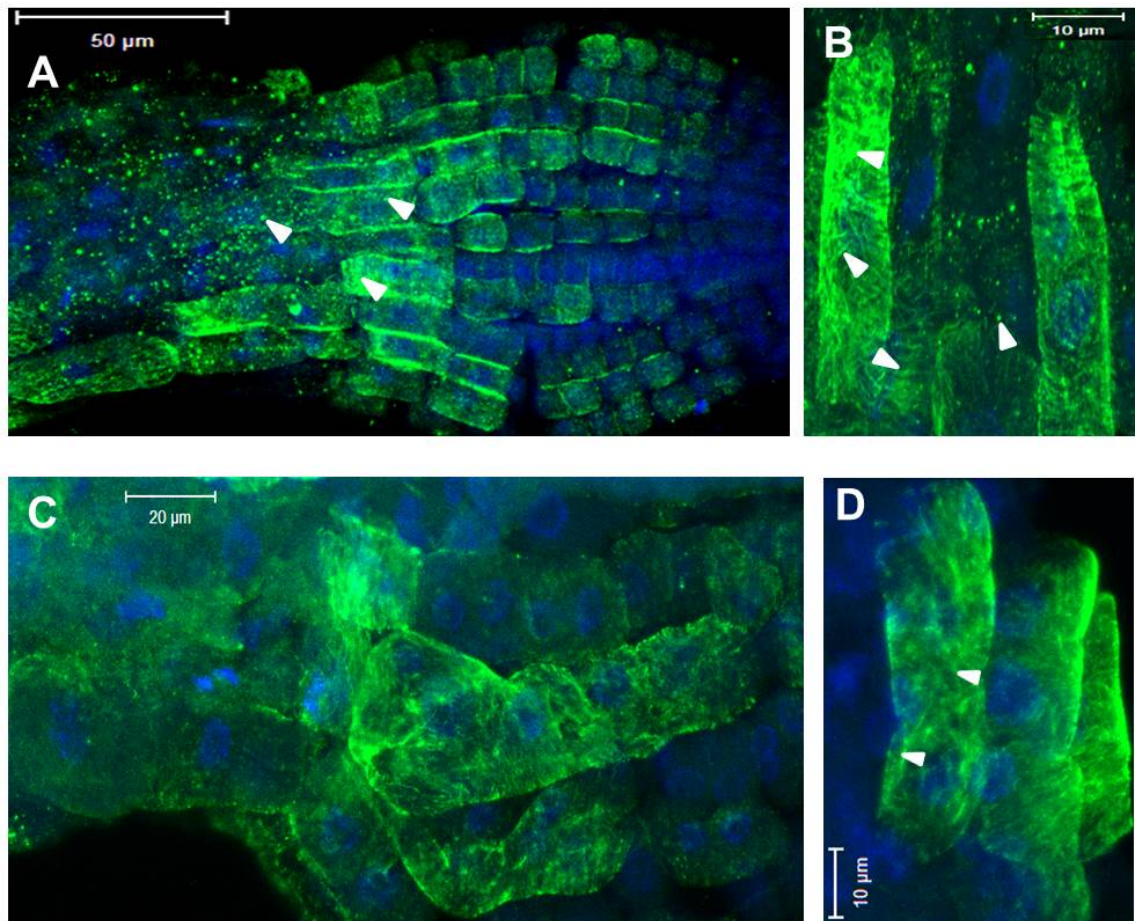
B Detail divokého typu Col-0 ukazujúci zväzkovanie MT (šípky) po pôsobení NaCl.

C Koreňová špička *mpk4* mutantu ukazujúca rozpad MT a prítomnosť nedokončenej bunkovej prepážky (šípka) po pôsobení NaCl.

D Detail *mpk4* mutantu ukazujúci viacjadrovú bunku (hviezdy).

E Koreňová špička *mpk6-2* mutantu ukazujúca zväzkovanie MT (šípky) po pôsobení NaCl.

F Detail *mpk6-2* mutantu ukazujúci fragmoplast (šípka) po pôsobení NaCl.



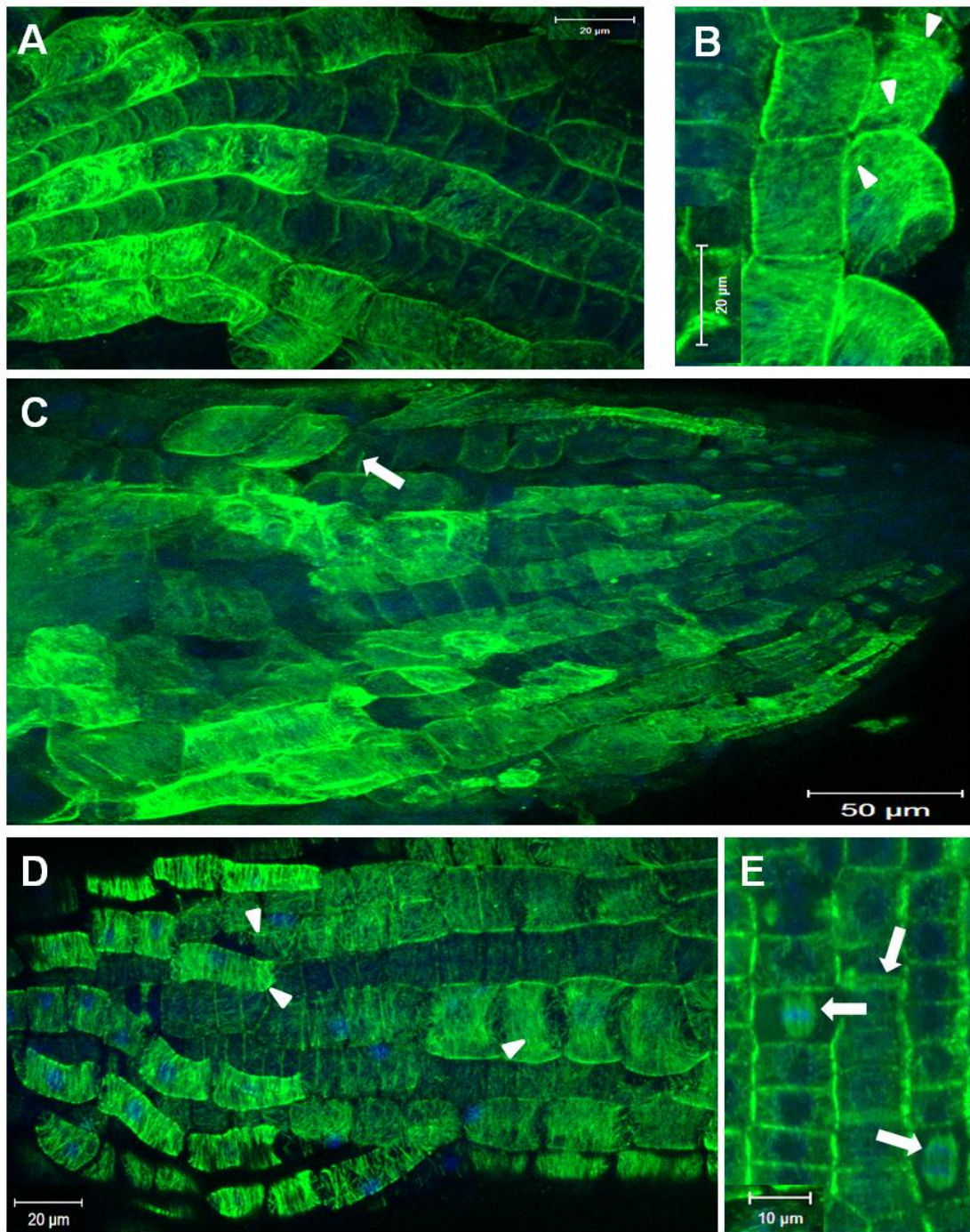
Obr. 4 Imunofluorescenčná lokalizácia MT (zelené) v koreňoch divokého typu *Ws* a *anp2anp3* mutanta po ošetrení 100mM NaCl. Jadrá sú kontrastne farbené s DAPI na modro.

A Koreňová špička divokého typu *Ws* ukazujúca zväzkovanie a rozpad MT (šípky) po pôsobení NaCl.

B Detail divokého typu *Ws* ukazujúci zväzkovanie MT (šípky) po pôsobení NaCl.

C Koreňová špička *anp2anp3* mutanta ukazujúca rozpad MT po pôsobení NaCl.

D Detail *anp2anp3* mutanta ukazujúci zväzkovanie MT po pôsobení NaCl.



Obr. 5 Imunofluorescenčná lokalizácia MT (zelené) v koreňoch divokého typu Col-0, *mpk4* a *mpk6-2* mutantov po ošetrení 3% sacharózou. Jadrá sú kontrastne farbené s DAPI na modro.

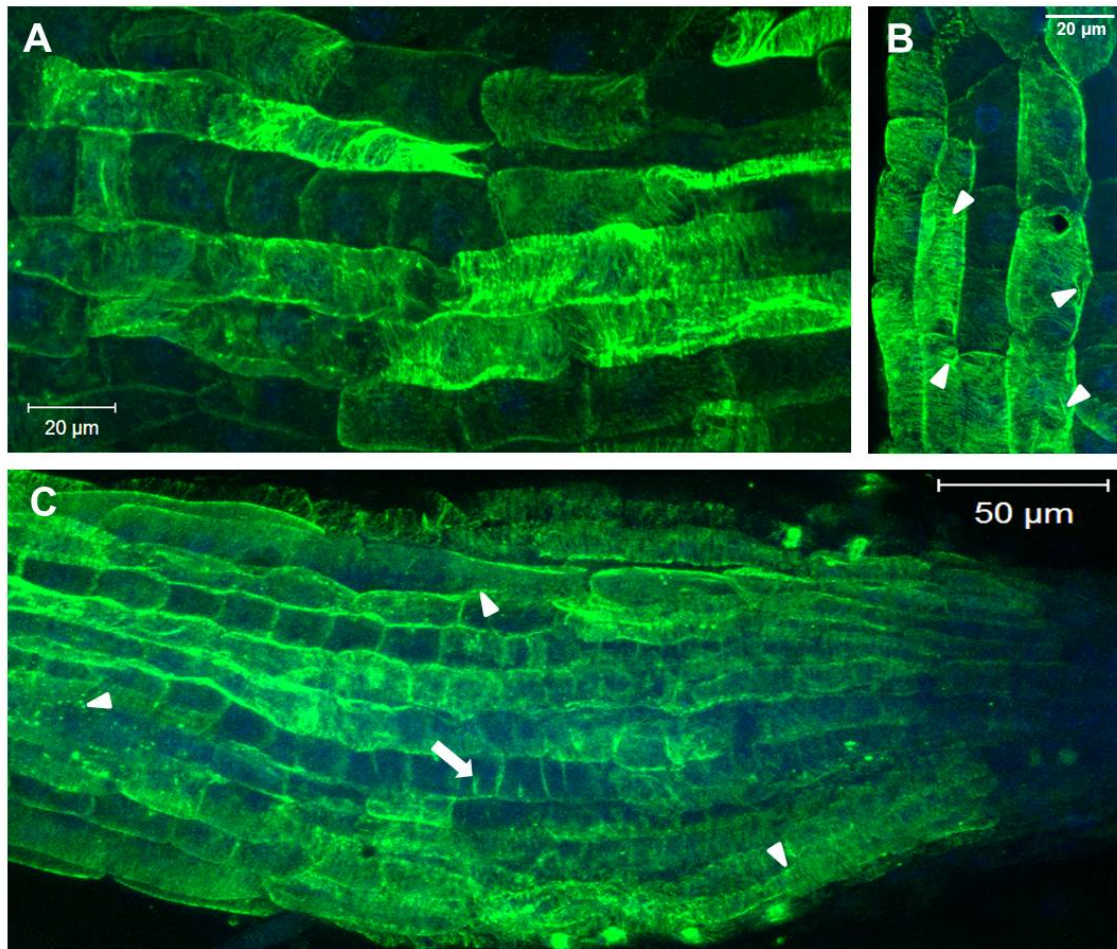
A Koreňová špička divokého typu Col-0 ukazujúca zväzkovanie MT po pôsobení sacharózy.

B Detail divokého typu Col-0 ukazujúci zväzkovanie MT (šípky) po pôsobení sacharózy.

C Koreňová špička *mpk4* mutantu ukazujúca rozpad MT a prítomnosť nedokončenej bunkovej prepážky (šípka) po pôsobení sacharózy.

D Koreňová špička *mpk6-2* mutantu ukazujúca zväzkovanie MT (šípky) po pôsobení sacharózy.

E Detail *mpk6-2* mutantu ukazujúci mitotické vretienka a fragmoplast (šípky) po pôsobení sacharózy.



Obr. 6 Imunofluorescenčná lokalizácia MT (zelené) v koreňoch divokého typu *Ws* a *anp2anp3* mutanta po ošetrení 3% sacharózou. Jadrá sú kontrastne farbené s DAPI na modro.
 A Koreňová špička divokého typu *Ws* ukazujúca zväzkovanie MT po pôsobení sacharózy.
 B Detail divokého typu *Ws* ukazujúci zväzkovanie MT (šípky) po pôsobení sacharózy.
 C Koreňová špička *anp2anp3* mutanta ukazujúca rozpad MT a prítomnosť nedokončenej bunkovej prepážky (šípka) po pôsobení sacharózy.