

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biotechnologií



**Příprava rekombinantního proteinu fosfolipasa D alfa 1
a vybraných mitogenem aktivovaných protein kinas**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Nela Brücknerová
Studijní program:	B0512A130007 Biotechnologie a genové inženýrství
Studijní obor:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Petr Dvořák, Ph.D.
Rok:	2023

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

V Olomouci dne

Ráda bych poděkovala především vedoucímu bakalářské práce Mgr. Petru Dvořákovi, Ph.D. za věnovaný čas, cenné rady, vstřícný přístup a celkovou pomoc při psaní této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Jiřímu Sojkovi za cenné rady a pomoc v laboratořích.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Nela Brücknerová
Název práce	Příprava rekombinantního proteinu fosfolipasa D alfa 1 a vybraných mitogenem aktivovaných protein kinas
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biotechnologií
Vedoucí práce	Mgr. Petr Dvořák, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2023

Abstrakt

Rostliny pro svůj přisedlý styl života musí aktivně reagovat na neustále se měnící okolní podmínky, a to za účelem přežití a jejich následné reprodukce. Za tímto účelem bylo u rostlin vyvinuto nepřeborné množství signálních kaskád. Mezi jedny z nejvíce studované a v současnosti taktéž nejlépe popsané patří mitogenem aktivované protein kinasové (MAPK) signální kaskády. Předložená práce je zaměřena na MAPK3/MAPK6 z *Arabidopsis thaliana* a jejich uplatnění při vývojových procesech rostlin nebo různých stresových faktorech se zaměřením na regulaci cílových proteinů. Práce se dále zabývá SIMK, což je MAPK u rostliny *Medicago sativa* a známý homolog pro AtMAPK6. V neposlední řadě je diskutována úloha fosfolipas se změněním na fosfolipasu D alfa 1 (PLD α 1), která byla nedávno popsána jakožto substrát pro obě MAPK3/MAPK6. Nakonec se tato práce zabývá možnostmi přípravy rekombinantních proteinů a jejich následnou purifikací.

Cílem experimentální části této bakalářské práce byla exprese rekombinantních proteinů MAPK3, MAPK6, SIMK, PLD α 1 bakteriálním expresním systémem a jejich následné přečištění pomocí afinitní purifikace. Validita připravených rekombinantních proteinů byla přezkoumána pomocí SDS-PAGE analýzy se specifickým barvením proteinů a imunoblotováním se specifickými protilátkami.

Klíčová slova	MAPK3, MAPK6, SIMK, PLD α 1, purifikace, SDS-PAGE, imunoblotování
Počet stran	59
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Nela Brücknerová
Title	Preparation of the recombinant phospholipase D alpha 1 and selected mitogen activated protein kinases
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Biotechnology
Supervisor	Mgr. Petr Dvořák, Ph.D
The year of presentation	2023

Abstract

Due to their sessile lifestyle, plants must actively react to constantly changing environmental conditions in order to survive and subsequently reproduce. For this purpose, a plethora of signaling cascades have been developed in plants. The mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling cascade is among the most studied and currently also the best described. The thesis is focused on MAPK3/MAPK6 from *Arabidopsis thaliana* and their application in plant development processes or various stress factors with a focus on the regulation of target proteins. The thesis also deals with SIMK, which is a MAPK in the *Medicago sativa* plant and a known homologue for AtMAPK6. Last but not least, the role of phospholipases is discussed with the focus on phospholipase D alpha 1 (PLD α 1), which was recently described as a substrate for both MAPK3/MAPK6. Finally, this thesis is addressing the possibilities of preparing recombinant proteins and their subsequent purification.

The aim of the experimental part of this bachelor thesis was the expression of recombinant proteins MAPK3, MAPK6, SIMK, PLD α 1 by a bacterial expression system and their subsequent purification using affinity purification. The results of the prepared recombinant proteins were validated by SDS PAGE analysis with specific protein staining and immunoblotting with specific antibodies.

Klíčová slova	MAPK3, MAPK6, SIMK, PLD α 1, purification, SDS-PAGE, immunoblotting
Number of pages	59
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1 ÚVOD.....	1
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	2
2.1 Signální MAPK kaskády.....	2
2.1.1 MPK3 a MPK6	5
2.1.2 MAPK u <i>Medicago sativa</i>	8
2.2 Fosfolipasy	9
2.2.1 Fosfolipasy D.....	11
2.3 Metody přípravy rekombinantní proteinů	13
2.3.1 Expresse rekombinantních proteinů pomocí <i>Escherichia coli</i>	14
2.3.2 Purifikace rekombinantních proteinů pomocí chromatografických technik	14
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	16
3.1 Materiál.....	16
3.1.1 Biologický materiál.....	16
3.1.2 Chemikálie	16
3.1.3 Roztoky a média.....	17
3.1.4 Přístroje	20
3.1.5 Software pro zpracování výsledků	20
3.2 Metody	20
3.2.1 Příprava LB média a LB média s agarem	20
3.2.2 Transformace bakterií <i>Escherichia coli</i> pomocí metody „Heat shock“	21
3.2.3 Inokulum <i>Escherichia coli</i>	21
3.2.4 Izolace plasmidové DNA	22
3.2.5 Restrikce plasmidové DNA	22
3.2.6 Separace plasmidové DNA gelovou elektroforézou	23
3.2.8 Kultivační a expresní podmínky	23
3.2.9 Příprava vzorku k afinitní purifikaci	24
3.2.10 Afinitní purifikace	24
3.2.11 Příprava vzorků pro analýzu pomocí SDS-PAGE elektroforézy	25
3.2.12 SDS-PAGE elektroforéza	25
3.2.13 Obarvení gelu pomocí Coomassie Brilliant Blue G-250.....	26
3.2.14 Imunoblotování se specifickými protilátkami.....	26
4 VÝSLEDKY A DISKUSE	28
4.1 Validace získaných konstruktů pomocí restrikční analýzy s následnou gelovou elektroforézou	28
4.2 Expresse rekombinantních proteinů s jejich následnou afinitní purifikací.....	29

4.3 Ověření specifity připravených rekombinantních proteinů pomocí metody imunoblotování	34
5 ZÁVĚR	41
6 LITERATURA	42
7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	50

CÍLE PRÁCE

Vypracovaná rešerše na téma úlohy mitogenem aktivovaných protein kinasových kaskád (se zaměřením na mitogenem aktivovaných protein kinas 3/6) a fosfolipas (se zaměřením na fosfolipasu D alfa 1) v buněčné signalizaci a odpovědi na (a)biotický stres. Dále popsat heterologní systémy vhodné pro přípravu rekombinantních proteinů a jejich následnou purifikaci.

Experimentální část byla zaměřena na získání praktických zkušeností v práci s bakteriemi a v základních molekulárně biologických a biochemických metodách.

Hlavním cílem práce byla exprese a purifikace rekombinantních proteinů fosfolipasa D alfa 1, mitogenem aktivovaných protein kinas 3/6 z *Arabidopsis thaliana* a mitogenem aktivované protein kinasy SIMK (salt stress-induced mitogen activated protein kinase) z *Medicago sativa L.* v bakteriálním expresním systému. Následně provést biochemickou validaci získaných proteinů na úrovni čistoty připravených rekombinantních proteinů a imunoblotovací analýzu se protein-specifickými a Tag-specifickými primárními protilátkami.

1 ÚVOD

Mitogenem aktivované protein kinasy (MAPK) kaskády jsou důležitou součástí signálních drah. Fungují jako senzory/akceptory, tak aby koordinovaly buněčnou odpověď (Widmann *et al.*, 1999). MAPK3 a MAPK6 se vyskytují u několika signálních drah, které se podílí na vývoji a růstu rostliny. MAPK3 a MAPK6 jsou také důležitou součástí reakce rostliny na různé stresy (Fujita *et al.*, 2016). Stresem indukovaná MAPK (SIMK) u vojtěšky je homolog AtMAPK6, a je indukována stresem ze salinity (Cardinale *et al.*, 2000) a elicitorem (Munnik *et al.*, 1999).

Fosfolipasy (PL) představují všudypřítomnou rodinu proteinů, které štěpí různé vazby ve fosfolipidech, aby udržely homeostázu a stabilitu membránových lipidů (Wang *et al.*, 2012). Fosfolipasy D (PLD) štěpí fosfodiesterovou vazbu ve fosfolipidu, čímž vzniká kyselina fosfatidová (Chen *et al.*, 2011). Dřívější studie ukázaly funkční interakci mezi MAPK3/6 a PLD α 1 (Vadovič *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2022)

Jeden z nejdůležitějších cílů biotechnologický oborů je právě produkce rekombinantních proteinů. Nejčastějším hostitelem pro exprese rekombinantních proteinů je *Escherichia coli* (Ferrer-Miralles *et al.*, 2015). Tato bakterie je používána kvůli rychlému růstu, snadné manipulaci a nízkým nákladům. (Hayat *et al.*, 2018).

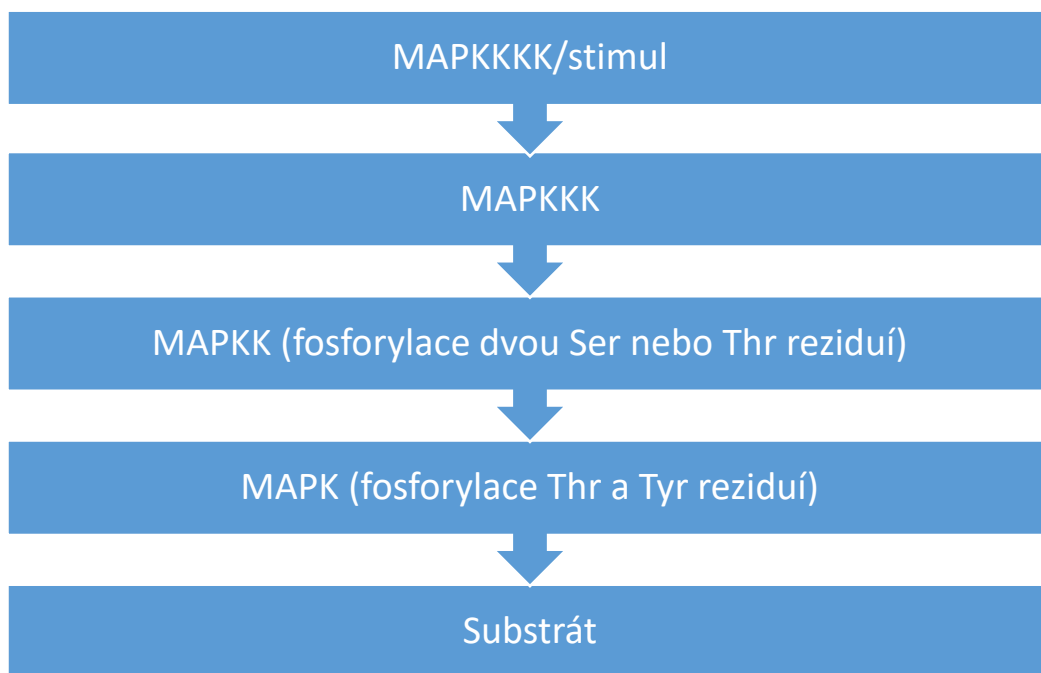
Cíl experimentální část této bakalářské práce bylo připravit a purifikovat rekombinantní proteiny MAPK3, MAPK6, PLD α 1 a SIMK.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Signální MAPK kaskády

Vzhledem ke svému přisedlému životnímu stylu, jsou rostliny neustále vystaveny široké škále stresů, vyvolanými dynamicky se měnícími okolními podmínkami. Tyto stresy jsou většinou povahy abiotické (neživé vlivy) nebo biotické (útok patogeny). Rostliny si tedy během evoluce vyvinuly nepřehledné množství sofistikovaných strategií a specifických signálních drah, za účelem přežití a aklimatizace na daný působící stres (Bai *et al.*, 2018). Rychlá a cílená reakce skrze signální kaskády zajišťuje remodelaci metabolických drah a spuštění obranných mechanismů rostlin. Mezi jedny z nejdůležitějších a dobře popsanych signálních kaskád u rostlin patří právě mitogenem aktivované protein kinasové (MAPK) kaskády, které jsou zapojeny jak do abiotického stresu, tak i do celé řady vývojových procesů (Sinha *et al.*, 2011).

Mitogenem aktivované protein kinasy (MAPK/MPK) kaskády jsou důležitou součástí signálních drah v eukaryotech. Fungují jako senzory/akceptory, tak aby koordinovaly buněčnou odpověď ke správnému růstu organismů a jejich adaptaci na stále se měnící prostředí. Typická MAPK kaskáda se skládá z aspoň jedné MAPK, jedné MAPK kinasy (MAPKK) a jedné MAPKK kinasy (MAPKKK) (Widmann *et al.*, 1999). V některých případech je MAPK modul rozšířen o specifické aktivátory MAPKKK, které jsou známé jako MAPKKKK nebo MAP4K (Jonak *et al.*, 2002). Prvním krokem přenosu signálu je aktivace MAPKKKK nebo MAPKKK stimulací receptorů plazmatické membrány (Jagodzik *et al.*, 2018). Jako reakce na stimul (cytokininy, růstové faktory, neurotransmitery, hormony, buněčný stres) (Widmann *et al.*, 1999) se aktivuje MAPKKK (nejvyšší úroveň v kaskádě). MAPKKK dále fosforyluje a aktivuje MAPKK. Fosforylace se děje na dvou serinových (Ser) nebo threoninových (Thr) reziduích (Jagodzik *et al.*, 2018). Aktivovaná MAPKK zase fosforyluje a aktivuje MAPK (poslední úroveň v kaskádě). Fosforylace se děje na threoninových a tyrosinových (Tyr) reziduích (Ichimura *et al.*, 2002). A aktivovaná MAPK následně fosforyluje různé substráty (Obr. 1), jako jsou transkripční faktory, kinasy, další enzymy a strukturální proteiny (Fanger *et al.*, 1997).. V genomu *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) je 20 MAPK, 10 MAPKK (Ichimura *et al.*, 2002) a okolo 80 MAPKKK (Jonak *et al.*, 2002). Kaskády mají velkou možnost kombinací, a tím tvoří diverzní signál, například výsledná MAPK může být fosforylována různými nadřazenými členy kaskády (Zhang & Zhang, 2022).



Obrázek 1: Schéma MAPK kaskády

Rostliny mají vícevrstvé způsoby obrany, aby odvrátily invazi patogeny. První vrstva se spustí při detekci molekulárních vzorů asociovaných s patogenem/mikrobem (PAMPs/MAMPs – pathogen/microbe-associated molecular patterns) nebo molekulárních vzorů asociovaných s poškozením souvisejícím s rostlinou (DAMPs – plant-originated damage-associated molecular patterns). Detekce nastane díky receptorům pro rozpoznávání vzorů (PRRs – pattern recognition receptors), mnohé z nich jsou receptor-like protein kinases (RLKs). Tato vrstva obrany je známá jako vzorem spuštěná imunita (PTI – pattern-triggered immunity) Druhá vrstva obrany je známá jako efektořem spuštěná imunita (ETI – effector-triggered immunity) (Chisholm *et al.*, 2006; Jones & Dangl, 2006). Rozpoznání molekulárních vzorů asociovaných s patogenem/mikrobem (PAMP/MAMP) rostlinou spouští několik časných obranných reakcí, včetně toku vápníku, produkce reaktivních forem kyslíku (ROS), indukci biosyntézy ethylenu a aktivace mitogenem aktivovaných protein kinas (MAPK; Meng & Zhang, 2013).

Rostliny musí také vnímat nepříznivé podmínky prostředí, jako jsou různé stresy – vysoká salinita, sucho, extrémní teploty a mnohé další. Tyto stresové signály jsou převáděny na buněčné reakce tak, aby nastaly vhodné úpravy v metabolismu, růstu a vývoji (Zhu, 2016). Většinu času je aktivace MAPK v reakci na abiotický stres slabší, ve srovnání s aktivací pomocí PAMP nebo patogenní infekcí. U několika rostlinných hormonů včetně ethylenu, JA a kyseliny abscisové (ABA) je známo, že jsou důležité při

reakci rostlin na abiotický stres. MAPK se účastní biosyntézy a/nebo při signalizaci těchto hormonů. V důsledku toho budou tyto MAPK pravděpodobně hrát důležitou roli také v reakcích rostlin na abiotický stres (Zhang & Zhang, 2022).

Klíčový význam pro pochopení funkce MAPK v různých signálních kaskádách je identifikace jejich cílů. To jsou substráty nesoucí sekvence interagující s MAPK, včetně prolinem (Pro) řízených serinových (Ser) nebo threoninových (Thr) zbytků (SP motivy) (Pitzschke, 2015) a příslušných dokovacích sekvencí (dokovací motivy, popř. D motivy). Protože MAPK přednostně cílí na SP motivy, tak jsou klasifikovány do skupiny CGMC společně s cyklin-dependentními kinasami (CDK – cyclin-dependent kinases), glykogen syntázovými kinasami 3 (GSK3 – glycogen synthase kinases 3) a CDK-like kinasami (CLK – CDK-like kinases) (Komis *et al.*, 2018).

MAPK lze snadno identifikovat na základě podobnosti sekvence a TXY aktivačním motivu mezi kinasovými subdoménami VII a VIII. Díky dvojité fosforylaci threoninových (Thr) a tyrosinových (Tyr) reziduí na tomto motivu se MAPK aktivují. Na základě aminokyselin v prostřední pozici TXY motivu, je možné rostlinné MAPK rozdělit do dvou subtypů – TEY a TDY subtyp (Ichimura *et al.*, 2002). TEY subtyp je příbuzný s kvasinkovou a živočišnou ERK podrodinou a TDY subtyp je charakteristický pro rostliny (Zhang & Zhang, 2022). TEY subtyp rostlinných MAPK je dále rozdělen do tří skupin. První je skupina A MAPK, kde se nachází *A. thaliana* MAPK3 a MAPK6 (Ichimura *et al.*, 2002). Další je skupina B MAPK, do které patří *A. thaliana* MAPK4, MAPK5, MAPK11, MAPK12, MAPK13. Poslední skupinou je skupina C MAPK, která je zastoupena *A. thaliana* MAPK1, MAPK2, MAPK7, MAPK14. TDY subtyp rostlinných MAPK je také známý, jako skupina D MAPK. Do této skupiny patří *A. thaliana* MAPK8, MAPK9, MAPK15, MAPK16, MAPK17, MAPK18, MAPK19 a MAPK20. (Zhang & Zhang, 2022).

Rostlinné MAPKK jsou také velmi konzervované a mohou být jednoduše identifikovány podle podobnosti sekvencí. Analýza genomu *A. thaliana* ukázala 10 MAPKK, které se dají rozdělit do 4 skupin (Jonak *et al.*, 2002). Skupina A MAPKK obsahuje tři členy, tedy MKK1, MKK2 a MKK6. Skupina C MAPKK zahrnuje MKK4 a MKK5. Skupina D MAPKK zahrnuje MKK7, MKK8, MKK9 a MKK10. (Zhang & Zhang, 2022).

MAPKKK se rozdělují na dvě skupiny fylogeneticky nepříbuzných nebo vzdáleně příbuzných kinas, tedy MEKK1-like a Raf-like MAPKKK. V genomu *A. thaliana* je 21 MEKK1-like MAPKKK a přibližně 48 Raf-like MAPKKK (Jonak *et al.*, 2002).

První výzkum rostlinných MAPK nastal na počátku 90. let 20. století. Pomocí přečtení celého genomu *A. thaliana*, který byl získán v roce 2000 a dostupných sbírek T-DNA mutantů, se hledání funkcí MAPK v rostlinách postupně přesunulo na modelový druh *A. thaliana*. (Zhang & Zhang, 2022). K dnešnímu dni však byl v rostlinách zjištěn omezený počet kompletních MAPK kaskád (Tab 1), zejména v reakcích na abiotický stres, interakcích rostlina-patogen a ve vývoji rostlin (Benhamman *et al.*, 2017).

Tabulka 1: Známé kompletní MAPK kaskády

Druh rostliny	MAPK kaskády	Funkce	Reference
<i>Arabidopsis thaliana</i>	MEKK1- MKK4/MKK5- MPK3/MPK6	Rezistence vůči bakteriálním a houbovým patogenům	Asai <i>et al.</i> , 2002
	MEKK1-MKK2- MPK4/MPK6	Reakce na stres ze soli a ochlazení	Teige <i>et al.</i> , 2004
	MEKK1- MKK1/MKK2- MPK4	Negativní regulátor v imunitní odpovědi	Gao <i>et al.</i> , 2008
	MAPKKK17/18- MKK3-MPK1/2/7/14	ABA regulované abiotické stresové geny	Danquah <i>et al.</i> , 2015
<i>Nicotiana benthamiana</i>	NPK1-MEK1-Ntf6	Reakce na abiotický a biotický stres	Jin <i>et al.</i> , 2002; Liu <i>et al.</i> , 2004

2.1.1 MPK3 a MPK6

MPK3 a MPK6 jsou *A. thaliana* MAPK, které jsou aktivované patogeny a elicitory (Galleti *et al.*, 2011). *A. thaliana* MPK6 je exprimována v celém rostlinném těle, ale po podrobném zkoumání, však MPK6 vykazuje zvýšenou expresi v květech (Bush & Krysan, 2007), buňkách stomatální linie (Wang *et al.*, 2007) a kořenovém meristému (Smekalová *et al.*, 2014a). Na subcelulární úrovni se MPK6 přednostně akumuluje v buněčném jádru (Tab.2). Zdá se, že při zobrazování s vyšším rozlišením pomocí mikroskopie se strukturovaným osvětlením (SIM) se MPK6 shlukuje v jaderné mikrodoméně *A. thaliana* MPK3 vykazuje zvýšenou expresi v jádru, cytoplazmě a plazmatické membráně (Tab. 2) (Komis *et al.*, 2018).

Tabulka 2: Subcelulární lokalizace a funkce *A. thaliana* MPK3 a MPK6, vytvořeno podle Komis *et al.*, 2018

Druh rostliny	Člen MAPK kaskády	Subcelulární lokalizace	Buněčná/fyziologická funkce	Reference
<i>Arabidopsis thaliana</i>	MPK3	Jádro, cytoplazma	Vedení pylové trubice	Guan <i>et al.</i> , 2014b
		Jádro, cytoplazma	Regulace indolglukosinolátové dráhy v obraně rostlin a vývoj průduchů pomocí SPCH fosforylace	Zhang <i>et al.</i> , 2016 Zhang <i>et al.</i> , 2015
		Plazmatická membrána	Regulace nadbytku proteinů pro přenos lipidů	Pitzschke <i>et al.</i> , 2014
	MPK6	Jádro, cytoplazma, mikrotubuly, TGN	Stanovení roviny buněčného dělení a vývoj kořenů	Müller <i>et al.</i> , 2010 Smekalová <i>et al.</i> , 2014a
		Jádro	Vedení pylové trubice	Guan <i>et al.</i> , 2014
		Jádro, cytoplazma	Vývoj průduchů	Zhang <i>et al.</i> , 2016 Zhang <i>et al.</i> , 2015

Byly prováděny rozsáhlé proteomické výzkumy zaměřené na identifikaci substrátů MAPK. Jeden takový výzkum identifikoval 48 substrátů MPK3 a 39 substrátů MPK6, z nichž 26 bylo společných pro oba proteiny (Feilner *et al.*, 2005). Je zajímavé, že jedním ze substrátů MPK6 byla 1-aminocyklopropan-1-karboxylová kyselina syntáza-6, což byl první rostlinný substrát MAPK, který byl identifikován *in vivo* (Liu & Zhang, 2004).

2.1.1.1 Vývojové procesy rostlin

MPK3 a MPK6 se vyskytují u několika signálních drah, které se podílí na vývoji a růstu rostliny. MPK3 a MPK6 signalizace je potřebná pro vývoj reprodukčních rostlinných orgánů (Komis *et al.*, 2018). Struktura rostlinného květenství u *A. thaliana* je založena na lokalizované buněčné proliferaci pod kontrolou signalizačního modulu MKKK4–MKK4/MKK5–MPK3/MPK6. Vývoj prašníků v *A. thaliana* vyžaduje aktivaci MPK3/MPK6 (Bush & Krysan, 2007). Taktéž růst pylové láčky závisí na MPK3 a MPK6 (Guan *et al.*, 2014b). Vývoj samčí gametofytické buňky v *A. thaliana* je založen na aktivaci transkripčních faktorů SPL, WRKY2 a WRKY34 zprostředkované MPK3/MPK6 (Guan *et al.*, 2014a, Zhao *et al.*, 2017b). Aktivace signální dráhy

MKK7-MPK6-PIN1 má důležitou roli ve větvení výhonků *A. thaliana* (Jia *et al.*, 2016). Vývoj a morfologie listů vyžaduje aktivaci modulu MKK7-MPK3 v *A. thaliana*. Vzory žilkování listů jsou řízeny signalizačními moduly MKK2-MPK10 a MKK7-MPK6 (Jia *et al.*, 2016).

2.1.1.2 Abiotický stres

Aby rostliny přežily, musí reagovat na různorodé stresy z prostředí včetně chladu, tepla, osmolarity, salinity, hypoxie, sucha, těžkých kovů, UV záření a dalších. Nejvýznamnější stresem indukované MAPK u *A. thaliana* jsou MPK3, MPK4 a MPK6. (Smékalová *et al.*, 2014b).

Teplota má zásadní vliv na růst rostlin, vývoj a produktivitu. V mírném podnebí se rostliny musí přizpůsobit častým změnám teplot a připravit se na chladné zimní období. Stres indukovaný nízkými teplotami aktivuje expresi transkripčního faktorů C-repeat-binding factors (CBF) a CBF jsou naopak aktivátory genů reagujících na chlad, které jsou nezbytné pro toleranci mrazu (Ding *et al.*, 2020). Transkripční faktor známý jako induktor CBF exprese 1 (ICE1) je hlavním regulátorem exprese CBF (Chinnusam *et al.*, 2003). Bylo prokázáno, že *A. thaliana* ICE1 je substrátem MPK3 a MPK6 a že fosforylace destabilizuje protein ICE1. Mutace *MPK3*, *MPK6* nebo obou zvyšuje toleranci rostlin k mrazu. Naproti tomu konstitutivní aktivace MPK3/MPK6 tlumí toleranci vůči mrazu. Kromě toho může kaskáda MEKK1-MKK2-MPK4 potlačit aktivitu MPK3/MPK6 a zvýšit tak odolnost rostlin vůči chladu (Zhao *et al.*, 2017). Kromě pozitivní regulace CBF pomocí ICE1 je exprese genů *CBF* také pod negativní kontrolou MYB15, což je transkripční represor signalizace při chladovém stresu. Aktivita MYB15 je také regulována prostřednictvím MPK6 fosforylace (Kim *et al.*, 2017). Bylo zjištěno, že během reakce na tepelný stres u *A. thaliana* MPK6 fosforyluje hlavní transkripční faktor tepelného stresu, HsfA2, na svém zbytku T249 (Evrard *et al.*, 2013).

Reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou běžné vedlejší produkty aerobního metabolismu (Mittler *et al.*, 2011). Produkce ROS může být také vyvolána během období abiotického stresu, včetně extrémních teplot, genotoxického ozařování, stresu ze sucha (Suzuki *et al.*, 2012) a také během invaze patogeny (O'Brien *et al.*, 2012). Ve většině případů zvýšené hladiny ROS způsobují aktivaci MPK3 a MPK6 (Lumbreras *et al.*, 2010). Pro plnou aktivaci obou MAPK je zapotřebí oxidative signal-inducible 1 (OXI1) (Rentel *et al.*, 2004). OXI1 je serin/threonin protein kinasa, která zprostředkovává signalizaci oxidačního stresu (Forzani *et al.*, 2011). Dalším signálním proteinem, jehož

aktivace je spouštěna oxidačním stresem, je MAPK fosfatáza 2 (MKP2), která interaguje s MPK3 a MPK6 v rostlinách *A. thaliana*. MKP2 defosforyluje MPK3 a MPK6, a tím podporuje toleranci vůči oxidačnímu stresu (Lee & Ellis, 2007).

Hyperosmotický stres a salinita způsobují rozdílnou aktivaci tří hlavních MAPK souvisejících se stresem v *A. thaliana*, jmenovitě MPK3, MPK4 a MPK6. Ke stresu ze salinity dochází, když jsou rostliny vystaveny vysokým koncentracím NaCl v půdě. Toto může mít silné nepříznivé účinky na růst a vývoj rostlin (Smékalová *et al.*, 2014b). Ligand–receptor pár, PAMP-INDUCED SECRETED PEPTIDE 3 (PIP3) a RECEPTOR-LIKE KINASE 7 (RLK7), hrají zásadní roli v toleranci salinity u *A. thaliana* (Zhou *et al.*, 2022a). PIP3 je pozitivní regulátor tolerance salinity, a jeho funkce je závislá na RLK7. MPK3/MPK6 hrají roli v zesílení stresové odpovědi, vůči salinitě pomocí podřazené signalizace PIP3-RLK7 (Zhang & Zhang, 2022).

Globální oteplování a desertifikace půdy vedly v některých regionech ke snížení vodního potenciálu půdy. Rostliny v takových oblastech mohou zažít stres související s vodou, jako je sucho a vysychání. MPK6 je jedna z *A. thaliana* MAPK, která se aktivuje při stresu ze sucha. MPK6 je aktivována akumulací ROS vyvolanou suchem a akumulací kyseliny fosfatidové (PA; Yu *et al.*, 2010). Bylo prokázáno, že rostliny s nadměrnou expresí MKK4 vykazují nižší ztráty vody za anhydrobiotických podmínek ve srovnání s rostlinami divokého typu (Kim *et al.*, 2011). To naznačuje, že MPK3, která je podřazeným cílem MKK4, může také podporovat reakce vyvolané stresem ze sucha (Smékalová *et al.*, 2014b).

2.1.2 MAPK u *Medicago sativa*

Medicago sativa L., běžně známá jako tollice vojtěška nebo mezinárodně alfalfa, je celosvětově přední krmná luštěnina (Aung *et al.*, 2015). *M. sativa*, patřící do čeledi bobovité, je sezónní vytrvalá luštěnina žijící od tří do dvanácti let v závislosti na odrůdě a klimatu. Dospělá rostlina se vyznačuje silným křovitým kořenem s postranními kořeny. Na stonku se střídavě tvoří trojčetné nebo vícečetné listy. Květy se liší barvou, ale nejběžnější jsou fialové, žluté a krémově bílé (Bora & Sharma, 2011). Známé MAPK u *M. sativa* jsou SIMK (salt-induced MAPK), též známá jako MMK1 (Medicago MAPK1), MMK2 (Medicago MAPK2), MMK3 (Medicago MAPK3) a SAMK (stress-activated MAPK), také známa jako MMK4 (Medicago MAPK4). Mezi MAPKK u *M. sativa* patří SIMKK (SIMK kinasa) (Tena *et al.*, 2001).

2.1.2.1 SIMK

Stresem indukovaná MAPK (SIMK) u vojtěšky je homolog AtMAPK6, a je indukována stresem ze salinity (Munnik *et al.*, 1999) a elicitorem (Cardinale *et al.*, 2000). SIMK kinasa (SIMKK) byla identifikována jako nadřazený aktivátor SIMK (Kiegerl *et al.*, 2000). SIMKK je funkční duálně specifická protein kinasa, která fosforyluje SIMK na thr a tyr zbytcích aktivační smyčky (Kiegerl *et al.*, 2000). Bylo zjištěno, že SIMK je převážně v jádrech, zatímco je aktivována a redistribuována z jádra do rostoucích kořenových vláskových špiček. Látky ovlivňující aktinový cytoskelet, jako jsou latrunkulin B a jasplakinolid, mají přímý dopad na intracelulární lokalizaci (Šamaj *et al.*, 2002). V neaktivním stavu jsou SIMKK a SIMK ko-lokalizované v cytoplazmě a v jádře. Po solném stresu se však podstatná část SIMKK i SIMK přemístila do cytoplazmatických kompartmentů (Ovečka *et al.*, 2014).

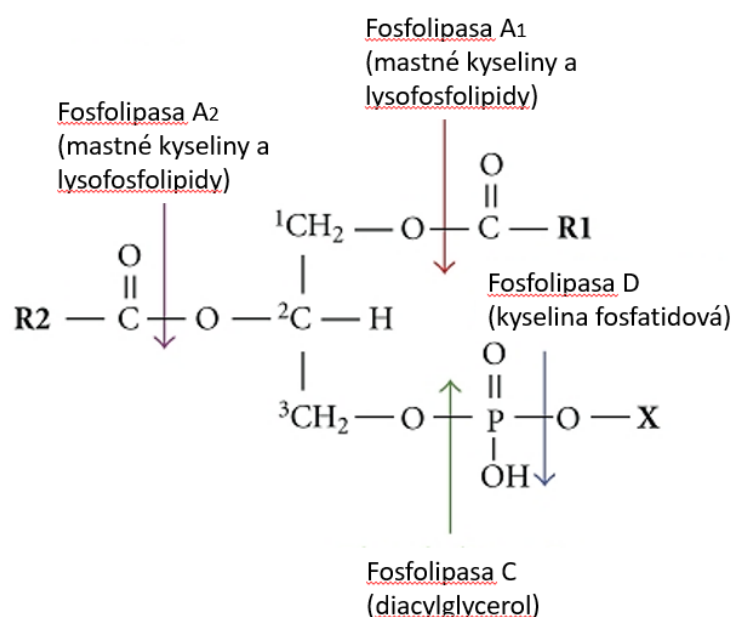
Rostlinné linie s nadměrně exprimovaným a aktivovaným GFP-SIMK vykazovaly delší kořenové vlásky, více infekčních vláken, seskupené hlízky a zvýšení produkce nadzemní části. SIMKK RNAi linie ukazující snížení abundance SIMKK i SIMK, byla doprovázena kratšími kořenovými vlásky, méně infekčních vláken a hlízek, a nižší biomasou nadzemních částí rostlin. Tyto údaje naznačují, že genetická manipulace SIMK ovlivňuje kořenové vlásky, infekční vlákna, hlízky a produkci biomasy u vojtěšky. Subcelulární lokalizace SIMK pomocí GFP-SIMK ve stabilně transformované linii, která nadexprimovala GFP-SIMK, ukázala výskyt tohoto proteinu na několika místech stabilně transformovaných rostlin vojtěšky. GFP-SIMK se přednostně hromadí v jádře, a méně v cytoplazmatických strukturách epidermálních buněk, hypokotylu a průdušicích v listech. Pohled na špička kořene pomocí maximum intensity projection (MIP) odhalil jadernou a cytoplazmatickou lokalizaci GFP-SIMK. Podobná subcelulární lokalizace byla nalezena také v kořenových vláscích a epidermálních buňkách laterálních kořenů. U rostoucích kořenových vlásků byla GFP-SIMK většinou lokalizována v jádrech a v cytoplazmě na špičkách kořenových vlásků (Hrbáčková *et al.*, 2021).

2.2 Fosfolipasy

Buněčné signalizace se účastní velké množství signálních molekul a sekundárních posílů, včetně fosfolipidů, které převádějí environmentální podněty do biochemických výstupů. Fosfolipidy vynikají mezi signálními molekulami rozmanitostí mechanismů, kterými mohou modifikovat signalizaci v buněčných membránách (Champeyroux *et al.*, 2020).

Jsou hlavními složkami biologických membrán a mají důležité signální funkce (Hou *et al.*, 2016). Jsou přítomny prakticky ve všech organelách včetně jádra a podílejí se na reakcích rostlin na stresy, jako je chlad nebo salinita. Nedávno bylo zjištěno, že i několik vývojových procesů je koordinováno těmito sloučeninami (Champeyroux *et al.*, 2020).

Fosfolipas (PL) představují všudypřítomnou rodinu proteinů, které štěpí různé vazby ve fosfolipidech, aby udržely homeostázu a stabilitu membránových lipidů (Wang *et al.*, 2012). Vzhledem k rozmanitosti produktů (volné mastné kyseliny, diacylglyceroly, kyselina fosfatidová) uvolňovaných prostřednictvím fosfolipasové aktivity jsou fosfolipasy kategorizovány na základě jejich polohové specifičnosti vůči fosfolipidovým substrátům. Rostlinné PL se dělí do tří hlavních tříd: A, C a D. Tyto třídy se liší typem katalytických reakcí (Obr. 3). Fosfolipasy A (PLA), hydrolyzují acylové skupiny z pozic sn-1 a sn-2 fosfolipidů a produkují volné mastné kyseliny a lysofosfolipidy. Fosfolipasy C (PLC) katalyzují hydrolýzu celé hlavní fosforylové skupiny, štěpí glycerofosfátovou vazbu, a tak poskytují diacylglycerol a fosforylovanou hlavní skupinu. Fosfolipasy D (PLD) štěpí fosfodiesterovou vazbu ve fosfolipidu, čímž vzniká kyselina fosfatidová (PA). Moderní genetické a biochemické analýzy odhalily, že rostliny taky mají různé izoformy enzymů PLA, PLC a PLD, které se liší strukturou genů nebo proteinů a katalytickými vlastnostmi, (Chen *et al.*, 2011). PL se podílejí na reakcích rostlin na různé stresy, jako je chlad (Huo *et al.*, 2016), teplo (Krčková *et al.*, 2015), salinitu (Arisz & Munnik, 2011), osmotický tlak (Hong *et al.*, 2008), stres z těžkých kovů (Pejchar *et al.*, 2015) a patogeny (Zhao, 2015) a na reakcích na rostlinné hormony, jako je kyselina abscisová (ABA) (Peters *et al.*, 2010), auxiny (Scherer *et al.*, 2012) a cytokininy (Repp *et al.*, 2004). PL se podílejí na biosyntéze kyseliny jasmonové (JA) (Ishiguro *et al.*, 2001) V neposlední řadě PL ovlivňují vývojové procesy rostlin, jako je růst pylové láčky (Potocký *et al.*, 2003), gravitropismus (Lee, 2003), vývoj kořenů a listů (Wimalasekera *et al.*, 2010). V nedávných studiích bylo působení PL v abiotických a biotických stresových reakcích rostlin často a komplexně přezkoumáno, zatímco jejich role ve vývojových procesech rostlin je do značné míry podceňována (Takáč *et al.*, 2019b).



Obrázek 2: Schéma hydrolýzy fosfolipidů fosfolipasami. Šipky označují místa napadení pro hydrolytické štěpení fosfolipas typu A1, A2, C a D. Také jsou ukázány hlavní produkty generované jejich působením., převzato z Belaunzarán *et al.*, 2011, upraveno.

2.2.1 Fosfolipasy D

PLD katalyzují hydrolýzu strukturních glycerofosfolipidů (např. fosfatidylcholin, fosfatidylethanolamin a fosfatidylglycerol), produkují PA a volné rozpustné hlavní skupiny (např. cholin nebo ethanolamin) (Selvy *et al.*, 2011). *A. thaliana* PLD obsahuje 12 členů, které jsou klasifikovány do šesti kategorií (α , β , γ , δ , ϵ a ζ), na základě struktury jejich proteinové domény a biochemických vlastností (Li *et al.*, 2009).

Jelikož je PA je přímým produktem aktivity PLD (hydrolýza fosfolipidů), tak k produkci PA může být přiřazena řada vývojových a se stresem souvisejících rolí. PA se váže na různé substráty, včetně kinas (např. MPK6; Yu *et al.*, 2010), enzymů (např. glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza; Kim *et al.*, 2013) a proteinů regulujících cytoskelet a signalizaci (Zhang *et al.*, 2012; Camoni *et al.*, 2012). PLD a PA regulují mnoho procesů, např. membránový transport (Donaldson, 2009), jadernou lokalizaci transkripčních faktorů (Yao *et al.*, 2013) a regulace organizace cytoskeletu v rostlinných buňkách (Pleskot *et al.*, 2013).

2.2.1.1 PLD α 1

PLD α 1 je nejhojnějším členem PLD (Fan *et al.*, 1999) a interaguje s řadou proteinů, čímž hraje důležitou roli v několika buněčných procesech (Uraji *et al.*, 2012). PLD α 1 je lokalizovaná v cytoplazmě, a je schopná relokalizace do plazmatické membrány za podmínek solného stresu (Novák *et al.*, 2018). PLD α 1 je důležitá pro regulaci klíčení semen, zprostředkovanou ABA (Roy Choudhury & Pandey, 2016). PLD α 1 je potřebný pro homeostázu proteinů zapojených do vezikulárního transportu, membránových fúzí a kontaktních míst endoplazmatického retikula s plazmatickou membránou (Takáč *et al.*, 2018). Bylo také zjištěno, že PLD α 1 interaguje s komplexem adaptor-protein 2, který řídí příjem a třídění proteinů internalizovaných endocytózou zprostředkovanou klathrinem (Yamaoka *et al.*, 2013). Nedávná proteomická studie naznačila, že PLD α 1 má integrační roli v importu a zpracování chloroplastových proteinů, stejně jako v plastidové a cytosolické translaci během biogeneze chloroplastů u *A. thaliana* (Takáč *et al.*, 2019a). Nicméně molekulární mechanismus spojující PLD α 1, který v chloroplastech chybí, s translací a biogenezí chloroplastů zůstává neznámý (Takáč *et al.*, 2019b).

PA odvozená od PLD α 1 kontroluje organizaci mikrotubulů během solného stresu a zvyšuje toleranci k tomuto stresu u *A. thaliana* (Zhang *et al.*, 2012). Nedávno bylo zjištěno, že PLD α 1 zdobí kortikální mikrotubuly a spojuje je s klathrinem. Bylo také odhaleno těsné spojení PLD α 1 s cytokinetickými mikrotubuly, zejména na vnitřním okraji zvětšujícího se fragmoplastu. Kromě toho byl PLD α 1 nalezen v preprofázním pásu a mitotickém vřeténku. PLD α 1 se tedy pravděpodobně účastní na transportu vezikul, které jsou spojené s dodáním membránového materiálu na nově se tvořící buněčnou desku (Novák *et al.*, 2018).

2.2.1.2 Propojení MPK6/3 + PLD α 1

Zajímavostí je, že PLD α 1 a PA se jeví jako důležité regulátory signalizace MAPK (Vadovič *et al.*, 2019) a že kromě PA odvozeného od PLD α 1 se PLD α 1 samo fyzicky asociuje s MAPK (Yu *et al.*, 2010; Vadovič *et al.*, 2019). PLD α 1 je také slibný cíl interakce a fosforylace MAPK, protože má fosforylační místo specifické pro MAPK ve své aminokyselinové sekvenci, a také má dokovací místo specifické pro MAPK (Takáč *et al.*, 2016).

Byla zjištěna přímá fyzická interakce mezi MPK3 a PLD α 1, tedy PLD α 1 fyzicky interaguje s MPK3 za podmínek *in vitro* a *in planta*. Společná lokalizace a akumulace

PLD α 1 a MPK3 nastala v blízkosti plazmatické membrány a cytoplazmatických struktur. Nedostatek PLD α 1 negativně ovlivňuje fosforylaci a množství MPK3. Interakce mezi PLD α 1 a MPK3 má důležitý význam v odpovědích na solný stres a při ABA signalizaci v *A. thaliana*. Nedostatek MPK3 v nepřítomnosti PLD α 1 brání inhibici klíčení semen závislé na ABA (Vadovič *et al.*, 2019).

Byla zjištěna role PLD α 1 a PA při signalizaci solného stresu prostřednictvím regulace MAPK u *A. thaliana*. Tedy PA, která je produkována PLD α 1 během stresu ze salinity, se váže na MPK6 a stimuluje tím kinasovou aktivitu. Mutant *plda1*, který produkuje méně PA, vykazoval sníženou aktivitu MPK6 (Yu *et al.*, 2010). Na druhou stranu je možné, že MAPK regulují PLD α 1, jelikož v komparativní proteomické studii bylo tohoto proteinu v *mpk6* mutantu nadbytečně mnoho (Takáč *et al.*, 2016). Nedávno publikovaná studie ukázala, že při reakci rostlin na indukovanou hypoxii dochází ke specifické interakci mezi MPK3/6 a PLD α 1. MPK3/6 tedy přímo interaguje a fosforyluje PLD α 1, což vede k potlačení aktivity PLD α 1, a to může hrát důležitou roli při udržení produkce PA na správné úrovni, zvláště když rostlina zažívá stres z dlouhodobé hypoxie. PA reguluje toleranci rostlin k hypoxii modulací integrity membrány a signalizace hypoxie zprostředkované MPK3/6. PA se může vázat na rekombinantní proteiny MPK3 a MPK6 *in vitro* a může modulovat jejich aktivitu *in vivo*. Kromě toho se PA váže na proteiny MPK3 a MPK6 a zesiluje jejich aktivitu (Zhou *et al.*, 2022b).

2.3 Metody přípravy rekombinantní proteinů

Proteiny jsou stále více potřebné v různých vědeckých oborech, v průmyslu či ve zdravotnictví, čímž stoupá potřeba jejich produkce. Získání potřebného množství proteinů z jejich přírodních zdrojů bývá náročné, proto se proteiny začaly syntetizovat v heterologních systémech. Pro produkci rekombinantních proteinů je důležitý výběr nejvhodnějších podmínek růstu a optimálních expresních organismů.

Rekombinantní proteiny mohou být produkovány řadou expresních systémů. Pro expresi se mohou využít prokaryotické, tak i eukaryotické expresní systémy. Mezi takové prokaryotické systémy patří například *Pseudoalteromonas haloplanktis*, *Escherichia coli* (*E. coli*) (Ferret-Miralles *et al.*, 2015), *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Streptomyces* (Chen, 2012), *Bacillus subtilis* (Pohl & Harwood, 2010). Eukaryotické expresní systémy se skládají ze savčích buněk, hmyzích buněk, kvasinek, mikrořasy, transgenní zvířata a rostliny. Nejpopulárnějším organismem pro expresi rekombinantních proteinů je *Escherichia coli* (Ferret-Miralles *et al.*, 2015).

2.3.1 Exprese rekombinantních proteinů pomocí *Escherichia coli*

E. coli je gramnegativní bakterie, která má mnoho vlastností, díky kterým je atraktivní pro expresi rekombinantních proteinů. Jedna z takových vlastností je její schopnost rychlého a početného růstu na levných substrátech. Další důležitá vlastnost této bakterie je dostupnost stále většího počtu klonovacích vektorů a mutantních hostitelských kmenů (Baneyx, 1999). Produkce rekombinantních proteinů pomocí *E. coli* je považována za nejrychlejší, nejjednodušší a nejlevnější metodu (Hayat *et al.*, 2018).

2.3.1.1 Expresní kmeny *Escherichia coli*

Existuje několik kmenů *E. coli*, které se využívají pro expresi rekombinantních proteinů. Každý kmen má různé výhody a nevýhody. Mezi používané kmeny *E. coli* patří BL21 a BL21 (DE3), BL21 (DE3) pLysS, BL21 Star, Lemo21 (DE3), Tuner (DE3), Origami, SHuffle, Rosetta, RosettaGami (DE3), C41 (DE3) a C43 (DE3) (Hayat *et al.*, 2018). BL21(DE3) a jeho deriváty jsou zdaleka nejpoužívanějšími kmeny pro expresi proteinů (Rosano & Ceccarelli, 2014).

2.3.1.2 Plasmidové vektory

Aby buňka dokázala produkovat rekombinantní proteiny, je potřebné, aby se do takové buňky dostala daná cizorodá DNA. K přenosu cizorodé DNA do hostitelské buňky jsou použity expresní vektory. Nejpoužívanějším typem vektorů pro transformaci *E. coli* jsou plasmidové vektory (Hayat *et al.*, 2018). Plazmidy jsou kruhové dvouvláknové molekuly deoxyribonukleové kyseliny (DNA), které se autonomně replikují v hostitelské buňce. Obsahují geny, které jsou nezbytné pro funkce udržování plazmidů, jako je iniciace a řízení replikace (Couturier *et al.*, 1988). Existuje několik různých typů plasmidových vektorů, jako například pET vektory, pHAT vektory, pMAL a pGEX vektory, pSUMO vektory (Hayat *et al.*, 2018), pQE vektory, pBAD vektory a pUC vektory (Tripathi, 2016).

2.3.2 Purifikace rekombinantních proteinů pomocí chromatografických technik

Po úspěšné expresi rekombinantních proteinů z *E. coli* je potřeba provést purifikaci. Purifikace je důležitým krokem v biologickém zpracování rekombinantních proteinů, protože slouží k dosažení požadované úrovně čistoty. Podle potřebné úrovně čistoty se k získání konečného produktu používají různé chromatografické techniky, jako je afinitní chromatografie, ionexová chromatografie, vylučovací chromatografie a hydrofobní interakční chromatografie (Tripathi, 2016).

2.3.2.1 Afinitní chromatografie

Afinitní chromatografie je jednoduchá technika používaná k purifikaci rekombinantních proteinů v jediném kroku. Pro provedení afinitní chromatografie je potřeba biospecifický ligand kovalentně připojený k afinitní matici. V průběhu chromatografie se požadovaný protein váže na ligandy na afinitní matici, dokud není provedena eluce pomocí elučních roztoků. Před elucí se provede promytí, aby se odstranily nenavázané proteiny (Tripathi, 2016).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Biologický materiál

Escherichia coli kmen One Shot TOP10 (Invitrogen; C404010) nesoucí konstrukty *pGEX6P-1::MPK3* a *pGEX6P-1::MPK6* (vektory poskytnuty darem od doc. Michaela Wrzacek, Ph.D.), *pGEX6P-1::SIMK* a *pMAL-c2X::SIMK* (dříve připraveny a poskytnuty vedoucím bakalářské práce), *pDEST17::PLD α 1* (vektory poskytnuty darem od Ing. Pavola Vadoviče, Ph.D.)

Escherichia coli kmen One Shot™ BL21 Star™ (DE3) nesoucí konstrukty *pGEX6P-1::MPK3*, *pGEX6P-1::MPK6*, *pGEX6P-1::SIMK*, *pMAL-c2X::SIMK*, *pDEST17::PLD α 1*

3.1.2 Chemikálie

Agrisera: anti-PLDA1/2 protilátka (primární; kat. číslo: AS1222364)

Bio-Rad: Precision Plus Protein Dual Color Standards (kat. číslo: 1610374), 40% akrylamid (kat. číslo: 1610148EDU)

Carl Roth: mléko sušené, Tween 20, imidazol

Cell Signaling Technology: His-Tag (27E8) Mouse mAB (primární protilátka; kat. číslo 2366S), GST-Tag (26H1) Mouse mAb (primární protilátka; kat. číslo 2624S)

Duchefa Biochemie: ampicilin

Invitrogen: SOC medium

New England Biolabs: amylosové kuličky (kat. číslo: E8021L)

Nippon Genetics: Midori Green Advance

Penta: 70% a 96% ethanol

Serva: isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG)

Sigma Aldrich: ethylendiaminotetraoctová kyselina (EDTA), kyselina octová, tris(hydroxymetyl)aminometan (TRIS), glycin, agarosa, Triton X-100, kyselina chlorovodíková (HCl), hydroxid draselný (KOH), LB Broth (Miller), LB Broth s agarem

(Miller), dodecylsírán sodný (SDS), isopropanol, N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin (TEMED), peroxodisírán amonný (APS), Ponceau S, Coomassie Brilliant blue G-250, anti-AtMPK3 protilátka (primární; kat. číslo M8318), anti-AtMPK6 protilátka (primární; kat. číslo A7104), glutation, maltosa, cOmplete™ His-Tag Purification (afinitní kuličky pro His-Tag), Resin, Glutathione Sepharose® 4B (afinitní kuličky pro GST-Tag)

Thermo Scientific: 6x DNA Loading Dye (kat. číslo 01136102), GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, fenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF), fosfátový pufr (PBS) fast digest pufr (10x; kat. číslo 01275830), pufr R (10x), HindIII, EcoRV, PstI, goat anti-Rabbit (sekundární protilátka; kat. číslo 31460), goat anti-Mouse (sekundární protilátka; kat. číslo 31430)

3.1.3 Roztoky a média

Agarosový separační gel, 1%

1 g	agarosa
100 ml	TAE pufr (1x)
3 µl	Midori Green Advance

Coomassie Brilliant blue G-250, 0,1% roztok

50 %	methanol
10 %	kyselina octová
39,9 %	Milli-Q H ₂ O
0,1 %	Coomassie Brilliant blue G-250

Odbarvující roztok

40 %	methanol
10 %	kyselina octová
50 %	Milli-Q H ₂ O

Pevné LB médium (250 ml)

10 g	LB Broth s agarem (Miller)
250 ml	Milli-Q H ₂ O

sterilizace autklávováním

Ponceu S, roztok (250 ml)

0,25 g Ponceu S
12,5 ml octová kyselina
doplnit do objemu 250 ml Milli-Q H₂O

P1 pufr

50 mM Tris/HCl
10 mM Na₂EDTA
0,1 mg/ml RNAsa
pH 8,0

P2 pufr

0,2 M NaOH
1 % SDS

P3 pufr

3 M KCH₂COOH
pH 5,5

Rozdělovací gel, 10% (50 ml)

12,5 ml 40% akrylamid
12,5 ml 1,5 M TRIS-HCL, pH 8,8
0,5 ml 10% SDS
24,25 ml Milli-Q H₂O
0,025 ml TEMED
0,25 ml APS

Running pufr (10x)

30 g TRIS
144 g Glycin
10 g SDS
doplnit do objemu 1000 ml Milli-Q H₂O

TAE pufr (50x)

121 g TRIS
28,55 g kyselina octová

50 ml ½ M EDTA, pH 8
doplnit do objemu 500 ml Milli-Q H₂O

Tekuté LB médium (2000 ml)

50 g LB Broth (Miller)
2000 ml Milli-Q H₂O
 pH 7,2 (KOH)

sterilizace autoklávováním

Transfer pufr (10x)

30 g TRIS
144 g glycin
doplnit do objemu 1000 ml Milli-Q H₂O

Tris buffered saline s přidavkem Tween 20 (TBS-T; 1000 ml)

2,42 g TRIS
8,78 g NaCl,
 pH 7,6 (HCl)
999 ml Milli-Q H₂O
1 ml Tween 20

Tris buffered saline s přidavkem Tween 20 se sušeným mlékem (5% blokovací pufr)

5 g sušené mléko
doplnit do objemu 100 ml TBS-T

Vzorkovací pufr

0,05 mol/l Tris-HCl
2 mmol/l EDTA
2 % SDS
10 % glycerol
0,2 % bromfenolová modř
6 % merkaptoethanol
 pH 6,8

Zaostřovací gel, 4% (25 ml)

2,5 ml	40% akrylamid
6,3 ml	1,5 M TRIS-HCL, pH 6,8
0,25 ml	10% SDS
15,9 ml	deionizovaná H ₂ O
0,025 ml	TEMED
0,125 ml	APS

3.1.4 Přístroje

Flowbox (Merci), digester (Merci), laboratorní předvážky S1502 (Bel Engeneering), analytické váhy XA110/2X (Radwag), pH metr PC 2700 (Eurotech Instruments), elektromagnetická míchačka IKA Combimag-REO (Drehzahl Electronic), vortex (Labnet), microspin FV-2400 (Biosan), třepačka s nastavitelnou teplotou a časem ES-20 (Biosan), spektrometr NanoDrop Lite (Thermo Scientific), Thermostat C (Eppendorf), mikrocentrifuga ScanSpeed 1730R MicroCentrifuge (LaboGene), mikrocentrifuga Microfuge 16 (Beckman Coulter), spektrometr SmartSpec Plus (Bio-Rad), stolní centrifuga Rotanta 460R (Hettich), sonikátor Model 3000MP Ultrasonic Homogenizer (BioLogics-Inc), ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad), proudový zdroj pro elektroforézu PowerPac HC High-Current (Bio-Rad), třepačka Rocker-Shaker MR-12 (Biosan), Výrobník Milli-Q vody Simplicity water purification system (Millipore), skener Epson ImageScanner III (GE Healthcare), Gel Doc EZ imager (Bio-Rad)

3.1.5 Software pro zpracování výsledků

ImageLab (Bio-Rad), PowerPoint 365 (Microsoft Office)

3.2 Metody

3.2.1 Příprava LB média a LB média s agarem

Pro přípravu 4 l tekutého Luria-Bertani (LB) média bylo naváženo dvakrát 50 g prášku. Každých 50 g bylo poté rozpuštěno v 1900 ml Milli-Q vody. Pomocí KOH bylo upraveno pH roztoku na 7,2 a roztok byl doplněn do finálního objemu 2000 ml. Připravené médium bylo rozlito do 8 zásobních láhví po 500 ml. Médium bylo sterilizováno autoklávováním.

Po sterilizaci byl k médiu přidán ampicilin (AMP). Do 500 ml tekutého LB média bylo přidáno 250 μ l AMP o koncentraci 100 mg/ μ l.

Pro přípravu 250 ml pevného LB média s agarem bylo naváženo 10 g prášku, ke kterému bylo přidáno 250 ml Milli-Q vody. Připravené médium v zásobní lahvi bylo také sterilizováno autoklávováním. Po sterilizaci a mírném zchladnutí média byl k médiu přidán ampicilin (AMP). Do 50 ml pevného LB média bylo přidáno 40 μ l AMP o koncentraci 100 mg/ μ l. Po přidání AMP bylo 50 ml pevného LB média rozlito do 3 plastových Petriho misek a ponecháno k samovolnému ztuhnutí.

Veškerá práce se sterilními médii byla prováděna za sterilních podmínek ve flowboxu.

3.2.2 Transformace bakterií *Escherichia coli* pomocí metody „Heat shock“

Chemokompetentní propagační kmen bakterie *Escherichia coli* (*E. coli*) TOP10 a expresní kmen BL21 Star™ (DE3) byl transformován pomocí plasmidů *pGEX6P-1::MPK3*, *pGEX6P-1::MPK6*, *pDEST17::PLD α 1* metodou „Heat shock“.

Do popsáných mikrozkušavek bylo napipetováno 50 μ l bakterií *E. coli* a 5 μ l plasmidů. Mikrozkušavky byly 3x promíchány a nechaly se 20 minut na ledu. Po uplynutí dané doby byly mikrozkušavky zahřáty na 42°C po dobu 1 minuty a znovu byly položeny na led po dobu 3 minut.

Do mikrozkušavek bylo přidáno 250 μ l SOC média a vše se nechalo 1 hodinu kultivovat na třepačce při 37°C. Po uplynutí dané doby byly provedeny roztěry pomocí sterilních hokejek na připravených LB agarech v Petriho miskách s ampicilinovou rezistencí. Takto připravené Petriho misky se nechaly kultivovat přes noc při 37°C.

Veškerá práce se sterilními médii v Petriho miskách byla prováděna za sterilních podmínek ve flowboxu.

3.2.3 Inokulum *Escherichia coli*

Bakterie *E. coli* kmen TOP10 s plasmidy *pGEX6P-1::MPK3*, *pGEX6P-1::MPK6*, *pDEST17::PLD α 1* a kmen BL21 Star™ (DE3) s plasmidy *pGEX6P-1::MPK3*, *pGEX6P-1::MPK6*, *pDEST17::PLD α 1*, *pGEX6P-1::SIMK*, *pMAL-c2X::SIMK* byly nasazeny sterilním napipetováním z v glycerolu zmražené kultury. Do 200 μ l kultury bakterií kmene TOP10 bylo napipetováno do 6 ml připraveného tekutého LB média s přídatkem AMP. Do 200 μ l kultury bakterií kmene BL21 Star™ (DE3) bylo přeneseno do 50 ml tekutého LB média s přídatkem AMP. Takto připravená inokula se nechaly kultivovat přes noc na třepačce při 37°C.

Veškerá práce se sterilními médii byla prováděna za sterilních podmínek ve flowboxu.

3.2.4 Izolace plasmidové DNA

Bakterie *E. coli* TOP10 s plasmidy *pGEX6P-1::MPK3*, *pGEX6P-1::MPK6*, *pDEST17::PLD α 1*, které byly přes noc inkubované v 6 ml média, byly přelity do 2 ml mikrozkuvek a centrifugovány při 8.800 g a laboratorní teplotě po dobu 2 minut. Po centrifugaci byl supernatant odlit. K peletu z 1. centrifugace byly přility 2 ml bakteriální kultury a opakuje se stejná centrifugace. Po centrifugaci byl znovu odlit supernatant.

Po odlití veškerého supernatantu bylo přidáno 300 μ l P1 pufru a pomocí vortexu byl bakteriální pelet rozsuspendován. Poté bylo přidáno 300 μ l P2 pufru. Mikrozkuvky byly 3x promíchány obrácením v ruce a nechaly se inkubovat 5 minut při laboratorní teplotě. Nakonec bylo přidáno 300 μ l P3 pufru, mikrozkuvky byly znovu 3x promíchány obrácením v ruce a nechaly se inkubovat 5 minut na ledu.

Po uplynutí potřebné doby byly mikrozkuvky centrifugovány 15 minut při 16.000 g a 4°C. Poté byl supernatant odlit do nových 1,5 ml mikrozkuvek, ve kterých již bylo připraveno 600 μ l 100% isopropanolu. Mikrozkuvky byly 3x promíchány obrácením v ruce.

Mikrozkuvky byly znovu centrifugovány 15 minut při 16.000 g a 4°C. Po centrifugaci byl odlit supernatant a k peletu bylo přidáno 750 μ l chlazeného 70% ethanolu. Mikrozkuvky byly centrifugovány 10 minut při 16.000 g a 4°C.

Po centrifugaci bylo z mikrozkuvek odpipetováno co nejvíce ethanolu a pelet se nechal sušit v termostatu při 42°C do té doby, dokud se nevypařil všechn ethanol.

Po odpaření veškerého ethanolu se k vysušené sraženině plasmidové DNA přidalo 50 μ l Milli-Q vody a pelet plasmidové DNA byl rozsuspendován. Nakonec byla změřena koncentrace plasmidové DNA pomocí spektrometru nanodrop.

3.2.5 Restrikce plasmidové DNA

Pro ověření správnosti darovaných konstruktů byla provedena kontrolní restrikce plasmidové DNA. Pro štěpení plasmidové DNA získané z bakterie s plasmidem *pGEX6P-1::MPK3* (očekávaná velikost vzniklých fragmentů 5397 bp a 1812 bp) byl potřeba restrikční enzym EcoRV a pufr 10x pufr R. Pro štěpení plasmidové DNA získané z bakterie s plasmidem *pGEX6P-1::MPK6* (očekávaná velikost vzniklých fragmentů 3458 bp a 2912 bp) byl potřeba restrikční enzym PstI a pufr 10x Fast Digest pufr. Pro štěpení plasmidové DNA získané z bakterie s plasmidem *pDEST17::PLD α 1* (očekávaná

velikost vzniklých fragmentů 3824 bp, 1978 bp a 1150 bp) byl potřeba restriční enzym HindIII a pufr 10x Fast Digest pufr.

Pro přípravu určité restriční směsi bylo do mikrozkušavky postupně přidáno 2 μ l pufru, 1,5 μ l plazmidové DNA (odpovídající 1500-3000 ng DNA ve směsi), 16 μ l Milli-Q vody a 0,5 μ l enzymu. Takto připravená směs se nechala hodinu inkubovat na třepačce při 37°C. Po uplynutí potřebné doby se k směsi přidalo 4 μ l 6x loading dye barviva.

Výsledek restrikce byl vyhodnocen pomocí gelové elektroforézy.

3.2.6 Separace plasmidové DNA gelovou elektroforézou

Pro přípravu 1% agarosového gelu bylo potřeba v Erlenmayerově baňce smíchat 1 g agarosy a 100 ml 1x TAE pufru. Takto připravená Erlenmayerova baňka se vložila do mikrovlnné trouby a roztok se ohříval do té doby, dokud se všechna agarosa nerozpustila. Po rozpuštění agarosy se roztok nechal chvíli zchladit, přidaly se 3 μ l Midori Green Advance a vše se zamíchalo.

Takto připravený roztok gelu byl nalit do elektroforetické komůrky. Do gelu byl vložen hřebínek a špičkou od pipety byly odstraněny bubliny v gelu. Gel se poté nechá ztuhnout.

Až gel ztuhl, odstranil se hřebínek a postranní plastové desky. Komůrka s gelem byla vložena do elektroforetické vany. Do vany byl nalit 1x TAE pufr, tak aby byl gel plně ponořený.

Do vzniklých jamek byly napipetovány vzorky a marker. Jako marker byl použit GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder o objemu 5 μ l. Vzorky byly napipetovány po 20 μ l postupně do jednotlivých jamek. Pozice vzorků byly zaznamenány pro následnou identifikaci.

Po nanesení vzorků se celá vana uzavřela a připojila se správně ke zdroji. Na zdroji bylo nastaveno napětí 95 V po dobu 35 minut. DNA fragmenty byly poté vizualizované pomocí přístroje Gel Doc EZ imager a softwaru ImageLab.

3.2.8 Kultivační a expresní podmínky

Kultivována byla bakterie *E. coli* kmen BL21 Star™ (DE3) s plasmidy *pGEX6P-1::MPK3*, *pGEX6P-1::MPK6*, *pDEST17::PLD α 1*, *pGEX6P-1::SIMK*, *pMAL-c2X::SIMK*.

Nejprve bylo nutné připravit 8 velkých dvoulitrových Erlenmayerových baněk. Každá baňka byla polepena páskou pro indikaci sterilizace a uzavřena alobalem. Takhle připravené baňky byly sterilizovány autoklávováním.

Do 8 zásobních lahví, které obsahovaly 500 ml tekutého LB média se přidalo 250 μ l AMP o koncentraci 100 mg/ μ l. Tato média byla postupně přelita do sterilních Erlenmayerových baněk. Bakterie z narostlých inokul byly po 20 ml přidány do médií a Erlenmayerovy baňky byly uzavřeny alobalem. Veškerá práce se sterilními médii byla prováděna za sterilních podmínek ve flowboxu.

Takto připravené Erlenmayerovy baňky byly hodinu kultivovány na třepačce při 37°C. Růst buněk byl pozorován pomocí spektrometru, který měřil optickou hustotu při 600 nm. Bakterie byly kultivovány do té doby, než optická hustota nedosáhla hodnoty 0,8. Při dosažení správné optické hustoty bylo do kultur přidáno 350 μ l indukčního činidla isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG). Poté byly Erlenmayerovy baňky s kulturou kultivovány přes noc na třepačce při 18°C. Každé dvě Erlenmayerovy baňky se stejnou kulturou byly slité dohromady. Kultury byly postupně centrifugovány pomocí velké stolní centrifugy. Kultury byly vždy centrifugovány 10 minut při 10.000 g a 4°C. Po každé centrifugaci byl odlit supernatant a k peletu byla přilita další část stejné kultury a takto se postup opakoval, dokud nebyly veškeré kultury stočeny.

3.2.9 Příprava vzorku k afinitní purifikaci

K získaným bakteriálním peletům bylo přidáno 7 ml PBS a pomocí vortexu byly pelety rozsuspendovány. Dále byl k roztokům napipetován PMSF o finální koncentraci 2 mM.

Roztok byl poté sonifikován na ultrazvukovém homogenizátoru. Sonifikace každého vzorku probíhala 3x 5 minut při amplitudě 50 %, pulser on na 6 sekund a pulser off na 7 sekund.

Po dokončení sonifikace byl k roztokům přidán Triton X-100. Roztoky byly 2x centrifugovány při 10.000 g a 4°C po dobu 20 minut. Zcentrifugované supernatanty byly přelity do čistých 50 ml falkonek.

3.2.10 Afinitní purifikace

V použitých vektorech je obsažena afinitní kotva, díky které je poté možné provést afinitní purifikaci. Vektor pGEX6P-1 obsahuje GST-Tag, vektor pDEST17 obsahuje His-Tag a vektor pMAL-c2X obsahuje MBP tag. Připravené rekombinantní proteiny poté nesou daný tag, díky kterému jsou zachyceny v kolonách nesoucí afinitní matici, vůči dané použité afinitní kotvě.

Gravitační kolonky pro afinitní purifikaci byly promyty BPS fosfátovým pufrům. Dále byly do kolon přidány afinitní kuličky (200 μ l), které na sebe vázaly GST-Tag nebo His-Tag. Pro MBP tag byly použity amylosové kuličky (200 μ l).

Do kolon byly nanášeny supernatanty, které byly získány po sonifikaci a centrifugaci buněk. Jakmile protekla zhruba polovina supernatantu, byl odebrán flow through vzorek, který byl později použit pro analýzu pomocí SDS-PAGE elektroforézy. Po protečení supernatantu byly nenavázané proteiny vymyty PBS fosfátovým pufrům.

Po odtečení PBS fosfátového pufru byla pomocí elučních roztoků zahájena eluce proteinů z kolon. Použité eluční roztoky byly glutathion (pro GST), maltosa (pro MBP) a imidazol (pro His-Tag). Frakce byly jímány do jednotlivých 1,5 ml mikrozkušavek po zhruba 300 μ l.

Afinitní kuličky, které zůstaly v kolonách, byly rozsuspendovány v PBS fosfátovém pufru a odebrány do 1,5 ml mikrozkušavek. Vzorky byly později použity pro analýzu pomocí SDS-PAGE elektroforézy.

3.2.11 Příprava vzorků pro analýzu pomocí SDS-PAGE elektroforézy

Do čistých 1,5 ml mikrozkušavek bylo napipetováno 20 μ l vzorkovacího pufru a 60 μ l vzorku. Všechny takto připravené vzorky byly zahřáty v termostatu na 96°C po dobu 5 minut. Byly připraveny vzorky supernatantu, flow through, frakcí a afinitních kuliček.

3.2.12 SDS-PAGE elektroforéza

Pro přípravu gelů bylo zapotřebí prvně sestavit plochá skla a vymezovače, tak aby vše bylo co nejvíce utěsněné. Mezi skla byl nejprve nalit 10% rozdělovací gel, který byl překryt vrstvou isopropanolu. Gel tuhnul bez přístupu kyslíku zhruba hodinu. Po ztuhnutí byl isopropanol vylit, volné místo mezi skly bylo promyto destilovanou vodou a vysušeno filtračním papírem. Poté byl na rozdělovací gel nanesen 4% zaostřovací gel, do kterého byl vložen hřebínek a gel se nechal ztuhnout.

Ztuhlé gely byly přemístěny do elektrod a elektroforetické vaničky, do které byl nalit 1x running pufr a z gelů byly opatrně vytáhnuty hřebínky. Do vzniklých jamek byl vždy napipetován proteinový marker (5 μ l) a připravené vzorky (10 μ l). Na vaničku byl pořádně položen elektrodový kryt a vše bylo připojeno ke zdroji. Prvních 10 minut byl přístroj zapnutý na 100 V, poté bylo napětí zvýšeno na 150 V. Elektroforéza běžela tak dlouho, dokud vzorky nedoputovaly na konec gelu.

2.2.13 Obarvení gelu pomocí Coomassie Brilliant Blue G-250

Po ukončení elektroforézy bylo nutné všechny gely obarvit pomocí 0,1% barvicího roztoku Coomassie Brilliant Blue G 250. Gely byly barveny po dobu 10 minut. Po uplynutí dané doby byl barvicí roztok vyměněn za odbarvovací roztok. Odbarvování gelů probíhalo 4x 10 minut v odbarvovacím roztoku a následně ve vodě přes noc. Odbarvené gely byly oskenovány pomocí skeneru Epson ImageScanner III.

3.2.14 Imunoblotování se specifickými protilátkami

Pro provedení imunoblotování je zapotřebí znovu separovat proteiny pomocí SDS-PAGE elektroforézy. Poté je nutné proteiny z gelů transferovat na membrány. Po ukončení separace byly gely promyty v destilované vodě po dobu 5 minut. Po vylití vody se gely nechaly inkubovat s 1x transfer pufrem na třepačce s kývavým pohybem. Mezitím byly nitrocelulosové membrány, které jsou potřebné na transfer, namočený v methanolu (30 sekund) a následně inkubovány 10 minut v 1x transferovém pufru. Ve vaničce s 1x transferovým pufrem byla připravena porézní podložka. Na podložku byla položena mokrá houbička a 3 mokré filtrační papíry (všechno bylo nejdříve namočeno v 1x transfer pufru). Vrstva houbičky a filtračních papírů byla přejeta válečkem a na vše byl položen gel, na kterém byla položena membrána. Na membránu byly položeny další 3 mokré filtrační papíry a mokrá houbička. Takto vytvořené vrstvy byly uzavřeny mezi porézními podložkami. Takto připravené gely a membrány byly vloženy do blotovacího zařízení, do kterého byl nalit 1x transfer pufr. Vše bylo připojeno ke zdroji, který byl nastaven na 100 V a byl pouštěný na 1,5 hodiny.

Po dokončení transferu proteinů z gelů na membrány, byly tyto membrány pomyty destilovanou vodou a obarveny pomocí barvicího roztoku Ponceu S a pořízeny fotografické snímky znázorňující přítomnost proteinů na membráně. Membrány se poté odbarvily destilovanou vodou a vyfotily pro pozdější kontrolu.

Membrány byly následně inkubovány 10 minut v roztoku TBS-T. K membránám byl poté nalit roztok TBS-T s rozpuštěným 5% sušeným mlékem, tak aby proběhla blokace navázaných proteinů. Membrány se takto nechaly blokovat 2 hodiny na třepačce s kývavým pohybem.

Po ukončení blokování byly k membránám nality správné primární protilátky. Mezi primární protilátky patřily anti-PLDA1/2 protilátka, anti-AtMPK3 protilátka, anti-AtMPK6 protilátka, His-Tag (27E8) Mouse mAB a GST-Tag (26H1) Mouse mAb.

Membrány byly takto inkubovány přes noc při 4°C na třepačce s kývavým pohybem. Primární protilátky byly zředěny v TBS-T v poměru 1:1000.

Další den byly primární protilátky odlity. Membrány byly poté 5x promyty v TBS-T, každé promytí probíhalo na třepačce s kývavým pohybem po dobu 10 minut. Po pořádném promytí byly membrány inkubovány se sekundárními protilátkami. Mezi sekundární protilátky patřily goat anti-Rabbit protilátka a goat anti-Mouse protilátka. Sekundární protilátky byly zředěny v TBS-T s 5% mlékem v poměru 1:5000 a doba inkubace byla 1,5 hodiny při pokojové teplotě.

Nakonec byly sekundární protilátky vylity a membrány byly promyty 3x 10 minut v TBS-T. Následně byly membrány ponořeny do požadovaného substrátu (Clarity Western ECL Substrate) po dobu 1 minuty. Získaný signál z membrán byl následně vizualizován pomocí přístroje ChemiDoc MP Imaging systém (nastavení protokolu Chemi s expozicí 1-60 sekund) a softwaru ImageLab.

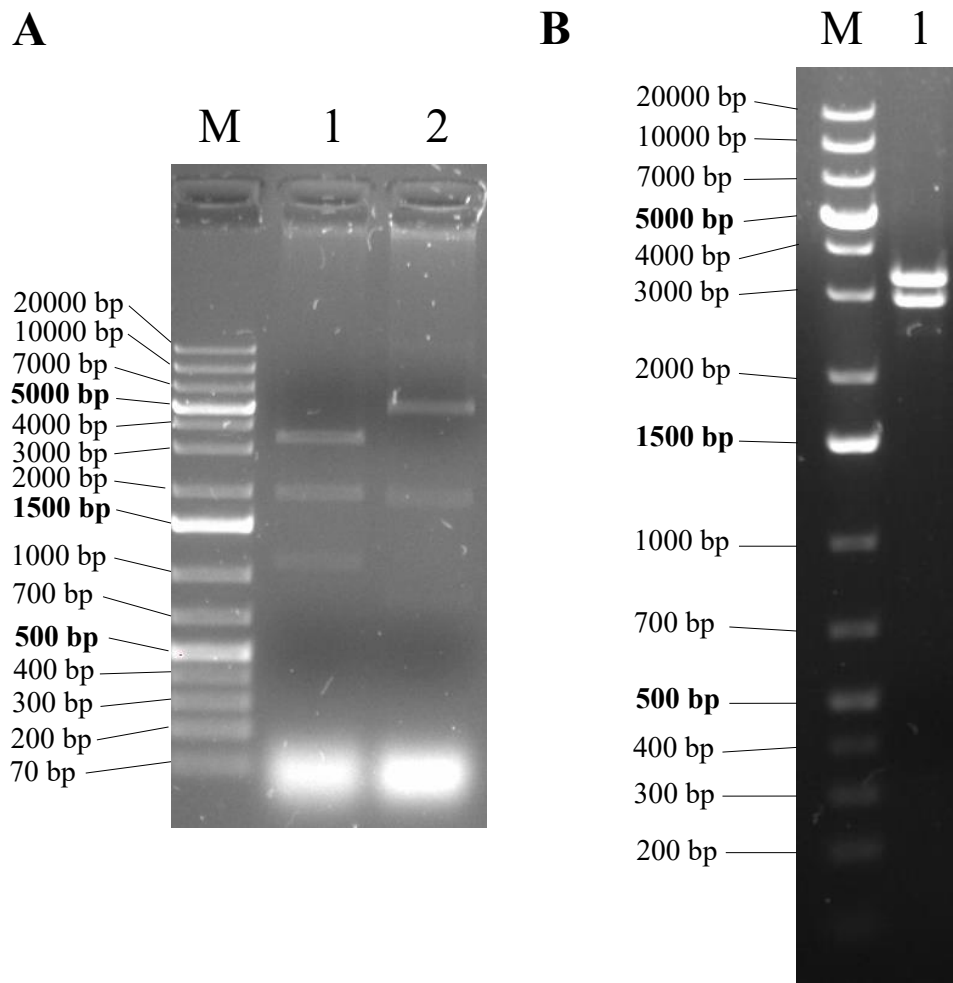
4 VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Validace získaných konstruktů pomocí restrikční analýzy s následnou gelovou elektroforézou

Úvodní experiment této práce byl zaměřen na ověření správnosti získaných vektorů, které jsme obdrželi darem od doc. Michaela Wrzaczek, Ph.D. (*pGEX6P-1::MPK3*, *pGEX6P-1::MPK6*) a Ing. Pavola Vadoviče, Ph.D. (*pDEST17::PLDa1*). Tyto vektory byly nejdříve transformovány do *E. coli* kmen TOP10 za účelem amplifikace a izolace plasmidové DNA, která byla následně použita pro restrikční analýzu. Pro restrikční štěpení vektoru *pGEX6P-1::MPK3* byl použit enzym EcoRV, jehož působením měli vzniknout fragmenty o velikosti 5397 bp a 1812 bp. Pro restrikční štěpení vektoru *pGEX6P-1::MPK6* byl použit enzym PstI, jehož působením měli vzniknout fragmenty velikosti 3458 bp a 2912 bp. Enzym HindIII byl použit pro restrikční štěpení vektoru *pDEST17::PLDa1*, působením tohoto enzymu měli vzniknout fragmenty o velikosti 3824 bp, 1978 bp a 1150 bp. Restrikční směsi jednotlivých reakcí byly separovány pomocí agarosové gelové elektroforézy a vyhodnoceny (Obr. 3).

Výsledky restrikční analýzy vektoru *pGEX6P-1::MPK3* ukázaly přítomnost pásů v přibližné velikosti 5300 bp a 1800 bp. Tento získaný výsledek koreluje s *in silico* predikovanými produkty štěpení (Obr. 3A). V případě restrikční analýzy vektoru *pDEST17::PLDa1* se ukázala přítomnost 3 pásů v přibližné velikosti 3800 bp, 1900 bp a 1150 bp. Získaný výsledek koreluje s *in silico* predikovanými produkty štěpení (Obr. 3A). Výsledky restrikční analýzy vektoru *pGEX6P-1::MPK6* ukázaly přítomnost 2 pásů v přibližné velikosti 3400 bp a 2900 bp. Tento výsledek, taktéž koreluje s *in silico* predikovanými produkty štěpení (Obr. 3B).

Vizualizované výsledky potvrdily přítomnost předpokládaných fragmentů, jejich vznik byl *in silico* predikován, což dokumentuje správnost obdržených expresních vektorů s odpovídajícími geny zájmu.



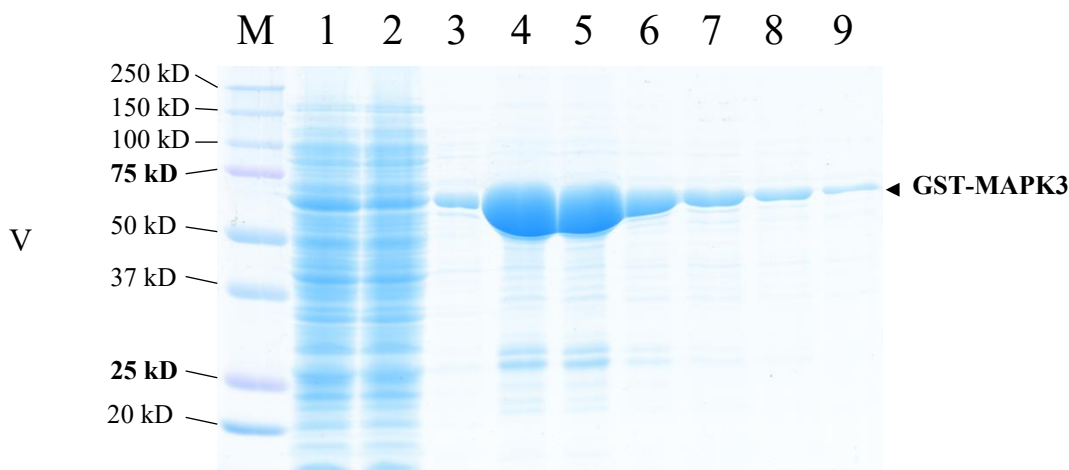
Obrázek 3: Elektroforetický záznam restrikční analýzy plasmidové DNA na agarosovém gelu. A: (M) 1 kb DNA ladder. (1) pDEST17::PLD α 1 štěpeno HindIII, očekávané produkty štěpení jsou 3824 bp, 1978 bp, 1150 bp. (2) pGEX6P-1::MAPK3 štěpeno EcoRV, očekávané produkty štěpení jsou 5397 bp a 1812 bp. B: (M) 1 kb DNA ladder. (1) pGEX6P-1::MAPK6 štěpeno PST1, očekávané produkty štěpení jsou 3458 bp a 2912 bp.

4.2 Exprese rekombinantních proteinů s jejich následnou afinitní purifikací

Pro přípravu rekombinantních proteinů byly transformovány expresní bakterie *E. coli* kmen BL21 Star™ (DE3) ověřenými konstrukty *pGEX6P-1::MAPK3*, *pGEX6P-1::MAPK6*, *pDEST17::PLD α 1*, *pGEX6P-1::SIMK* a *pMAL-c2X::SIMK* (pro SIMK byly konstrukty připraveny a ověřeny již dříve školitelem práce). Po úspěšné transformaci byla provedena indukce exprese rekombinantních proteinů, a to za stejných podmínek pro všechny konstrukty (indukce IPTG při OD_{600nm} 0,8; teplota exprese 18°C). Získané lyzáty, obsahující předpokládané exprimované rekombinantní proteiny, byly pročištěny

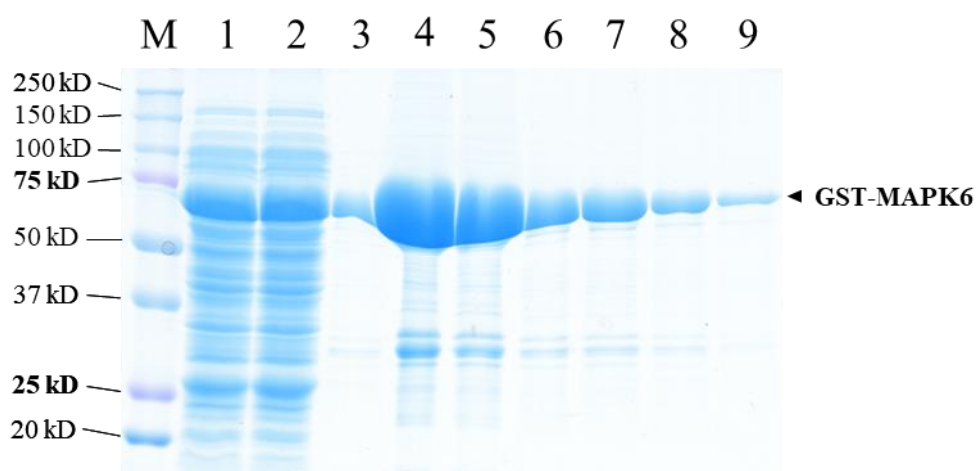
pomocí adekvátních afinitních kuliček a jednotlivé frakce byly vizualizované pomocí SDS-PAGE a následného barvení gelů (Obr. 4, 5, 6, 7 a 8).

V připravených vzorcích byla pomocí SDS-PAGE a následného coomassie blue barvení potvrzena přítomnost výskytu rekombinantního proteinu GST-MAPK3 (Obr. 4), jehož přepokládaná molekulová hmotnost je 68,7 kDa. Samostatný protein MAPK3 má molekulovou hmotnost 42,7 kDa a GST-Tagu má 26 kDa. Vzniklý hlavní pás rekombinantního proteinu GST-MAPK3 odpovídá velikosti cílového proteinu. Porovnáním vzorků supernatant (sloupec 1) a „flow through“ (sloupec 2) se vzorky frakcí (sloupce 3 až 8) a afinitních kuliček (sloupec 9), je možné potvrdit, že purifikace rekombinantního proteinu proběhla. (Obr. 4). Určité frakce (sloupec 4 a 5) obsahují velké množství rekombinantního proteinu GST-MAPK3, což značí velmi efektivní produkci tohoto rekombinantního proteinu ve zvoleném expresním systému. Je zde patrna (u sloupce 4 a 5) přítomnost balastních nebo částečně vzniklých fragmentů pro GST-MAPK3. Tato přítomnost je menší nebo zcela zanedbatelná u frakcí reprezentující sloupce 6-8, kde je přítomnost rekombinantního proteinu nižší (byl nanášen stejný objem eluované frakce). Dá se tedy říci, že nejčistší frakce jsou reprezentovány ve sloupcích 7-8, které byly vhodné pro další analýzy (Obr. 4).



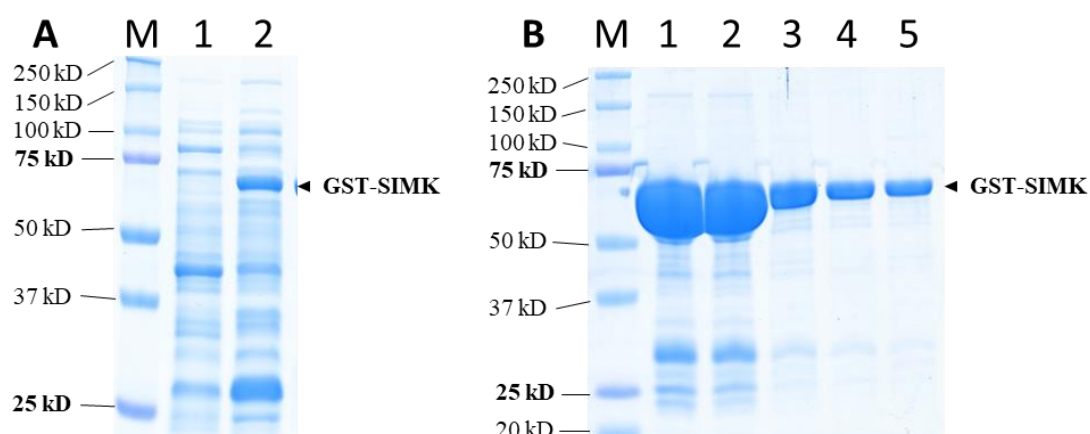
Obrázek 4: Výsledek afinitní purifikace GST-MAPK3 vizualizovaný pomocí SDS-PAGE a barvení coomassie brilliant blue. (M) proteinový marker, (1) supernatant, (2) flow through, (3) eluce frakce 1, (4) eluce frakce 2, (5) eluce frakce 3, (6) eluce frakce 4, (7) eluce frakce 5, (8) eluce frakce 6, (9) afinitní kuličky. Černá šipka značí výskyt rekombinantního proteinu GST-MAPK3, velikost proteinu je 68,7 kDa.

V připravených vzorcích byla pomocí SDS-PAGE a následného coomassie blue barvení potvrzena přítomnost výskytu rekombinantního proteinu GST-MAPK6 (Obr. 5), jehož předpokládaná molekulová hmotnost je 71 kDa. Samostatný protein MAPK6 má molekulovou hmotnost 45 kDa a GST-Tagu má 26 kDa. Vzniklý hlavní pás rekombinantního proteinu GST-MAPK6 odpovídá velikosti cílového proteinu. Porovnáním vzorků supernatant (sloupec 1) a „flow through“ (sloupec 2) se vzorky frakcí (sloupce 3 až 8) a afinitních kuliček (sloupec 9) je možné potvrdit, že purifikace rekombinantního proteinu proběhla (Obr. 5). Opět určité frakce (sloupec 4 a 5) obsahovaly velké množství rekombinantního proteinu GST-MAPK6. Tato informace opět naznačuje, že zvolený expresní systém efektivně produkuje tento rekombinantní protein. Jako u předchozího rekombinantního proteinu GST-MAPK3 je i zde patrna přítomnost balastních nebo částečně vzniklých fragmentů pro GST-MAPK6. Tato přítomnost je nejvíce patrná ve sloupcích 4 a 5, méně pak ve sloupcích 6 a 7. Můžeme konstatovat, že sloupce 7 a 8 jsou nejčistšími frakcemi, jelikož přítomnost balastních proteinů nebo fragmentů je zde menší či zcela zanedbatelná (Obr. 5).



Obrázek 5: Výsledek afinitní purifikace GST-MAPK6 vizualizovaný pomocí SDS-PAGE a barvení coomassie brilliant blue. (M) proteinový marker, (1) supernatant, (2) flow through, (3) eluce frakce 1, (4) eluce frakce 2, (5) eluce frakce 3, (6) eluce frakce 4, (7) eluce frakce 5, (8) eluce frakce 6, (9) afinitní kuličky. Černá šipka značí výskyt rekombinantního proteinu GST-MAPK6, velikost proteinu je 71 kDa.

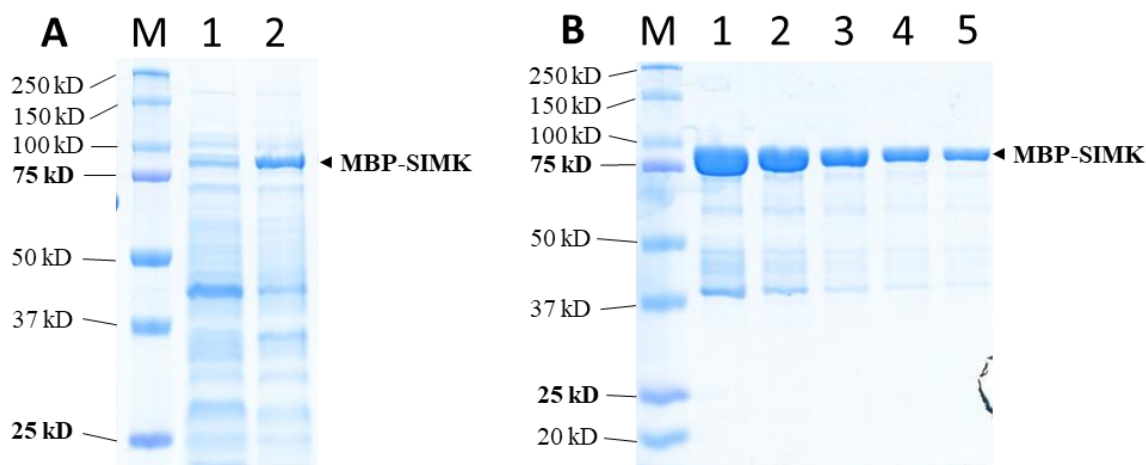
V připravených vzorcích byla pomocí SDS-PAGE a následného coomassie blue barvení potvrzena přítomnost výskytu rekombinantního proteinu GST-SIMK (Obr. 6), jehož předpokládaná molekulová hmotnost je 71 kDa. Molekulová hmotnost samotného proteinu SIMK je 45 kDa a GST-Tagu je to 26 kDa. Vzniklý hlavní pás rekombinantního proteinu GST-SIMK odpovídá velikosti cílového proteinu. Porovnáním vzorku indukované buňky (sloupec A2) a vzorků frakcí (sloupce B1 až B5) bylo možné potvrdit, že purifikace rekombinantního proteinu GST-SIMK proběhla (Obr. 6). V určitých frakcích (sloupec B1 a B2) se vyskytovalo velké množství rekombinantního proteinu GST-SIMK, toto naznačovalo, že vybraný expresní systém efektivně produkuje rekombinantní protein GST-SIMK. Téže frakce (sloupce B1 a B2) vykazovaly přítomnost balastních proteinů či částečně vzniklých fragmentů. Tato přítomnost byla v posledních sloupcích (sloupce B3-B5) malá či úplně zanedbatelná, tudíž by se dalo konstatovat, že toto jsou nejčistší frakce, které byly vhodné pro další analýzu (Obr. 6B).



Obrázek 6: Výsledek afinitní purifikace GST-SIMK vizualizovaný pomocí SDS-PAGE a barvení coomassie brilliant blue. A: (M) proteinový marker, (1) neindukované buňky, (2) indukované buňky, B: (M) proteinový marker, (1) eluce frakce 1, (2) eluce frakce 2, (3) eluce frakce 3, (4) eluce frakce 4, (5) eluce frakce 5. Černé šipky značí výskyt rekombinantního proteinu GST-SIMK, velikost proteinu je 71 kDa.

V připravených vzorcích byla pomocí SDS-PAGE a následného coomassie blue barvení potvrzena přítomnost výskytu rekombinantního proteinu MBP-SIMK (Obr. 7), jehož předpokládaná molekulová hmotnost je 88 kDa. Molekulová hmotnost samotného proteinu SIMK je 45 kDa a MBP-Tagu je to 43 kDa. Vzniklý hlavní pás rekombinantního proteinu GST-SIMK odpovídá velikosti cílového proteinu. Úspěch purifikace bylo možné potvrdit porovnáním vzorku indukované buňky (sloupec A2) se vzorky frakcí (sloupec

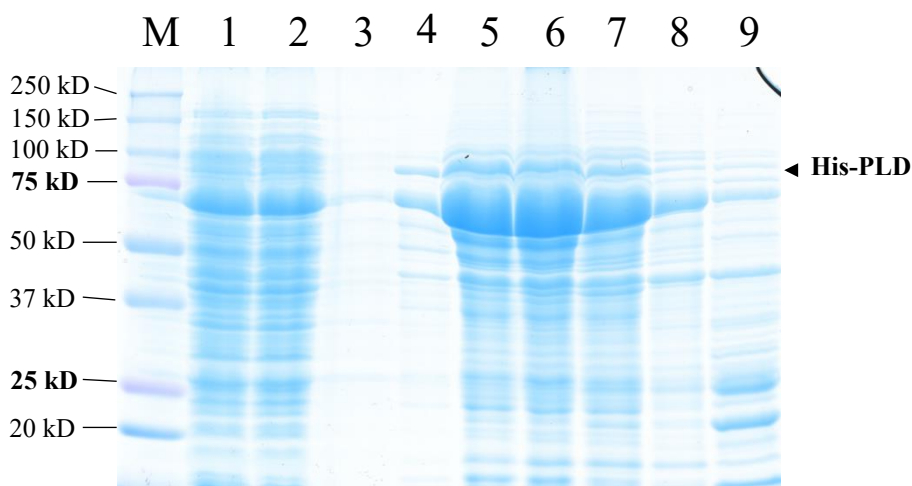
B1 až B5) (Obr. 7). Jako u předchozích rekombinantních proteinů, je i v tomto případě patrná přítomnost balastních nebo částečně vzniklých fragmentů. Tato přítomnost je nejvíce patrná u frakcí ve sloupcích B1 a B2, méně poté ve sloupci 3B. Frakce ve sloupcích 4B a 5B jsou vnímány jako nejčistší frakce, jelikož obsahují zanedbatelné množství balastních proteinů či vzniklých fragmentů (Obr. 7B).



Obrázek 7: Výsledek afinitní purifikace MBP-SIMK vizualizovaný pomocí SDS-PAGE a barvení coomassie brilliant blue. A: (M) proteinový marker, (1) neindukované buňky, (2) indukované buňky. B: (M) proteinový marker, (1) eluce frakce 1, (2) eluce frakce 2, (3) eluce frakce 3, (4) eluce frakce 4, (5) eluce frakce 5. Černé šipky značí výskyt rekombinantního proteinu MBP-SIMK, velikost proteinu je 88 kDa.

Připravené vzorky byly podrobeny SDS-PAGE a barvení coomassie blue. Po porovnání všech frakcí bylo možné konstatovat, že nedošlo k efektivní purifikaci rekombinantního proteinu His-PLD. Balastní proteiny se v tomto případě nacházely ve všech eluovaných frakcích (Obr. 8). Nedokážeme přesně určit, kde nastala chyba, ale s největší pravděpodobností to bylo u afinitních kuliček nebo složení pufru. Purifikace rekombinantního proteinu His-PLD tedy musí být dále optimalizována. Přepokládaná molekulová hmotnost rekombinantního proteinu His-PLD je 98,6 kDa. Molekulová hmotnost samotného proteinu PLD je 91,8 kDa a 6xHis-Tagu je to 0,8 kDa. V gelu je pozorován jeden pás, který odpovídá molekulové hmotnosti His-PLD. Tato informace potvrzuje, že došlo k tvorbě cílového proteinu. Jelikož byly frakce rekombinantních proteinů His-PLD a GST-MAPK6 omylem smíchány, tak je gelu pozorován jeden silný

pás, který odpovídá velikosti rekombinantního proteinu GST-MAPK6 (zhruba 71 kDa) (Obr. 8).



Obrázek 8: Výsledek afinitní purifikace His-PLD vizualizovaný pomocí SDS-PAGE a barvení coomassie brilliant blue. (M) proteinový marker, (1) supernatant, (2) flow through, (3) eluce frakce 1, (4) eluce frakce 2, (5) eluce frakce 3, (6) eluce frakce 4, (7) eluce frakce 5, (8) eluce frakce 6, (9) afinitní kuličky. Černá šipka značí výskyt rekombinantního proteinu His-PLD, velikost proteinu je 98,6 kDa.

Úspěšně jsme připravily všechny rekombinantní proteiny. Dané rekombinantní proteiny se podařilo purifikovat, kromě jednoho (His-PLD), u kterého nedošlo k úspěšné afinitní purifikaci a jeho zakoncentrování. V případě přípravy His-PLD bude potřeba do budoucna optimalizovat metodu purifikace se zaměřením na použité afinitní kuličky a druh extrakčních a elučních médií. Pro potvrzení správnosti připravených produktů byla použita metoda imunoblotování se specifickou protilátkou.

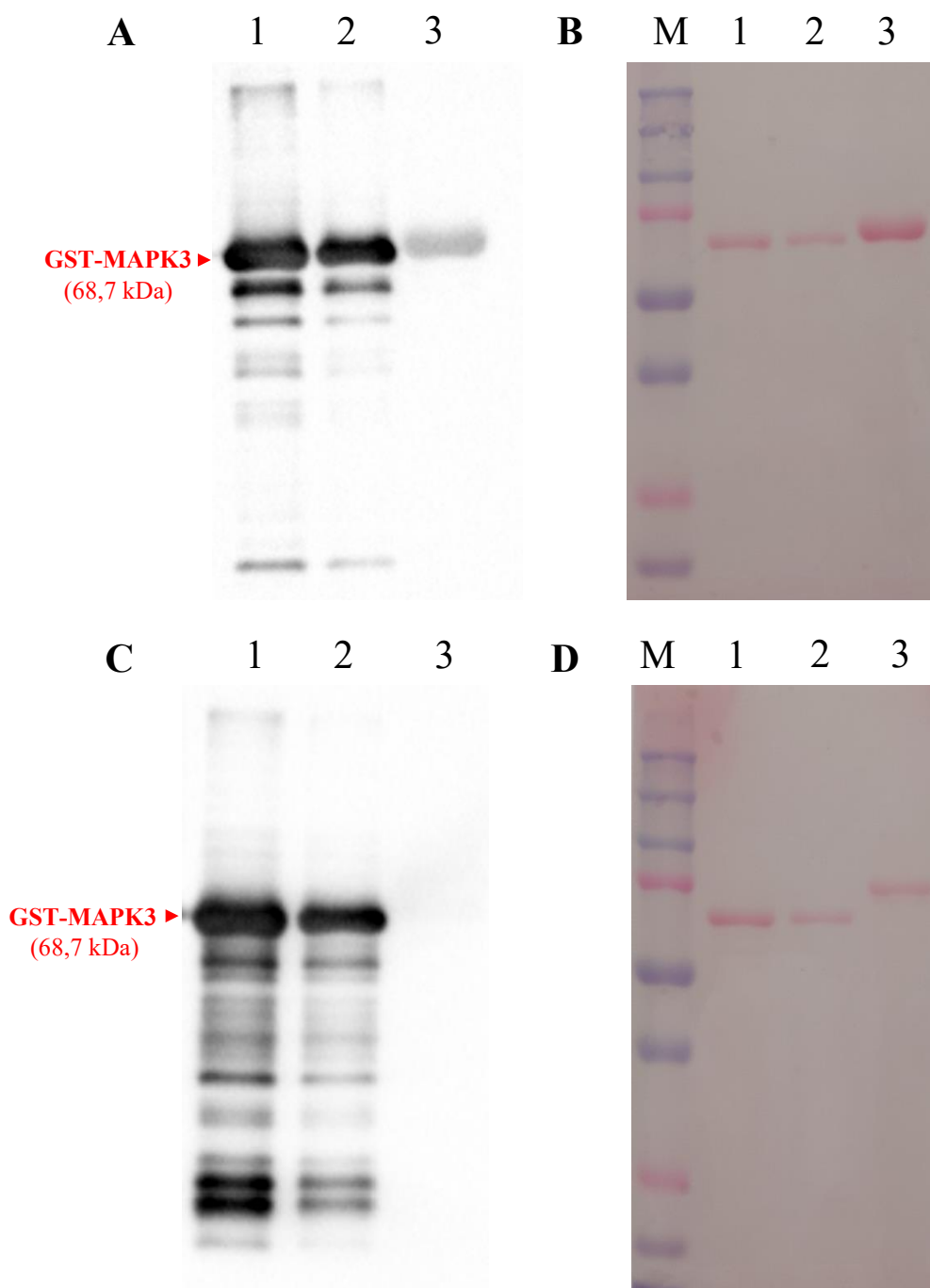
4.3 Ověření specifity připravených rekombinantních proteinů pomocí metody imunoblotování

Za účelem ověření specifity a správnosti připravených proteinů byla provedena SDS-PAGE a následné imunoblotování pomocí specifických primárních protilátek, které rozpoznávaly buďto připravený cílový protein anebo afinitní kotvu, která je u rekombinantních proteinů přítomna.

V případě přípravy rekombinantního proteinu GST-MAPK3 byla využita protilátka rozpoznávající přímo MAPK3 (anti-atMAPK3) a protilátka rozpoznávající GST kotvu (anti-GST). Získané výsledky potvrdily výskyt MAPK3 jakožto součást GST-MAPK3 rekombinantního proteinu (Obr. X7).

Bylo provedeno imunoblotování s anti-MAPK3 primární protilátkou. Porovnáním membrán Obr.X7A a Obr.X7B bylo možné potvrdit, že primární protilátka anti-MAPK3 se navázala hlavně na požadovaný rekombinantní protein GST-MAPK3. Jako negativní kontrola (sloupec A3) byl použit vzorek obsahující protein GST-MAPK6. Primární protilátka se navázala taktéž na tuto kontrolu, protože proteinu GST-MAPK6 bylo ve vzorku velké množství, nicméně signál je výrazně slabší v porovnání se sloupci A1 a A2 (Obr. 9A) a lze ho tedy považovat za méně specifický nebo přímo nespecifický. Vzniklý hlavní pás odpovídá velikosti cílového proteinu GST-MAPK3 (zhruba 68,7 kDa; Obr. 9A a 9B) a další pásy, které se vyskytují pod ním, jsou různé nespecifity nebo částečně vzniklé nedokončené proteiny (Obr. 9A). To je taktéž potvrzeno nepřítomností těchto pásů u kontroly obsahující GST-MAPK6 (Obr. X7A).

Za stejným účelem bylo taktéž provedeno imunoblotování s anti-GST primární protilátkou. Výsledky poskytnuté použitím anti-GST protilátky nebyly tak jednoznačné, jak v případě využití anti-MAPK3 protilátky. Nejsilněji vypadající pás odpovídal velikosti cílovému GST-MAPK3 proteinu (zhruba 68,7 kDa; Obr. 9C a 9D), nicméně membrána obsahuje velké množství pásů, které jsou s největší pravděpodobností částkové proteiny (proteiny, u kterých byla dokončena zcela syntéza na ribozomech) GST-MAPK3, které byly v bakterii taktéž přítomny v době lýze buněk. Tento jev je velmi častý, je-li použita N-terminální fúzní kotva. Tato interpretace je taktéž podpořena nepřítomností těchto pásů u negativní kontroly, u které byl využit extrakt z MBP fúzovaného proteinu. U této kontroly není přítomný žádný pás, potvrzující specifitu použité protilátky (Obr. 9C).

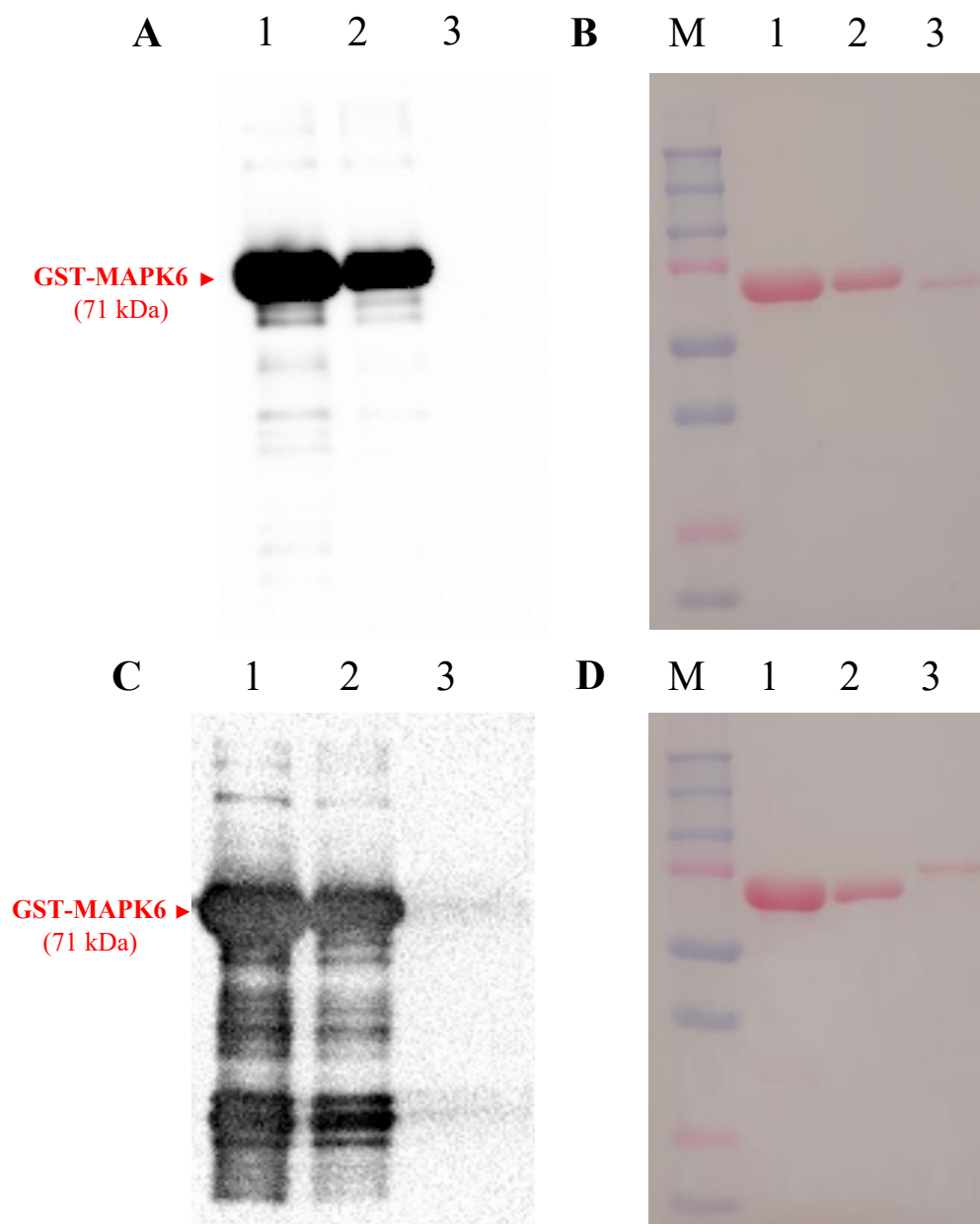


Obrázek 9: Výsledek imunoblotování se specifickými protilátkami pro připravený rekombinantní protein GST-MAPK3. A: Analýza pomocí anti-MAPK3 primární protilátky. (1) frakce 5 obsahující domnělou GST-MAPK3, (2) frakce 6 obsahující domnělou GST-MAPK3 (3) negativní kontrola obsahující GST-MAPK6. B: Kontrola nanášky proteinu pomocí obarvení membrány Ponceau S. C: Analýza pomocí anti-GST primární protilátky. (1) frakce 5 obsahující domnělou GST-MAPK3, (2) šestá frakce, (3) negativní kontrola obsahující MBP-Tag. D: Kontrola nanášky proteinu pomocí obarvení membrány Ponceau S.

V případě přípravy rekombinantního proteinu GST-MAPK6 byla využita protilátka rozpoznávající přímo MAPK6 (anti-atMAPK6) a protilátka rozpoznávající GST kotvu (anti-GST). Získané výsledky potvrdily výskyt MAPK6 jakožto součást GST-MAPK6 rekombinantního proteinu (Obr. 10).

Bylo provedeno imunoblotování anti-MAPK6 primární protilátkou. Porovnáním pozitivních výsledků pásů elučních frakcí a nepřítomnosti pásů u negativní kontroly (Obr.10A) bylo možné potvrdit, že primární protilátka anti-MAPK6 se navázala hlavně na požadovaný rekombinantní protein GST-MAPK6. Vzniklý hlavní pás odpovídá velikosti cílového proteinu GST-MAPK6 (zhruba 71 kDa; Obr. 10A a 10B) a další pásy, které se vyskytují pod ním, jsou různé nespecifity nebo částečně vzniklé nedokončené proteiny (Obr. 10A).

Také proběhlo imunoblotování pomocí GST primární protilátky. I v tomto případě nebyly výsledky poskytnuté použitím anti-GST protilátky tak jednoznačné, jak v případě využití anti-MAPK6 protilátky. Hlavní pás odpovídal velikosti cílovému GST-MAPK6 proteinu (zhruba 71 kDa; Obr. 10C a 10D), nicméně membrána obsahuje velké množství pásů, které jsou s největší pravděpodobností částkové proteiny GST-MAPK6. Jelikož se neobjevily žádné pásy u negativní kontrol bylo možné potvrdit specificitu použité protilátky (Obr. 10C).



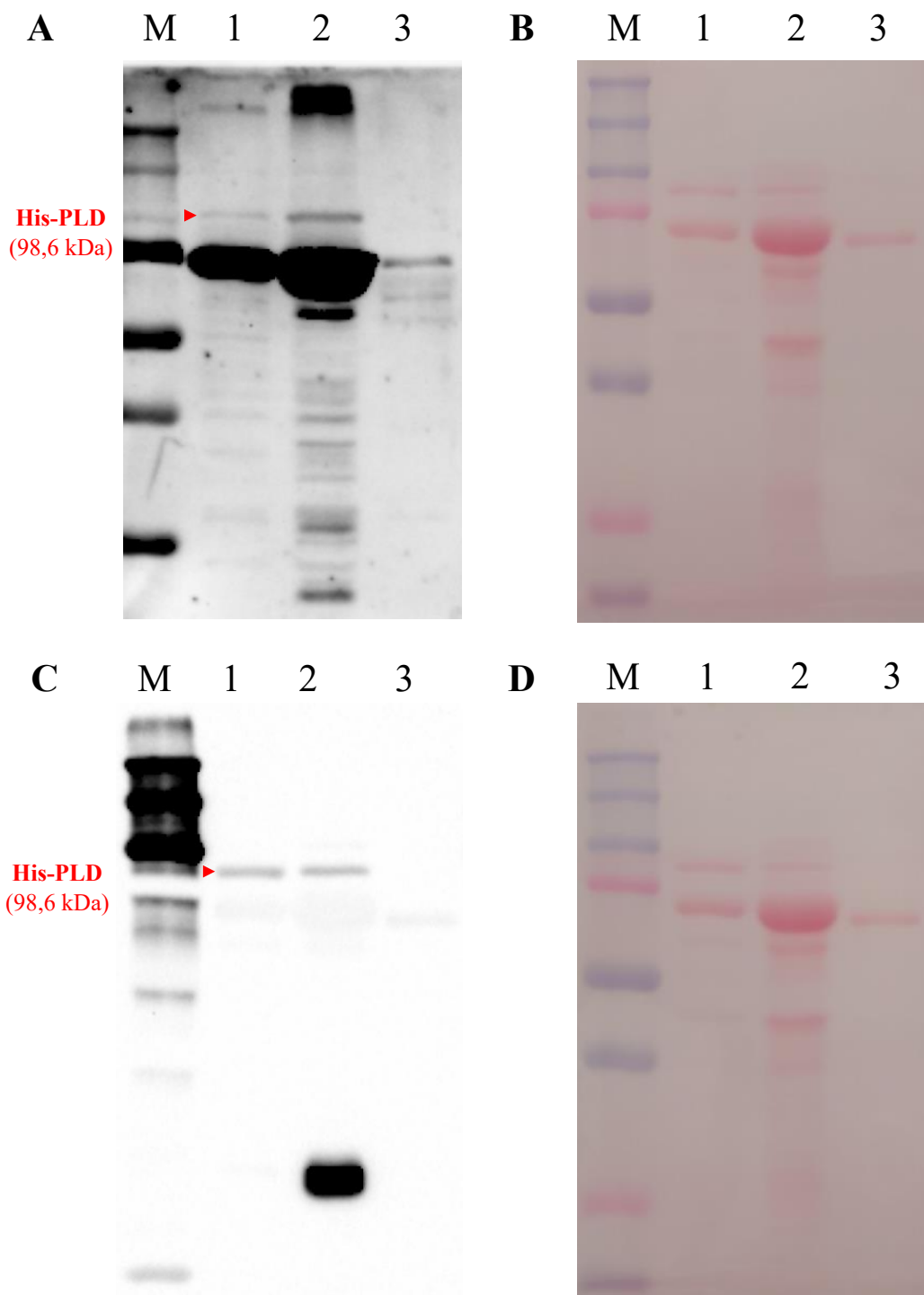
Obrázek 10: Výsledek imunoblotování se specifickými protilátkami pro připravený rekombinantní protein GST-MAPK6. A: Analýza pomocí anti-MAPK6 primární protilátky. (1) frakce 5 obsahující domnělou GST-MAPK6, (2) frakce 6 obsahující domnělou GST-MAPK6 (3) negativní kontrola obsahující GST-MAPK3. B: Kontrola nanášky proteinu pomocí obarvení membrány Ponceau S. C: Analýza pomocí anti-GST primární protilátky. (1) frakce 5 obsahující domnělou GST-MAPK6, (2) frakce 6 obsahující domnělou GST-MAPK6, (3) negativní kontrola obsahující MBP-Tag. D: Kontrola nanášky proteinu pomocí obarvení membrány Ponceau S.

V případě přípravy rekombinantního proteinu His-PLD byla využita protilátka rozpoznávající přímo PLD (anti-PLDA1/2) a protilátka rozpoznávající His kotvu (anti-His). Získané výsledky potvrdily výskyt PLD jakožto součást His-PLD rekombinantního proteinu (Obr. 11).

Imunoblotování bylo provedeno pomocí anti-PLD primární protilátky. Výsledky poskytnuté použitím anti-PLD protilátky nebyly jednoznačné (Obr. 11A). Nejsilněji vypadající pás odpovídal velikost rekombinantního proteinu GST-MAPK6 (zhruba 71 kDa; Obr. 11A a 11B). Na membráně se vyskytoval jeden slabý pás, který odpovídal velikosti cílového proteinu His-PLD (zhruba 98,6 kDa; Obr. 11A a 11B). Po porovnání výsledků z eluovaných frakcí a vytvoření pásů u negativní kontroly (Obr. X9A) bylo možné konstatovat, že primární protilátka anti-PLD se nedokázala specificky navázat pouze na rekombinantní protein His-PLD.

Imunoblotování bylo taktéž provedeno s pomocí anti-His primární protilátky. Výsledky poskytnuté použitím anti-His protilátky byly oproti předchozím výsledkům jednoznačné (Obr. 11C). Po porovnání výsledků eluovaných proteinů byla potvrzena specifita anti-His protilátky, jelikož u negativní kontroly (Obr. 11C) nebyly žádné pásy. Hlavní pás vyskytující se na Obr. X9C odpovídá velikosti cílového proteinu His-PLD (zhruba 98,6 kDa). Po porovnání výsledků Obr. 11A a 11C bylo potvrzeno, že imunoblotování pomocí anti-His primární protilátky bylo více účinné než pomocí anti-PLD primární protilátky.

Pomocí imunoblotování se specifickými protilátkami jsme potvrdili přítomnost daných rekombinantních proteinů a to jak protein-specifickými tak Tag-specifickými protilátkami, které poskytují jasný důkaz o správnosti připravených rekombinantních proteinů.



Obrázek 11: Výsledek imunoblotování se specifickými protilátkami pro připravený rekombinantní protein His-PLD. A: Analýza pomocí anti-PLD primární protilátky. (1) frakce 5 obsahující domnělou His-PLD, (2) frakce 6 obsahující domnělou His-PLD, (3) negativní kontrola obsahující GST-MAPK3. B: Kontrola nanášky proteinu pomocí obarvení membrány Ponceau S. C: Analýza pomocí anti-His primární protilátky. (1) frakce 5 obsahující domnělou His-PLD, (2) frakce 6 obsahující domnělou His-PLD, (3) negativní kontrola obsahující GST-MAPK3. D: Kontrola nanášky proteinu pomocí obarvení membrány Ponceau S.

5 ZÁVĚR

V teoretické části této bakalářské práce byla vypracována literární rešerše na téma mitogenem aktivované protein kinasy (MAPK) se zaměřením na *Arabidopsis thaliana* MAPK3, MAPK6 a *Medicago sativa* SIMK. Téma fosfolipasy D (PLD) se zaměřením na PLD α 1 a propojení mezi PLD α 1 a MAPK3/MAPK6. Nakonec bylo vypracováno téma přípravy rekombinantních proteinů.

V praktické části byla ověřena správnost získaných expresních vektorů pomocí restriční analýzy. Hlavním cílem byla příprava a purifikace rekombinantních proteinů GST-MAPK3, GST-MAPK6, His-PLD, MBP-SIMK a GST-SIMK pomocí afinitní chromatografie. Výsledky afinitní purifikace připravených rekombinantních proteinů byly kontrolovány pomocí SDS-PAGE a imunoblotování se specifickými protilátkami, které potvrdili přítomnost všech připravených variant rekombinantních proteinů.

Lze tedy konstatovat, že všechny dané rekombinantní proteiny se podařilo vytvořit v heterologním bakteriálním expresním systému. Kromě jednoho rekombinantního proteinu (His-PLD) se purifikace povedla u všech. V případě rekombinantního proteinu His-PLD je nutná další optimalizace metody purifikace, za účelem dostání čisté frakce tohoto proteinu. Získané rekombinantní proteiny budou následně sloužit pro zavedení a využívání metody známé jako „*in vitro* kinase assay“, díky které lze dokazovat možné fosforylace proteinu danými kinasami.

6 LITERATURA

Arisz, S. A., & Munnik, T. (2011). The salt stress-induced LPA response in *Chlamydomonas* is produced via PLA₂ hydrolysis of DGK-generated phosphatidic acid. *Journal of lipid research*, 52(11), 2012–2020. <https://doi.org/10.1194/jlr.M016873>

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(6875), 977–983. <https://doi.org/10.1038/415977a>

Aung, B., Gruber, M. Y., Amyot, L., Omari, K., Bertrand, A., & Hannoufa, A. (2015). MicroRNA156 as a promising tool for alfalfa improvement. *Plant biotechnology journal*, 13(6), 779–790. <https://doi.org/10.1111/pbi.12308>

Bai, Y., Kissoudis, C., Yan, Z., Visser, R. G. F., & van der Linden, G. (2018). Plant behaviour under combined stress: tomato responses to combined salinity and pathogen stress. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 93(4), 781–793. <https://doi.org/10.1111/tpj.13800>

Baneyx F. (1999). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current opinion in biotechnology*, 10(5), 411–421. [https://doi.org/10.1016/s0958-1669\(99\)00003-8](https://doi.org/10.1016/s0958-1669(99)00003-8)

Belaunzarán, M. L., Lammel, E. M., & de Isola, E. L. (2011). Phospholipases a in trypanosomatids. *Enzyme research*, 2011, 392082. <https://doi.org/10.4061/2011/392082>

Benhamman, R., Bai, F., Drory, S. B., Loubert-Hudon, A., Ellis, B., & Matton, D. P. (2017). The *Arabidopsis* Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 20 (MKKK20) Acts Upstream of MKK3 and MPK18 in Two Separate Signaling Pathways Involved in Root Microtubule Functions. *Frontiers in plant science*, 8, 1352. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01352>

Bora, K. S., & Sharma, A. (2011). Phytochemical and pharmacological potential of *Medicago sativa*: a review. *Pharmaceutical biology*, 49(2), 211–220. <https://doi.org/10.3109/13880209.2010.504732>

Bush, S. M., & Krysan, P. J. (2007). Mutational evidence that the *Arabidopsis* MAP kinase MPK6 is involved in anther, inflorescence, and embryo development. *Journal of experimental botany*, 58(8), 2181–2191. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm092>

Camoni, L., Di Lucente, C., Pallucca, R., Visconti, S., & Aducci, P. (2012). Binding of phosphatidic acid to 14-3-3 proteins hampers their ability to activate the plant plasma membrane H⁺-ATPase. *IUBMB life*, 64(8), 710–716. <https://doi.org/10.1002/iub.1058>

Cardinale, F., Jonak, C., Ligterink, W., Niehaus, K., Boller, T., & Hirt, H. (2000). Differential activation of four specific MAPK pathways by distinct elicitors. *The Journal of biological chemistry*, 275(47), 36734–36740. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007418200>

Couturier, M., Bex, F., Bergquist, P. L., & Maas, W. K. (1988). Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiological reviews*, 52(3), 375–395. <https://doi.org/10.1128/mr.52.3.375-395.1988>

Danquah, A., de Zélicourt, A., Boudsocq, M., Neubauer, J., Frei Dit Frey, N., Leonhardt, N., Pateyron, S., Gwinner, F., Tamby, J. P., Ortiz-Masia, D., Marcote, M. J., Hirt, H., & Colcombet, J. (2015). Identification and characterization of an ABA-activated MAP kinase cascade in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 82(2), 232–244. <https://doi.org/10.1111/tpj.12808>

Ding, Y., Shi, Y., & Yang, S. (2020). Molecular Regulation of Plant Responses to Environmental Temperatures. *Molecular plant*, 13(4), 544–564. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.02.004>

- Donaldson J. G. (2009). Phospholipase D in endocytosis and endosomal recycling pathways. *Biochimica et biophysica acta*, 1791(9), 845–849. <https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2009.05.011>
- Evrard, A., Kumar, M., Lecourieux, D., Lucks, J., von Koskull-Döring, P., & Hirt, H. (2013). Regulation of the heat stress response in Arabidopsis by MPK6-targeted phosphorylation of the heat stress factor HsfA2. *PeerJ*, 1, e59. <https://doi.org/10.7717/peerj.59>
- Fan, L., Zheng, S., Cui, D., & Wang, X. (1999). Subcellular distribution and tissue expression of phospholipase Dalpha, Dbeta, and Dgamma in Arabidopsis. *Plant physiology*, 119(4), 1371–1378. <https://doi.org/10.1104/pp.119.4.1371>
- Fanger, G. R., Gerwins, P., Widmann, C., Jarpe, M. B., & Johnson, G. L. (1997). MEKKs, GCKs, MLKs, PAKs, TAKs, and tpls: upstream regulators of the c-Jun amino-terminal kinases?. *Current opinion in genetics & development*, 7(1), 67-74. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(97\)80111-6](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(97)80111-6)
- Feilner, T., Hultschig, C., Lee, J., Meyer, S., Immink, R. G., Koenig, A., Possling, A., Seitz, H., Beveridge, A., Scheel, D., Cahill, D. J., Lehrach, H., Kreuzberger, J., & Kersten, B. (2005). High throughput identification of potential Arabidopsis mitogen-activated protein kinases substrates. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 4(10), 1558–1568. <https://doi.org/10.1074/mcp.M500007-MCP200>
- Ferrer-Miralles, N., Saccardo, P., Corchero, J. L., Xu, Z., & García-Fruitós, E. (2015). General introduction: recombinant protein production and purification of insoluble proteins. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1258, 1–24. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2205-5_1
- Forzani, C., Carreri, A., de la Fuente van Bentem, S., Lecourieux, D., Lecourieux, F., & Hirt, H. (2011). The Arabidopsis protein kinase Pto-interacting 1-4 is a common target of the oxidative signal-inducible 1 and mitogen-activated protein kinases. *The FEBS journal*, 278(7), 1126–1136. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08033.x>
- Fujita, M., Fujita, Y., Noutoshi, Y., Takahashi, F., Narusaka, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2006). Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current opinion in plant biology*, 9(4), 436–442. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.05.014>
- Galletti, R., Ferrari, S., & De Lorenzo, G. (2011). Arabidopsis MPK3 and MPK6 play different roles in basal and oligogalacturonide- or flagellin-induced resistance against Botrytis cinerea. *Plant physiology*, 157(2), 804–814. <https://doi.org/10.1104/pp.111.174003>
- Gao, M., Liu, J., Bi, D., Zhang, Z., Cheng, F., Chen, S., & Zhang, Y. (2008). MEKK1, MKK1/MKK2 and MPK4 function together in a mitogen-activated protein kinase cascade to regulate innate immunity in plants. *Cell research*, 18(12), 1190–1198. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.300>
- Guan, Y., Lu, J., Xu, J., McClure, B., & Zhang, S. (2014b). Two Mitogen-Activated Protein Kinases, MPK3 and MPK6, Are Required for Funicular Guidance of Pollen Tubes in Arabidopsis. *Plant physiology*, 165(2), 528–533. <https://doi.org/10.1104/pp.113.231274>
- Guan, Y., Meng, X., Khanna, R., LaMontagne, E., Liu, Y., & Zhang, S. (2014a). Phosphorylation of a WRKY transcription factor by MAPKs is required for pollen development and function in Arabidopsis. *PLoS genetics*, 10(5), e1004384. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004384>
- Hayat, S. M. G., Farahani, N., Golichenari, B., & Sahebkar, A. (2018). Recombinant Protein Expression in Escherichia coli (E.coli): What We Need to Know. *Current pharmaceutical design*, 24(6), 718–725. <https://doi.org/10.2174/1381612824666180131121940>

Hong, Y., Pan, X., Welti, R., & Wang, X. (2008). Phospholipase D α 3 is involved in the hyperosmotic response in Arabidopsis. *The Plant cell*, 20(3), 803–816. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.056390>

Hong, Y., Zhao, J., Guo, L., Kim, S. C., Deng, X., Wang, G., Zhang, G., Li, M., & Wang, X. (2016). Plant phospholipases D and C and their diverse functions in stress responses. *Progress in lipid research*, 62, 55–74. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2016.01.002>

Hou, Q., Ufer, G., & Bartels, D. (2016). Lipid signalling in plant responses to abiotic stress. *Plant, cell & environment*, 39(5), 1029–1048. <https://doi.org/10.1111/pce.12666>

Hrbáčková, M., Luptovčíak, I., Hlaváčková, K., Dvořák, P., Tichá, M., Šamajová, O., Novák, D., Bednarz, H., Niehaus, K., Ovečka, M., & Šamaj, J. (2021). Overexpression of alfalfa SIMK promotes root hair growth, nodule clustering and shoot biomass production. *Plant biotechnology journal*, 19(4), 767–784. <https://doi.org/10.1111/pbi.13503>

Huo, C., Zhang, B., Wang, H., Wang, F., Liu, M., Gao, Y., Zhang, W., Deng, Z., Sun, D., & Tang, W. (2016). Comparative Study of Early Cold-Regulated Proteins by Two-Dimensional Difference Gel Electrophoresis Reveals a Key Role for Phospholipase D α 1 in Mediating Cold Acclimation Signaling Pathway in Rice. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 15(4), 1397–1411. <https://doi.org/10.1074/mcp.M115.049759>

Champeyroux, C., Stoof, C., & Rodriguez-Villalon, A. (2020). Signaling phospholipids in plant development: small couriers determining cell fate. *Current opinion in plant biology*, 57, 61–71. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2020.05.007>

Chen, G., Snyder, C. L., Greer, M. S., & Weselake, R. J. (2011). Biology and biochemistry of plant phospholipases. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 30(3), 239–258. <https://doi.org/10.1080/07352689.2011.572033>

Chen R. (2012). Bacterial expression systems for recombinant protein production: E. coli and beyond. *Biotechnology advances*, 30(5), 1102–1107. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.013>

Chinnusamy, V., Ohta, M., Kanrar, S., Lee, B. H., Hong, X., Agarwal, M., & Zhu, J. K. (2003). ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in Arabidopsis. *Genes & development*, 17(8), 1043–1054. <https://doi.org/10.1101/gad.1077503>

Chisholm, S. T., Coaker, G., Day, B., & Staskawicz, B. J. (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, 124(4), 803–814. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.008>

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., and Walker, J.C. (2002). Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends in plant science*, 7(7), 301–308. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(02\)02302-6](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(02)02302-6)

Ishiguro, S., Kawai-Oda, A., Ueda, J., Nishida, I., & Okada, K. (2001). The DEFECTIVE IN ANTHHER DEHISCENCE gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in Arabidopsis. *The Plant cell*, 13(10), 2191–2209. <https://doi.org/10.1105/tpc.010192>

Jagodzik, P., Tajdel-Zielinska, M., Ciesla, A., Marczak, M., & Ludwikow, A. (2018). Mitogen-Activated Protein Kinase Cascades in Plant Hormone Signaling. *Frontiers in plant science*, 9, 1387. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01387>

Jia, W., Li, B., Li, S., Liang, Y., Wu, X., Ma, M., Wang, J., Gao, J., Cai, Y., Zhang, Y., Wang, Y., Li, J., & Wang, Y. (2016). Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade MKK7-MPK6 Plays

Important Roles in Plant Development and Regulates Shoot Branching by Phosphorylating PIN1 in Arabidopsis. *PLoS biology*, 14(9), e1002550. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002550>

Jin, H., Axtell, M. J., Dahlbeck, D., Ekwenna, O., Zhang, S., Staskawicz, B., & Baker, B. (2002). NPK1, an MEKK1-like mitogen-activated protein kinase kinase kinase, regulates innate immunity and development in plants. *Developmental cell*, 3(2), 291–297. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(02\)00205-8](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(02)00205-8)

Jonak, C., Okrész, L., Bögre, L., & Hirt, H. (2002). Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling. *Current opinion in plant biology*, 5(5), 415–424. [https://doi.org/10.1016/s1369-5266\(02\)00285-6](https://doi.org/10.1016/s1369-5266(02)00285-6)

Jones, J. D., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>

Kiegerl, S., Cardinale, F., Siligan, C., Gross, A., Baudouin, E., Liwosz, A., Eklöf, S., Till, S., Bögre, L., Hirt, H., & Meskiene, I. (2000). SIMKK, a mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase, is a specific activator of the salt stress-induced MAPK, SIMK. *The Plant cell*, 12(11), 2247–2258. <https://doi.org/10.1105/tpc.12.11.2247>

Kim, S. C., Guo, L., & Wang, X. (2013). Phosphatidic acid binds to cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and promotes its cleavage in Arabidopsis. *The Journal of biological chemistry*, 288(17), 11834–11844. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.427229>

Kim, S. H., Kim, H. S., Bahk, S., An, J., Yoo, Y., Kim, J. Y., & Chung, W. S. (2017). Phosphorylation of the transcriptional repressor MYB15 by mitogen-activated protein kinase 6 is required for freezing tolerance in Arabidopsis. *Nucleic acids research*, 45(11), 6613–6627. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx417>

Kim, S. H., Woo, D. H., Kim, J. M., Lee, S. Y., Chung, W. S., & Moon, Y. H. (2011). Arabidopsis MKK4 mediates osmotic-stress response via its regulation of MPK3 activity. *Biochemical and biophysical research communications*, 412(1), 150–154. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.07.064>

Komis, G., Šamajová, O., Ovečka, M., & Šamaj, J. (2018). Cell and Developmental Biology of Plant Mitogen-Activated Protein Kinases. *Annual review of plant biology*, 69, 237–265. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040314>

Krčková, Z., Brouzdová, J., Daněk, M., Kocourková, D., Rainteau, D., Ruelland, E., Valentová, O., Pejchar, P., & Martinec, J. (2015). Arabidopsis non-specific phospholipase C1: characterization and its involvement in response to heat stress. *Frontiers in plant science*, 6, 928. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00928>

Lee, H. Y., Bahn, S. C., Kang, Y. M., Lee, K. H., Kim, H. J., Noh, E. K., Palta, J. P., Shin, J. S., & Ryu, S. B. (2003). Secretory low molecular weight phospholipase A2 plays important roles in cell elongation and shoot gravitropism in Arabidopsis. *The Plant cell*, 15(9), 1990–2002. <https://doi.org/10.1105/tpc.014423>

Lee, J. S., & Ellis, B. E. (2007). Arabidopsis MAPK phosphatase 2 (MKP2) positively regulates oxidative stress tolerance and inactivates the MPK3 and MPK6 MAPKs. *The Journal of biological chemistry*, 282(34), 25020–25029. <https://doi.org/10.1074/jbc.M701888200>

Lee, S., Hirt, H., & Lee, Y. (2001). Phosphatidic acid activates a wound-activated MAPK in *Glycine max*. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 26(5), 479–486. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2001.01037.x>

Li, M., Hong, Y., & Wang, X. (2009). Phospholipase D- and phosphatidic acid-mediated signaling in plants. *Biochimica et biophysica acta*, 1791(9), 927–935. <https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2009.02.017>

Liu, Y., Schiff, M., & Dinesh-Kumar, S. P. (2004). Involvement of MEK1 MAPKK, NTF6 MAPK, WRKY/MYB transcription factors, COI1 and CTR1 in N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 38(5), 800–809. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02085.x>

Liu, Y., & Zhang, S. (2004). Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in Arabidopsis. *The Plant cell*, 16(12), 3386–3399. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.026609>

Lumbreras, V., Vilela, B., Irar, S., Solé, M., Capellades, M., Valls, M., Coca, M., & Pagès, M. (2010). MAPK phosphatase MKP2 mediates disease responses in Arabidopsis and functionally interacts with MPK3 and MPK6. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 63(6), 1017–1030. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04297.x>

Meng, X., & Zhang, S. (2013). MAPK cascades in plant disease resistance signaling. *Annual review of phytopathology*, 51, 245–266. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102314>

Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V. B., Vandepoele, K., Gollery, M., Shulaev, V., & Van Breusegem, F. (2011). ROS signaling: the new wave?. *Trends in plant science*, 16(6), 300–309. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.03.007>

Müller, J., Beck, M., Mettbach, U., Komis, G., Hause, G., Menzel, D., & Samaj, J. (2010). Arabidopsis MPK6 is involved in cell division plane control during early root development, and localizes to the pre-prophase band, phragmoplast, trans-Golgi network and plasma membrane. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 61(2), 234–248. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.04046.x>

Munnik, T., Ligterink, W., Meskiene, I., Calderini, O., Beyerly, J., Musgrave, A., & Hirt, H. (1999). Distinct osmo-sensing protein kinase pathways are involved in signalling moderate and severe hyper-osmotic stress. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 20(4), 381–388. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1999.00610.x>

Novák, D., Vadovič, P., Ovečka, M., Šamajová, O., Komis, G., Colcombet, J., & Šamaj, J. (2018). Gene Expression Pattern and Protein Localization of Arabidopsis Phospholipase D Alpha 1 Revealed by Advanced Light-Sheet and Super-Resolution Microscopy. *Frontiers in plant science*, 9, 371. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00371>

O'Brien, J. A., Daudi, A., Butt, V. S., & Bolwell, G. P. (2012). Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. *Planta*, 236(3), 765–779. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1696-9>

Ovečka, M., Takáč, T., Komis, G., Vadovič, P., Bekešová, S., Doskočilová, A., Šamajová, V., Luptovčiak, I., Samajová, O., Schweighofer, A., Meskiene, I., Jonak, C., Křenek, P., Lichtscheidl, I., Škultéty, L., Hirt, H., & Šamaj, J. (2014). Salt-induced subcellular kinase relocation and seedling susceptibility caused by overexpression of Medicago SIMKK in Arabidopsis. *Journal of experimental botany*, 65(9), 2335–2350. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru115>

Pejchar, P., Potocký, M., Krčková, Z., Brouzdová, J., Daněk, M., & Martinec, J. (2015). Non-specific phospholipase C4 mediates response to aluminum toxicity in Arabidopsis thaliana. *Frontiers in plant science*, 6, 66. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00066>

Peters, C., Li, M., Narasimhan, R., Roth, M., Welti, R., & Wang, X. (2010). Nonspecific phospholipase C NPC4 promotes responses to abscisic acid and tolerance to hyperosmotic stress in Arabidopsis. *The Plant cell*, 22(8), 2642–2659. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.071720>

Pitzschke, A., Datta, S., & Persak, H. (2014). Salt stress in Arabidopsis: lipid transfer protein AZI1 and its control by mitogen-activated protein kinase MPK3. *Molecular plant*, 7(4), 722–738. <https://doi.org/10.1093/mp/sst157>

- Pitzschke A. (2015). Modes of MAPK substrate recognition and control. *Trends in plant science*, 20(1), 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.09.006>
- Pleskot, R., Li, J., Zárský, V., Potocký, M., & Staiger, C. J. (2013). Regulation of cytoskeletal dynamics by phospholipase D and phosphatidic acid. *Trends in plant science*, 18(9), 496–504. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.04.005>
- Pohl, S., & Harwood, C. R. (2010). Heterologous protein secretion by bacillus species from the cradle to the grave. *Advances in applied microbiology*, 73, 1–25. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(10\)73001-X](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(10)73001-X)
- Potocký, M., Eliás, M., Profotová, B., Novotná, Z., Valentová, O., & Zárský, V. (2003). Phosphatidic acid produced by phospholipase D is required for tobacco pollen tube growth. *Planta*, 217(1), 122–130. <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0965-4>
- Rentel, M. C., Lecourieux, D., Ouaked, F., Usher, S. L., Petersen, L., Okamoto, H., Knight, H., Peck, S. C., Grierson, C. S., Hirt, H., & Knight, M. R. (2004). OXII kinase is necessary for oxidative burst-mediated signalling in Arabidopsis. *Nature*, 427(6977), 858–861. <https://doi.org/10.1038/nature02353>
- Repp, A., Mikami, K., Mittmann, F., & Hartmann, E. (2004). Phosphoinositide-specific phospholipase C is involved in cytokinin and gravity responses in the moss Physcomitrella patens. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 40(2), 250–259. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02205.x>
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. *Frontiers in microbiology*, 5, 172. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>
- Samaj, J., Ovečka, M., Hlavacka, A., Lecourieux, F., Meskiene, I., Lichtscheidl, I., Lenart, P., Salaj, J., Volkmann, D., Bögre, L., Baluska, F., & Hirt, H. (2002). Involvement of the mitogen-activated protein kinase SIMK in regulation of root hair tip growth. *The EMBO journal*, 21(13), 3296–3306. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf349>
- Selvy, P. E., Lavieri, R. R., Lindsley, C. W., & Brown, H. A. (2011). Phospholipase D: enzymology, functionality, and chemical modulation. *Chemical reviews*, 111(10), 6064–6119. <https://doi.org/10.1021/cr200296t>
- Scherer, G. F., Labusch, C., & Effendi, Y. (2012). Phospholipases and the Network of Auxin Signal Transduction with ABP1 and TIR1 as Two Receptors: A Comprehensive and Provocative Model. *Frontiers in plant science*, 3, 56. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00056>
- Sinha, A. K., Jaggi, M., Raghuram, B., & Tuteja, N. (2011). Mitogen-activated protein kinase signaling in plants under abiotic stress. *Plant signaling & behavior*, 6(2), 196–203. <https://doi.org/10.4161/psb.6.2.14701>
- Smékalová, V., Doskočilová, A., Komis, G., & Samaj, J. (2014b). Crosstalk between secondary messengers, hormones and MAPK modules during abiotic stress signalling in plants. *Biotechnology advances*, 32(1), 2–11. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.07.009>
- Smékalová, V., Luptovčíak, I., Komis, G., Šamajová, O., Ovečka, M., Doskočilová, A., Takáč, T., Vadovič, P., Novák, O., Pechan, T., Ziemann, A., Košútová, P., & Šamaj, J. (2014a). Involvement of YODA and mitogen activated protein kinase 6 in Arabidopsis post-embryonic root development through auxin up-regulation and cell division plane orientation. *The New phytologist*, 203(4), 1175–1193. <https://doi.org/10.1111/nph.12880>
- Suzuki, N., Koussevitzky, S., Mittler, R., & Miller, G. (2012). ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant, cell & environment*, 35(2), 259–270. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02336.x>

- Takáč, T., Novák, D., & Šamaj, J. (2019b). Recent Advances in the Cellular and Developmental Biology of Phospholipases in Plants. *Frontiers in plant science*, *10*, 362. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00362>
- Takáč, T., Pechan, T., Šamajová, O., & Šamaj, J. (2019a). Proteomic Analysis of Arabidopsis *plda1* Mutants Revealed an Important Role of Phospholipase D Alpha 1 in Chloroplast Biogenesis. *Frontiers in plant science*, *10*, 89. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00089>
- Takáč, T., Šamajová, O., Vadovič, P., Pechan, T., & Šamaj, J. (2018). Shot-Gun Proteomic Analysis on Roots of Arabidopsis *plda1* Mutants Suggesting the Involvement of PLD α 1 in Mitochondrial Protein Import, Vesicular Trafficking and Glucosinolate Biosynthesis. *International journal of molecular sciences*, *20*(1), 82. <https://doi.org/10.3390/ijms20010082>
- Takáč, T., Vadovič, P., Pechan, T., Luptovčiak, I., Šamajová, O., & Šamaj, J. (2016). Comparative proteomic study of Arabidopsis mutants *mpk4* and *mpk6*. *Scientific reports*, *6*, 28306. <https://doi.org/10.1038/srep28306>
- Teige, M., Scheikl, E., Eulgem, T., Dóczi, R., Ichimura, K., Shinozaki, K., Dangl, J. L., & Hirt, H. (2004). The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in Arabidopsis. *Molecular cell*, *15*(1), 141–152. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.06.023>
- Tena, G., Asai, T., Chiu, W. L., & Sheen, J. (2001). Plant mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Current opinion in plant biology*, *4*(5), 392–400. [https://doi.org/10.1016/s1369-5266\(00\)00191-6](https://doi.org/10.1016/s1369-5266(00)00191-6)
- Tripathi, N.K. (2016). Production and Purification of Recombinant Proteins from Escherichia coli. *ChemBioEng Reviews*, *3*, 116-133. <https://doi.org/10.1002/cben.201600002>
- Uraji, M., Katagiri, T., Okuma, E., Ye, W., Hossain, M. A., Masuda, C., Miura, A., Nakamura, Y., Mori, I. C., Shinozaki, K., & Murata, Y. (2012). Cooperative function of PLD δ and PLD α 1 in abscisic acid-induced stomatal closure in Arabidopsis. *Plant physiology*, *159*(1), 450–460. <https://doi.org/10.1104/pp.112.195578>
- Vadovič, P., Šamajová, O., Takáč, T., Novák, D., Zapletalová, V., Colcombet, J., & Šamaj, J. (2019). Biochemical and Genetic Interactions of Phospholipase D Alpha 1 and Mitogen-Activated Protein Kinase 3 Affect Arabidopsis Stress Response. *Frontiers in plant science*, *10*, 275. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00275>
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B., & Johnson, G. L. (1999). Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiological reviews*, *79*(1), 143–180. <https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.1.143>
- Wimalasekera, R., Pejchar, P., Holk, A., Martinec, J., & Scherer, G. F. (2010). Plant phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipases C NPC3 and NPC4 with roles in root development and brassinolide signaling in Arabidopsis thaliana. *Molecular plant*, *3*(3), 610–625. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp005>
- Yamaoka, S., Shiono, Y., Shirakawa, M., Fukao, Y., Kawase, T., Hatsugai, N., Tamura, K., Shimada, T., & Hara-Nishimura, I. (2013). Identification and dynamics of Arabidopsis adaptor protein-2 complex and its involvement in floral organ development. *The Plant cell*, *25*(8), 2958–2969. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.114082>
- Yao, H., Wang, G., Guo, L., & Wang, X. (2013). Phosphatidic acid interacts with a MYB transcription factor and regulates its nuclear localization and function in Arabidopsis. *The Plant cell*, *25*(12), 5030–5042. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.120162>
- Yu, L., Nie, J., Cao, C., Jin, Y., Yan, M., Wang, F., Liu, J., Xiao, Y., Liang, Y., & Zhang, W. (2010). Phosphatidic acid mediates salt stress response by regulation of MPK6 in Arabidopsis thaliana. *The New phytologist*, *188*(3), 762–773. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03422.x>

- Wang, G., Ryu, S., & Wang, X. (2012). Plant phospholipases: an overview. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 861, 123–137. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-600-5_8
- Wang, H., Ngwenyama, N., Liu, Y., Walker, J. C., & Zhang, S. (2007). Stomatal development and patterning are regulated by environmentally responsive mitogen-activated protein kinases in Arabidopsis. *The Plant cell*, 19(1), 63–73. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.048298>
- Zhang, Q., Lin, F., Mao, T., Nie, J., Yan, M., Yuan, M., & Zhang, W. (2012). Phosphatidic acid regulates microtubule organization by interacting with MAP65-1 in response to salt stress in Arabidopsis. *The Plant cell*, 24(11), 4555–4576. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.104182>
- Zhang, Y., Wang, P., Shao, W., Zhu, J. K., & Dong, J. (2015). The BASL polarity protein controls a MAPK signaling feedback loop in asymmetric cell division. *Developmental cell*, 33(2), 136–149. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.02.022>
- Zhang, Y., Guo, X., & Dong, J. (2016). Phosphorylation of the Polarity Protein BASL Differentiates Asymmetric Cell Fate through MAPKs and SPCH. *Current biology : CB*, 26(21), 2957–2965. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.08.066>
- Zhang, M., & Zhang, S. (2022). Mitogen-activated protein kinase cascades in plant signaling. *Journal of integrative plant biology*, 64(2), 301–341. <https://doi.org/10.1111/jipb.13215>
- Zhao J. (2015). Phospholipase D and phosphatidic acid in plant defence response: from protein-protein and lipid-protein interactions to hormone signalling. *Journal of experimental botany*, 66(7), 1721–1736. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru540>
- Zhao, C., Wang, P., Si, T., Hsu, C. C., Wang, L., Zayed, O., Yu, Z., Zhu, Y., Dong, J., Tao, W. A., & Zhu, J. K. (2017a). MAP Kinase Cascades Regulate the Cold Response by Modulating ICE1 Protein Stability. *Developmental cell*, 43(5), 618–629.e5. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.09.024>
- Zhao, F., Zheng, Y. F., Zeng, T., Sun, R., Yang, J. Y., Li, Y., Ren, D. T., Ma, H., Xu, Z. H., & Bai, S. N. (2017b). Phosphorylation of SPOROCTELESS/NOZZLE by the MPK3/6 Kinase Is Required for Anther Development. *Plant physiology*, 173(4), 2265–2277. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01765>
- Zhou, H., Xiao, F., Zheng, Y., Liu, G., Zhuang, Y., Wang, Z., Zhang, Y., He, J., Fu, C., & Lin, H. (2022a). PAMP-INDUCED SECRETED PEPTIDE 3 modulates salt tolerance through RECEPTOR-LIKE KINASE 7 in plants. *The Plant cell*, 34(2), 927–944. <https://doi.org/10.1093/plcell/koab292>
- Zhou, Y., Zhou, D. M., Yu, W. W., Shi, L. L., Zhang, Y., Lai, Y. X., Huang, L. P., Qi, H., Chen, Q. F., Yao, N., Li, J. F., Xie, L. J., & Xiao, S. (2022b). Phosphatidic acid modulates MPK3- and MPK6-mediated hypoxia signaling in Arabidopsis. *The Plant cell*, 34(2), 889–909. <https://doi.org/10.1093/plcell/koab289>
- Zhu J. K. (2016). Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. *Cell*, 167(2), 313–324. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.029>

7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ABA	kyselina abscisová
AMP	ampicilin
APS	peroxodisíran amonný
CBF	z angl. C-repeat-binding factors
ICE1	CBF exprese 1
CDK	cyklin-dependentní kinasy
CLK	CDK-like kinasa
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ETI	efektorem spuštěná imunita
GSK3	glykogen syntáza kinasa 3
GST	Glutathion-S-transferasa
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
JA	kyselina jasmínová
LB	médium pro kultivaci bakterií (z angl. Lysogeny broth)
<i>M. sativa</i>	<i>Medicago sativa L.</i>
MAMP	molekulárních vzory asociované s mikroblem
MAPK	mitogen aktivovaná protein kinasa
MAPKK	mitogen aktivovaná protein kinasa kinasa
MAPKKK	mitogen aktivovaná protein kinasa kinasa kinasa
MAPKKKK	mitogen aktivovaná protein kinasa kinasa kinasa kinasa
MBP	z angl. Maltose-binding protein
MEK	mitogen aktivovaná protein kinasa kinasa
MEKK	mitogen aktivovaná protein kinasa kinasa kinasa
MIP	z angl. maximum intensity projection
MKK	mitogen aktivovaná protein kinasa kinasa
MMK	Medicago MAPK
MPK	mitogen aktivovaná protein kinasa
OD600	optická hustota při 600 nm
PA	kyselina fosfatidová

PAMP	molekulárních vzory asociované s patogenem
PBS	fosfátový pufr (z angl. Phosphate Buffered Saline)
PIN1	z angl. peptidyl-prolyl cis/trans isomerase
PIP3	z angl. Amp induced secreted peptide 3
PL	fosfolipasa
PMSF	fenylmethylsulfonyl fluorid
PTI	vzorem spuštěná imunita
RLK7	z angl. Receptor like kinase 7
RNAi	RNA interference
ROS	reaktivní formy kyslíku
SAMK	stress-activated MAPK
SDS	dodecylsírán sodný
SIM	Mikroskopie se strukturovaným osvětlením
SIMK	salt-induced MAPK
SIMKK	SIMK kinasa
SOC	z angl. Super Optimal Broth
SPL	z angl. SQUAMOSA promoter-binding protein-like
TEMED	isopropanol, N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
TRIS	tris(hydroxymetyl)aminometan
WRKY	transkripční faktory (pojmenované podle heptapeptidu WRKYGQK)