

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Príprava vybraných dvojitéch mutantných rastlín**

*Arabidopsis thaliana* krížením

## **BAKALÁRSKA PRÁCA**

Autor:	<b>Kristína Tocíková</b>
Študijný program:	B1406 Biochemie
Študijný odbor:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma štúdia:	Prezenčná
Vedúci práce:	<b>Mgr. Dominik Novák</b>
Rok:	2018

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne s vyznačením všetkých použitých prameňov a spoluautorstva. Súhlasím so zverejnením bakalárskej práce podľa zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, v znení neskorších predpisov. Bola som zoznámená s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, v znení neskorších predpisov.

V Olomouci dňa

.....

## **Pod'akovanie**

Týmto smerom by som rada poďakovala môjmu školiteľovi Mgr. Dominikovi Novákovi, za jeho čas, trpezlivosť a pomoc behom vypracovania experimentálnej i teoretickej časti tejto bakalárskej práce a za jeho podporu počas celého štúdia. Ďalej by som sa rada poďakovala celému oddeleniu bunkovej biológie Centra regiónu Haná za poskytnutie prostriedkov a možnosť zhotovenia a vypracovanie experimentálnej časti bakalárskej práce a za priateľské prostredie, či ochotu pomôcť.

Táto práca bola podporená Grantovou agentúrou Českej Republiky (GAČR), GA16-22044S, Funkčná regulácia fosfolipázy D alfa 1 prostredníctvom MPK3 závislej fosforylácie.

## Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora	Kristína Tocíková
Názov práce	Príprava vybraných dvojitéch mutantných rastlín <i>Arabidopsis thaliana</i> krížením
Typ práce	Bakalárska práca
Vedúci práce	Mgr. Dominik Novák
Rok obhajoby práce	2018

### Abstrakt

Teoretická časť bakalárskej práce je zameraná na organizáciu a reguláciu signálnej kaskády mitogen-aktivovaných proteínkináz, ktorá sa skladá z troch typov reverzibilne fosforylovaných kináz. Mitogen-aktivovaná proteínkináza 3 (MPK3) ako súčasť tejto kaskády má dôležitú úlohu v obrannej signalizácii a je zapojená do biotických a abiotických stresových odpovedí. Táto časť práce takisto popisuje úlohu fosfolipáz, ktoré sú súčasťou všetkých biologických membrán. Medzi fosfolipázy patrí fosfolipáza D alfa (PLD $\alpha$ ), ktorá hrá rôzne úlohy v eukaryotických organizmoch ako napríklad cytoskeletálna remodelácia, či regulácia stomatálneho uzatvárania. Táto časť sa zamerala na štruktúru, aktivitu a priemyselné využitie spomínanej fosfolipázy.

Cieľom experimentálnej časti tejto práce bolo vytvoriť a indentifikovať homozygotnú líniu dvojitéch mutantných *mpk3* x *plda1* rastlín pomocou kríženia a genotypovania. Homozygotná línia dvojitéch mutantných *mpk3* x *plda1* rastlín bola vytvorená z kríženia jednoduchých homozygotných *mpk3* a *plda1* mutantných rastlín. Fenotypová analýza bola prevedená po vytvorení a identifikácii stabilnej homozygotnej dvojito-mutantnej línie. Táto analýza pozostávala z merania dĺžky hlavného koreňa a vzdialenosti od vrcholu hlavného koreňa po prvé koreňové vlásky. Výsledky fenotypovej analýzy vedú k odlišným fenotypom medzi jednoduchými *mpk3* a *plda1* mutantnými rastlinami, dvojítmými *mpk3* x *plda1* mutantnými rastlinami a kontrolnými rastlinami divokého typu Col-0.

Kľúčové slová	<i>Arabidopsis thaliana</i> , MPK3, MAPK, PLD, PLD $\alpha$ 1, kríženie, fenotyp
Počet strán	57
Jazyk	slovenský

## Bibliographical identification

Author's first name and surname	Kristína Tocíková
Title	Preparing of selected double mutant plants of <i>Arabidopsis thaliana</i> by crossing
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Dominik Novák
The year of presentation	2018

### Abstract

The theoretical part of the bachelor thesis is focused on organization and regulation of signaling cascade of mitogen-activated protein kinases, which consists of three types of reversible phosphorylated kinases. Mitogen-activated protein kinase 3 (MPK3) as the part of this cascade has an important role in defence signaling and it is involved in biotic and abiotic stress responses. This part of the thesis also describes the role of phospholipases which are part of all biological membranes. Phospholipases include phospholipase D alfa (PLD $\alpha$ ), which plays various roles in eukaryotic organisms such as cytoskeletal remodeling or regulation of stomatal opening and closing. This section is focused on the structure, activity and industrial use of mentioned phospholipase.

The aim of the experimental part of this thesis was to create and identify a homozygous line of double mutant *mpk3* x *plda1* plants by crossing and genotyping. This homozygous line of double mutant *mpk3* x *plda1* plants was created from single homozygous *mpk3* and *plda1* mutant plants by crossing. Phenotypic analysis was performed after identification of double mutant and subsequent derivation of a stable homozygous double-mutant line. This analysis consisted of measuring the main root length and the distance from root tip to first root hair. The results of phenotypic analysis lead to different phenotypes between single *mpk3* and *plda1* mutant plants, double *mpk3* x *plda1* mutant plants, and wild type control Col-0 plants.

Keywords	<i>Arabidopsis thaliana</i> , MPK3, MAPK, PLD, PLD $\alpha$ 1, crossing, phenotype
Number of pages	57
Language	Slovak

# OBSAH

<b>1. ÚVOD.....</b>	<b>8</b>
<b>2. SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY.....</b>	<b>10</b>
2.1 <i>Arabidopsis thaliana</i> ako modelový organizmus.....	10
2.2 Mitogen-aktivované proteinkinázy.....	11
2.2.1 Mitogen-aktivované proteinkinázy (MAPK).....	11
2.2.2 Mitogen-aktivované proteinkinázy kinázy (MAPKK).....	15
2.2.3 Mitogen-aktivované proteinkinázy kinázy kinázy (MAPKKK).....	15
2.2.4 Mitogen-aktivovaná proteinkináza 3 (MPK3).....	17
2.3 Fosfolipázy.....	17
2.3.1 Fosfolipáza D.....	19
2.3.2 Štruktúra fosfolipázy D.....	21
2.3.3 Aktivita fosfolipázy D.....	24
2.3.4 PLD $\alpha$ 1.....	25
2.3.5 Priemyselné využitie fosfolipáz.....	26
<b>3. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ.....</b>	<b>28</b>
3.1 Materiál.....	28
3.1.1 Chemikálie.....	28
3.1.2 Zloženie média a roztokov.....	28
3.1.3 Rastlinný materiál.....	29
3.1.4 Prístroje.....	29
3.1.5 Software.....	30
3.2 Metódy.....	30
3.2.1 Povrchová sterilizácia semien <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	30
3.2.2 Príprava ½ MS média.....	30
3.2.3 Výsev semien <i>Arabidopsis thaliana</i> na médium.....	31
3.2.4 Návrh primerov na genotypovanie <i>plda1-2</i> a <i>mpk3-1</i> mutantov pomocou PCR.....	31
3.2.5 Genotypizácia jednotlivých rastlín.....	32
3.2.6 Príprava dvojitého mutantu <i>mpk3-1</i> x <i>plda1-2</i> pomocou kríženia.....	33
3.2.7 Vyhodnotenie PCR reakcie pomocou agarózovej elektroforézy.....	34
3.2.8 Fenotypová analýza vybraných rastlín.....	34
<b>4. VÝSLEDKY A DISKUSIA.....</b>	<b>35</b>

<b>5. ZÁVER .....</b>	<b>47</b>
<b>6. ZOZNAM POUŽITEJ ILITERATÚRY.....</b>	<b>48</b>
<b>7. ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK.....</b>	<b>57</b>

## CIELE PRÁCE

### TEORETICKÁ ČASŤ

Vypracovanie literárnej rešerš zameranej na rastlinu *Arabidopsis thaliana* ako modelový organizmus , ďalej spracovanie literárnej rešerš na fosfolipázy D a mitogen-aktivované proteinkinázy.

### PRAKTICKÁ ČASŤ

- 1) Identifikácia homozygotných mutantných *mpk3* a *plda1* rastlín pomocou genotypovania.
- 2) Vzájomné kríženie mutantných *mpk3* a *plda1* rastlín.
- 3) Identifikácia dvojítých mutantných *mpk3* x *plda1* rastlín a odvodenie stabilnej homozygotnej línie.
- 4) Fenotypová analýza vybraných dvojítých *mpk3* x *plda1* mutantov.



## 1. ÚVOD

Rastliny ako suchozemské organizmy sa nedokážu vyhnúť nepriaznivým podmienkam prostredia na rozdiel od zvierat, ktoré sú schopné pohybu. Ich prežitie je preto závislé od siete systémov pre rýchle vnímanie signálu, reakcie a adaptácie k environmentálnym podmienkam (Smékalová *et al.*, 2014). Medzi takéto systémy patria signalizačné dráhy mitogén-aktivovaných proteínkináz (MAPK), ktoré tvoria multienzymatické komplexy konzervované v eukaryotických organizmoch, kde zohrávajú dôležitú úlohu v adaptačných procesoch (Colcombet a Hirt, 2008; Rodriguez *et al.*, 2010). V roku 1993 boli prezentované prvé správy o rastlinných MAPK a to MsERK1 z rastliny *Medicago sativa* (Duerr *et al.*, 1993) a kináza D5 z hrášku (Stafstrom *et al.*, 1993). Kompletne sekvenovanie genómu *Arabidopsis* viedlo k identifikácii 20 génov kódujúcich MAPK, 10 génov kódujúcich MAP2K (mitogén-aktivované proteínkinázy kinázy; MAPKK) a viac ako 60 génov pre MAP3K (mitogén-aktivované proteínkinázy kinázy kinázy; MAPKKK), z ktorých doteraz bolo len málo funkčne overených (Colcombet a Hirt, 2008; Rodriguez *et al.*, 2010). Kinázy sa aktivujú prostredníctvom fosforylácie. Aktivovaná serín/treonínová MAPKKK fosforyluje serín alebo treonín MAPKK. MAPK je následne aktivovaná pomocou dvojitej fosforylácie treonínového alebo tyrozínového rezidua, ktorú sprostredkúva fosforylovaná MAPKK. (Chang a Karin, 2001). MAPK dráhy zohrávajú rozličné úlohy v rámci jednej bunky i celého organizmu (Jouannic *et al.*, 1999).

Fosfolipidový katabolizmus je pre funkčnosť bunky nevyhnutný a zahŕňa množstvo procesov vrátane metabolického usmerňovania neobvyklých mastných kyselín, reorganizácie a degradácie membrán a produkcie sekundárnych poslov (Chapman, 1998). Fosfolipázy sa vyskytujú ako katabolické enzýmy ktoré hydrolyzujú fosfolipidové zložky membrán (Dennis, 1983). Tieto enzýmy sú u rastlín klasifikované do tried (A,C,D) na základe ich miesta štiepenia. Fosfolipázy sa vyskytujú vo všetkých štádiách rastu a vývoja rastlín. Napríklad sú potrebné pre biosyntézu tukov počas vývoja embrya, prenose signálu počas klíčenia semien, membránovú reorganizáciu, či recykláciu lipidov pri senescencii (Chapman, 1998). Rastliny majú veľkú a rôznorodú rodinu PLD génov v porovnaní s cicavcami, ktoré majú dva PLD gény alebo kvasinkami, ktoré majú iba jeden PLD gén. Genóm sekvenovanej modelovej rastliny *Arabidopsis thaliana* obsahuje dvanásť PLD členov rozdelených do tried (Elias *et al.*, 2002). Pre PLD enzýmy v eukaryotických organizmoch sú charakteristické dve vysoko konzervované karboxyterminálne (C-terminálne) katalytické domény a aminokoncová (N-terminálne) oblasť, ktorá viaže

lipidy (Kopka *et al.*, 1998). Väčšina tried PLD rastlín nesie N-terminálnu  $\text{Ca}^{2+}$  závislú doménu viažucu lipidy (C2 doména), zatiaľ čo PLD z cicavcov a rastlín  $\zeta$ - triedy majú N-koncovú homológnu PhoX (PX) a plekstrín homológnu (PH) lipid-väzbovú doménu (Kopka *et al.*, 1998).

## 2. SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

### 2.1 *Arabidopsis thaliana* ako modelový organizmus

Prvá zmienka o rastline *Arabidopsis thaliana*, nachádzajúcej sa v pohorí Harz v Nemecku, bola popísaná v roku 1577 nemeckým botanikom Johannesom Thalom (Clemens, 2001). *Arabidopsis thaliana*, patriaca do čeľade *Brassicaceae* je kľúčovou modelovou dvojkľíchnolistovou rastlinou a je dobrým materiálom k štúdiu a k pochopeniu vývoja ekológie v podobe genómovej variability (Mitchell-Olds, 2001), či základných bunkových, fyziologických a molekulárnych procesov (Alonso-Blanco *et al.*, 2016). Ako modelový organizmus má dobré vlastnosti; krátky generačný čas, malá veľkosť a produkcia semien prostredníctvom samoopelenia (Koornneef a Meinke 2010). Táto kvitnúca rastlina slúži k identifikácii génov a k určeniu ich funkcií vďaka tomu, že jej genóm obsahuje 25 498 génov, ktoré kódujú proteíny z 11 000 odlišných rodín. Veľkosť genómu tejto rastliny je 135 Mb (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000).

Rastliny *A. thaliana* sú jednoročné a svoj životný cyklus končia v rámci vegetačného obdobia (Picó, 2012). Doba klíčenia je veľmi premenlivá medzi rôznymi genotypmi tejto rastliny a môže byť silne ovplyvnená environmentálnymi faktormi, ako sú nízka teplota a svetlo (Nordborg *et al.*, 2002). Po fyziologickej stránke túto rastlinu ovplyvňujú faktory ako je teplota (Wilczek *et al.*, 2009), dostupnosť vody a dĺžka dňa (Corbesier a Coupland, 2005; Lempe *et al.*, 2005).

Jeden z dôležitých faktorov, ktorý výrazne ovplyvňuje zdravotný stav rastlín vrátane plodnosti a schopnosti prežitia sa považuje obdobie reprodukcie (O'Neil, 1999; Michael *et al.*, 2003; Korves *et al.*, 2007). Vývoj semien *A. thaliana* možno rozdeliť do troch etáp. Po dvojitom oplodnení v embryonálnom vaku nastane skorá morfogénéza. V prvom štádiu počas skorej embryogenézy (morfogénéza) je hmotnosť semena a obsah lipidov nízka. V druhej fáze (dozrievanie) dochádza k bunkovej expanzii a diferenciácii. Je zaznamenaný rýchly nárast suchej hmotnosti a zásobné oleje a proteíny sa hromadia vo veľkých množstvách. Počas tretieho a posledného štádia (neskoré dozrievanie) zostane suchá hmotnosť konštantná a embryo sa stáva metabolicky pokojné a tolerantné k vysychaniu (Baud *et al.*, 2002). Reprodukcia má takisto veľký vplyv na výnos plodín (Jung *et al.*, 2009; Cockram *et al.*, 2007) a v jednej generácii rastlina dokáže vyprodukovať viac než 5000 semien (Meinke *et al.*, 1998).

Práve rastliny zo všetkých druhov organizmov zohrali vedúcu úlohu pri štúdiu adaptácie. *A. thaliana* má výrazne širšiu klimatickú amplitúdu ako iné druhy *Brassicaceae* a za adaptačnú schopnosť tejto rastliny možno považovať dobu kvitnutia (O'Neil, 1999; Korves *et al.*, 2007; Mitchell-Olds a Schmitt, 2006; Scarcelli a Kover, 2009). V dôsledku zmeny klímy sa rastlinné druhy premiestňujú na vyššie miesta v rámci zemepisnej šírky (Jump a Peñuelas, 2005). Na základe štúdií bolo potvrdené, že táto rastlina pochádza z Európy, Ázie a severozápadnej Afriky (Lasky *et al.*, 2012).

## 2.2 Mitogen-aktivované proteinkinázy

### 2.2.1 Mitogen-aktivované proteinkinázy (MAPK)

Hlavné zložky podieľajúce sa na dráhach riadiacich embryogenézu, proliferáciu buniek, bunkovú diferenciáciu, či apoptózu sú tzv. mitogen-aktivované proteínové kinázy (MAPK) (Pearson *et al.*, 2001). MAPK kinázové dráhy vykonávajú rôznorodé úlohy nielen v rámci daného organizmu, ale aj v rámci jednej bunky (Jouannic *et al.*, 1999). Funkcie MAPK sú najlepšie popísané v kvasinkách, pre ktoré existuje šesť rôznych génov kódujúcich MAPK, kde päť z nich bolo priradených k špecifickým signálnym dráham, ako je odozva na feromóny, filamentácia, reakcia na hypotonický a hypertonický šok, či sporulácia (tvorba spór) (Madhani a Fink, 1998).

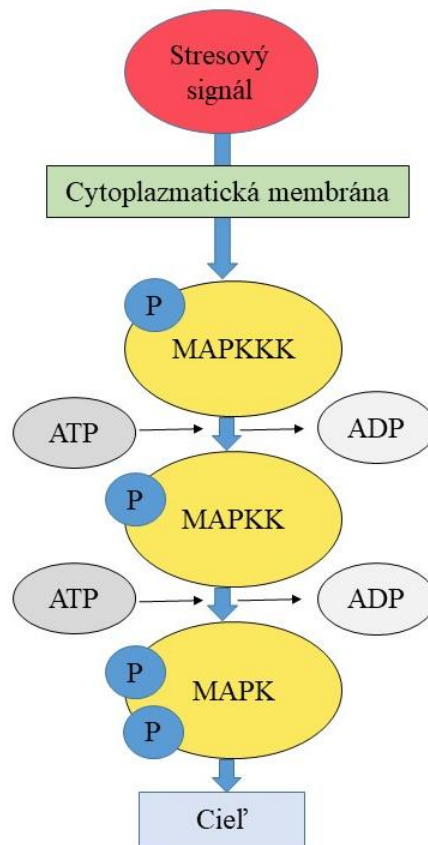
Najlepšie charakterizované rastlinné MAPK proteíny z hľadiska fyziologických funkcií sú z Tabáku virgínskeho (*Nicotiana tabacum*), Lucerny siatej (*Medicago sativa*) a Arábkovky thalovej (*Arabidopsis thaliana*) (Tena *et al.*, 2001). MAPK kaskády sú spojené s rôznymi hormonálnymi, fyziologickými, či vývojovými reakciami a vyskytujú sa v eukaryotických organizmoch vrátane živočíchov, rastlín a kvasiniek (Ichimura *et al.*, 2002). Štúdie na molekulárnej a biochemickej úrovni používajúce rôzne špecifické protilátky na konkrétne MAP kinázy ukázali, že aktivácia MAP kináz je spätá so stimulačnými procesmi, ako je infekcia patogénmi, sucho, nízka teplota, hyperosmolarita a hypoosmolarita, či vysoká hladina slanosti (Tena *et al.*, 2001; Zhang a Klessing, 2001; Romeis, 2001; Morris, 2001). Aktiváciou MAPK kaskád môže takisto dochádzať k rezistencii voči bakteriálnym a hubovým patogénom. Jednotlivými štúdiami bolo potvrdené, že MAPK kaskády a transkripčné faktory WRKY (WRKY22/WRKY29) u *A. thaliana* sa zúčastňujú na vrodenej imunite a fungujú proti flagelínovému receptoru FLS2 (Asai *et al.*, 2002).

Signály v bunke sa môžu prenášať prostredníctvom reťazca fosforylačných a defosforylačných javov, ktoré sú sprostredkované proteínovými kinázami a fosfatázami (Meskiene *et al.*, 1998). MAPK kaskády sú regulované pomocou fosforylácie. Obsahujú najmenej tri proteínové kinázy, ktorých výsledkom je aktivácia multifunkčnej MAP kinázy (Obr. 1) (Errede *et al.* 1995; Lewis *et al.*, 1998; Gustin *et al.*; 1998). Aktivácia MAPK vyžaduje fosforyláciu treonínových a tyrozínových zvyškov konzervovaného motívu T-X-Y v aktivačnej slučke, ktorá sa nachádza v dvojito špecifickej MAPK kináze (MKK, MAP2K, MAPKK) (Marshall, 1994). MAPK kaskády obsahujú tri základné zložky: mitogen-aktivovanú proteinkinázu kinázu (MAP3K, MAPKKK, MEKK), ktorá vratne fosforyluje mitogen-aktivovanú proteinkinázu kinázu (MAP2K, MAPKK, MKK) a tá následne fosforyluje mitogen-aktivovanú proteinkinázu (MAPK, MPK) (Keshet a Seger, 2010).

MAPK rastlín majú 2 druhy aktivačných motívov: buď je to Thr-Glu-Tyr (TEY) podobný živočíšnej MAPK alebo aktivačný motív Thr-Asp-Tyr (TDY), ktorý je špecifický pre rastlinné MAPK. Podľa sekvenčných podobností sa rastlinné TEY MAPK môžu rozdeliť do troch skupín (A, B, C), zatiaľ čo TDY MAPK tvoria skupinu D (Ichimura *et al.*, 2002; Hamel *et al.*, 2006). Medzi A skupinu možno priradiť MPK3 a MPK6 u *A. thaliana*. U iných druhoch rastlín je táto skupina zastúpená SAMK (MAP kináza aktivovaná stresom), SIMK (MAP kináza indukovaná soľou), WIPK (proteinkináza indukovaná poranením), či MPK3 a MPK6 vyskytujúcich sa u ryže (Pedley a Martin, 2005; Zhang, 2008; Pitzschke *et al.*, 2009; Rodriguez *et al.*, 2010; Tena *et al.*, 2011;). Skupina B, do ktorej patria MPK4 a MPK11 je u *A. thaliana* zameraná na abiotické stresové reakcie, na ktorých sa tieto kinázy podieľajú. Takisto zohrávajú dôležitú úlohu pri delení buniek (Kosetsu *et al.*, 2010; Zeng *et al.*, 2011).

MAP kinázy možno rozdeliť do dvoch kategórii; na kinázy, ktoré sú regulované mimobunkovým signálom (ERK) alebo na stresom aktivované proteín kinázy (Seternes *et al.*, 2005). Vo všetkých známych kaskádach MAP kináz je kináza bezprostredne pred MAP kinázou členom rodiny MAP/ERK kinázy (MKK, MAP2K, MAPKK) (Pearson G. *et al.*, 2001). Aktivácia serín/treonín MAP kináz (MAPK) sa uskutočňuje prostredníctvom fosforylácie treonínových a tyrozínových zvyškov v katalytickej subdoméne VIII pomocou MAPK kináz (MAPKK). Tieto kinázy sú aktivované serín/treonín MAPKK kinázami (MAPKKK) (Jouannic *et al.*, 1999). Aktivácia MAPKKK môže prebehnúť 3 spôsobmi; prostredníctvom fosforylácie serínu/treonínu proteinkinázami nazvanými MAPKKK kinázami (MAP4K) (Sells a Chernoff, 1997),

pomocou G proteínu (Fanger *et al.*, 1997, Sugden a Clerk, 1997) alebo priamou interakciou s doménou receptorovej histidínkinázy (Posas a Saito, 1998). Predpokladané spájacie (docking) miesto MAPK je charakterizované bázickými zvyškami aminokyselín R a K N-konca k hydrofóbnym zvyškom aminokyselín L a I. Konečný počet jednotlivých kináz: 60 MAPKKK, 10 MAPKK a 20 MAPK bol stanovený po dokončení sekvencovania genómu rastliny *Arabidopsis thaliana* (Ichimura *et al.*, 2002).



Obr. 1 Schematické znázornenie aktivácie MAPK kaskády pomocou fosforylácie za následnej hydrolýzy ATP. MAPK je aktivovaná pomocou MAPKK, ktorá je aktivovaná pomocou MAPKKK. Stresový signál podnecuje aktiváciu MAPKKK tým, že sa táto kináza fosforyluje. Prenos signálu je sprostredkovaný pomocou fosforylačných a defosforylačných javov jednotlivými proteínovými kinázami, respektíve fosfatázami. Upravené podľa: Xu a Zhang, 2015.

### 2.2.2 Mitogen-aktivované proteinkinázy kinázy (MAPKK)

Genóm rastliny *Arabidopsis thaliana* obsahuje 10 MAPKK čo je polovičný počet oproti MAPK (Ichimura *et al.*, 2002). MAPKK možno rozdeliť do štyroch skupín (A-D) podľa určitej sekvenčnej podobnosti (Meng a Zhang, 2013). Skupina A MAPKK u *Arabidopsis* zahŕňa: MKK1, ktoré môžu byť aktivované abiotickými stresmi (Matsuoka *et al.*, 2002) a MKK2, ktoré slúžia ako upstream faktory pre MPK4 (Ichimura *et al.*, 1998; Mizoguchi *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2000; Matsuoka *et al.*, 2002;). Do tejto skupiny patrí aj MKK6, ktorý je podobný NtMEK1. NtMEK1 sa podieľa pri delení buniek (Calderini *et al.*, 2001). Skupiny C a D nemajú v MAPKK génoch intróny. MKK patriace do skupiny C zahŕňajú stresovo citlivé upstream faktory MPK skupiny A (Ichimura *et al.*, 2002). Do tejto skupiny patria MKK4 a MKK5, ktoré pôsobia na MPK3 a MPK6 pri regulácii vývoja rastlín a obranných reakcií u *Arabidopsis thaliana* (Asai *et al.*, 2002; Ren *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007; Cho *et al.*, 2008; Ren *et al.*, 2008; Meng *et al.*, 2012;). Do skupiny D patria MKK7, MKK8, MKK9 a MKK10 (Meng a Zhang, 2013) a do skupiny B patria MKK3, ktoré sú podmienené kyselinou jasmonovou v rámci signálnej transdukcie (Takahashi *et al.*, 2007).

Sekvencia fosforylačného miesta rastlinných a živočíšnych MAPKK sa od seba líšia. Rastlinné MKK majú súhlasnú sekvenciu S/TxxxxxS/T, na rozdiel od živočíšnych S/TxxxS/T. Súhlasná sekvencia rastlinných MAPKK však nebola nájdená u *A. thaliana* MKK10 kvôli delícii troch aminokyselinových zvyškov nachádzajúcich sa v tejto oblasti (Ichimura *et al.*, 2002).

Tieto enzýmy môžu fosforylovať hydroxylové vedľajšie reťazce serínových, treonínových a tyrozínových zvyškov vo svojich MAP kinázových substrátoch (Ashworth *et al.*, 1992; Seger *et al.*, 1992; Crews *et al.*, 1992; Kosako *et al.*, 1992; Wu *et al.*, 1993). Vo svojich aktivačných slučkách sú MAPKK aktivované fosforyláciou zvyškov serínu alebo treonínu (Alessi *et al.*, 1994; Zheng a Guan, 1994) .

### 2.2.3 Mitogen-aktivované proteinkinázy kinázy kinázy (MAPKKK)

MAP kinázové kinázové kinázy (MAP3K) vyskytujúce sa v rôznych primárnych štruktúrach boli definované na základe ich schopnosti fosforylácie ich špecifického substrátu MAP kinázových kináz (MAP2K). Tieto MAPKKK možno rozdeliť do štyroch podrodín MEKK/STE11, RAF, MLK a MOS (Jouannic *et al.*, 1999). U *Arabidopsis* sú



významné 3 podrodiny, kde prvou sú kinázy podobné MEKK, do ktorých možno zaradiť ďalších 12 členov a druhou sú kinázy podobné RAF obsahujúce 50 členov (Ichimura *et al.*, 2002). Tretia podrodina je tzv. ZIK, tiež nazývaná WNK (Sun *et al.*, 2014). Všetky identifikované serín/treonínove kinázy majú katalytickú doménu s približne 300 aminokyselinovými zvyškami, ktoré môžu byť rozdelené na 12 domén. Každá doména má niekoľko vysoko konzervovaných zvyškov. Jedným z týchto zvyškov je lyzín nachádzajúci sa v subdoméne II. (Wang *et al.*, 2008). WNK chýba katalytický lyzínový zvyšok v kinázovej subdoméne II nachádzajúcej sa v N-terminálnej kinázovej doméne (Wang *et al.*, 2008), ktorý je nevyhnutný pre koordináciu ATP v aktívnom centre a je konzervovaný medzi všetkými ostatnými kinázami (Xu *et al.*, 2000, Wilson *et al.*, 2001). Prvým popísaným identifikovaným génom WNK bol *WNK1* gén (Xu *et al.*, 2000). U ľudí je rodina WNK zložená zo štyroch génov *WNK1*, *WNK2*, *WNK3* a *WNK4*, ktoré sa nachádzajú na chromozómoch 12, 9, X a 17 (Gamba 2005).

Gény MEKK/RAF z vyšších rastlín možno rozdeliť najmenej do siedmich skupín: *MAP3K $\alpha$* , *MAP3K $\beta$* , *MAP3K $\gamma$* , *MAP3K $\delta$* , *MAP3K $\zeta$* , *MAP3K $\eta$*  a *MAP3K $\theta$* , kde do MEKK rodiny patria  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  a  $\zeta$  a do PRAF zvyšné  $\delta$ ,  $\eta$  a  $\theta$ . Na základe štúdií bolo potvrdené, že katalytická doména členov skupín  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\zeta$  je veľmi podobná (približne 50%), zatiaľ čo menšia podobnosť (približne 25%) bola pozorovaná, u členov skupín  $\delta$ ,  $\eta$  a  $\theta$ . (Jouannic *et al.*, 1999).

U rastliny *Arabidopsis thaliana* bola zverejnená a popísaná genómová sekvencia MAPKKK s názvom *AtCTR1*. Tento gén patrí do rodiny RAF a je zodpovedný za negatívnu reguláciu expície génov indukovaných etylénom (Kieber *et al.*, 1993). Ďalším génom patriacim do skupiny MAPKKK je *EDR1* gén, ktorý negatívne reguluje obranné reakcie (Frye *et al.*, 2001). V projektových databázach sekvenovania *A. thaliana* sa nachádza niekoľko ďalších genomových sekvencií ako napríklad *AtMEKK1*, *AtMAP3K $\beta$ 3*, *AtMAP3K $\gamma$* , *AtANP1* i ďalších charakterizovaných génov *AtMAP3K $\beta$ 4*, *AtMAP3K $\delta$ 3*, *AtMAP3K $\delta$ 4*, *AtMAP3K $\eta$ 2* a *AtMAP3K $\theta$ 1* (Jouannic *et al.*, 1999).

Je preukázané, že MAPK dráhy zohrávajú úlohu pri odpovediach na stres, pretože prepis konkrétnych MAPK a MAPKKK génov narastá v období chladu, sucha, či pri zvýšenej koncentrácii soli. Príkladom môže byť expresia génu *AtMEKK1*, ktorá bola zvýšená v stresových podmienkach, čo vedie k záveru, že zodpovedajúci proteín sa zúčastňuje na stresových odpovediach (Mizoguchi *et al.*, 1996).

### 2.2.4 Mitogen-aktivovaná proteinkináza 3 (MPK3)

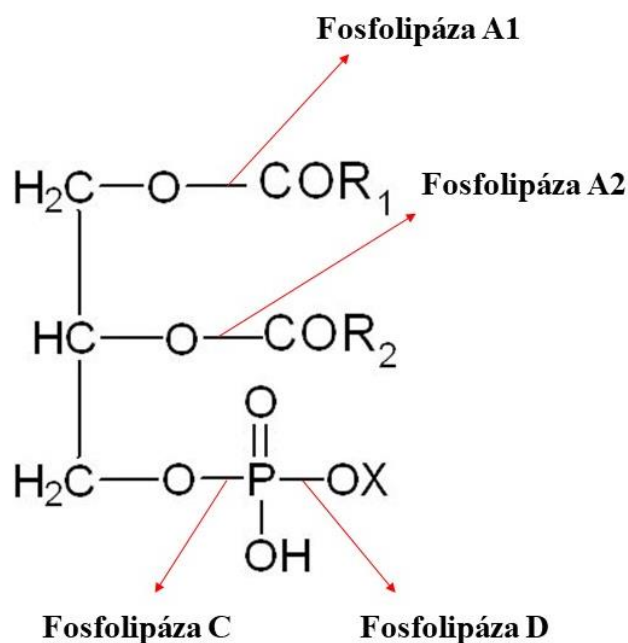
MPK3 sa podieľa na biotických aj abiotických stresových reakciách (Gudesblat *et al.*, 2007). Aktivácia tejto kinázy môže prebiehať rozličnými spôsobmi. V semenáčikoch *Arabidopsis* dochádza k aktivácii pomocou kyseliny abscisovej a peroxidu vodíka (Lu *et al.*, 2002), čo značí, že MPK3 sa zúčastňuje signálne dráhy peroxidu vodíku pri zatváraní, či inhibícii otvárania prieduchov (Gudesblat *et al.*, 2007). Možno teda povedať, že *MPK3* gén je exprimovaný v ochranných bunkách, ktoré tvoria súčasť prieduchov (Kwak *et al.*, 1997). Taktisto sa tento gén exprimuje aj v iných častiach rastliny ako napríklad v kotyledonoch, v hypokotyle, či v semenách (bar.utoronto.ca – The bar and other data analysis tools for plant). K aktivácii MPK3 dochádza i vystavením suspenzie buniek hyperosmotickým stavom (Droillard *et al.*, 2000) alebo ozónom, pričom táto atmosféricky znečisťujúca látka, generuje ROS (Reactive oxygen species) a aktívnu MPK3 translokuje do jadra (Ahlfors *et al.*, 2004).

Rastliny sú nepretržite vystavené patogénnym mikroorganizmom a rýchle zaznamenanie takéhoto útoku na rastlinu je nevyhnutné k spusteniu obranných reakcií a obmedzeniu šírenia infekcie (Galletti *et al.*, 2011). Flg22 je 22-aminokyselinový peptid, prítomný v bakteriálnom flagelíne (Gómez-Gómez a Boller, 2000). Po zaznamenaní flagelínu receptorom FLS2 sa MPK3 aktivuje (Galletti *et al.*, 2011). Táto kináza sa takisto môže aktivovať pri interakcii s hubami alebo s chitínom hubového elicitoru (Wang *et al.*, 2001, Schenk *et al.*, 2003).

## 2.3 Fosfolipázy

Fosfolipidy prítomné vo všetkých živých organizmoch, spolu s glykolipidmi a cholesterolom tvoria hlavnú zložku všetkých biologických membrán (De Maria *et al.*, 2007). Zohrávajú hlavnú úlohu pri celistvosti dvojvrstvovej štruktúry membrán a zapájajú sa napríklad do regulácie pri organizácii a dynamike cytoskeletu zaznamenávaním vonkajších stimulov (Pleskot *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2014; Zhang a Zhang 2016). Úroveň rastlinných fosfolipidov sa časovo a priestorovo mení v závislosti na strese a vývojových podnetov (Lin *et al.*, 2014, Wang *et al.*, 2014b). Enzýmy, ktoré sa podieľajú na modifikácii fosfolipidov sa nazývajú fosfolipázy. Tie zohrávajú rôznorodé úlohy; napríklad v membránach sa vyskytujú ako mediátori druhých poslov v signálnej transdukcii a u ľudí zasa v procesoch trávenia (De Maria *et al.*, 2007).

Fosfolipázy tak vo všeobecnosti možno rozdeliť do 4 skupín (A1, A2, C a D). Tieto lipázy katalyzujú hydrolýzu fosfolipidov, ktoré sa môžu považovať za deriváty glycerofosfátu. Miesta hydrolytického účinku fosfolipáz sa líšia medzi skupinami (Obr. 2). Fosfolipáza, môže štiepiť acylester v dvoch polohách; v polohe *sn*-1 sa označuje fosfolipáza A1 (PLA1, EC 3.1.1.32) a v polohe *sn*-2 fosfolipáza A2 (PLA2, EC 3.1.1.4). Enzým, ktorý štiepi fosfodiesterovú väzbu na strane glycerolu, sa označuje ako fosfolipáza C (PLC, EC 3.1.4.3), zatiaľ čo na polárnej strane to je fosfolipáza D (PLD, EC 3.1.4.4) (Dennis, 1983). Pri hydrolýze fosfolipidov sa uvoľňujú rôzne produkty, ako sú napríklad lyzofosfolipidy, voľné mastné kyseliny, diacylglyceroly, cholínfosfát a fosfatidáty, v závislosti od miesta hydrolýzy (De Maria *et al.*, 2007). Fosfolipázy môžu fungovať aj ako transacylázy (fosfolipázy A1 a A2 alebo lyzofosfolipáza) alebo transfosfatidylázy (fosfolipázy C a D) (Dennis, 1983).



Obr. 2 Znážornenie miest hydrolytického účinku jednotlivých fosfolipáz. Fosfolipázy A1 odštepujú acylovú skupinu v polohe *sn*-1 a fosfolipázy A2 v polohe *sn*-2. Tieto fosfolipázy sa preto nazývajú aj acylhydrolázy. Fosfolipázy C a D hydrolyzujú fosfodiesterovú väzbu substrátu, pričom z PLC vzniká diacylglycerol a fosforylovaný alkohol a z PLD kyselina fosfatidová a alkohol.

### 2.3.1 Fosfolipáza D

V roku 1947 bola prvýkrát popísaná aktivita fosfolipáz D (PLD) u rastlín z výtťažkov mrkvy (Hanahan a Chaikoff, 1947), zatiaľ čo u živočíchov bola táto aktivita popísaná v roku 1975 za uvoľnenia cholínu a etanolamínu z mozgu potkanov (Saito a Kanfer, 1975). Prvé purifikované PLD enzýmy boli izolované z kapusty (Abousalham *et al.*, 1993) a ricínového bôbu pochádzajúceho z rastlín *Ricinus communis* (Wang *et al.*, 1993).

Tieto fosfolipázy sa zúčastňujú celej rady procesov v bunke, vrátane transmembránovej signalizácie a poškodenia membrán. V eukaryotických organizmoch zohrávajú rozličné úlohy. V živočíšnej ríši sa PLD podieľajú na proliferácii buniek, sekrécii proteínov, membránovom prenose, na metabolickej regulácii a imunitných a zápalových odpovedí (Pappan *et al.*, 1997b). V kvasinkách PLD aktivita súži pri tvorbe spór behom sporulácie a takisto sa podieľa pri adaptácii využitia živín (Rose *et al.*, 1995; Ella *et al.*, 1996). Čo sa týka rastlín, štúdie PLD sa zameriavajú na odpovede pri poškodení membrán pri stresových reakciách, na senescenciu, patogenézu (Paliyath *et al.*, 1987; Wang, 1993; Ryu a Wang, 1995), signálnu transdukciu v reakciách na environmentálne podnety (Munnik *et al.*, 1995; Young *et al.*, 1996; Ryu a Wang 1998) i na stresové reakcie suchom, či osmotické stresové reakcie a signálnu transdukciu (Wang *et al.*, 2014a).

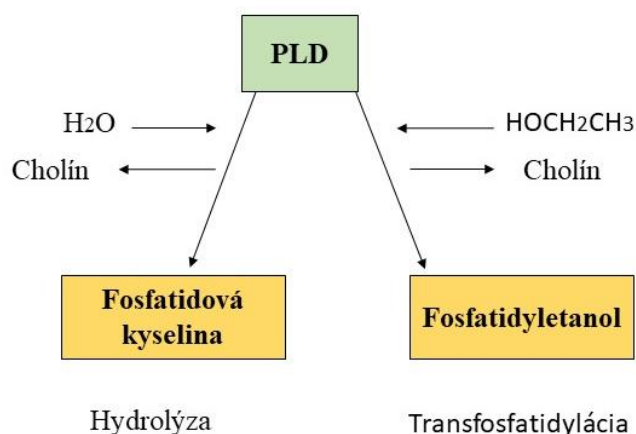
Fosfolipázy D tvoria hlavnú skupinu membránových fosfolipidových enzýmov v rastlinách. V genóme rastliny *A. thaliana* sa nachádza 12 PLD génov, ktoré sú rozdelené do 6 podtried:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ . Hlavnou úlohou PLD enzýmov je hydrolýza fosfolipidov, ako napríklad fosfatidilcholin, za produkcie fosfatidovej kyseliny (PA) a rozpustné skupiny, ako napríklad cholín. PA funguje ako signálna molekula, takzvaný druhý posol. (Munnik a Musgrave, 2001). Fosfolipázy PLD $\alpha$ 1 a PLD $\delta$  sú bohato zastúpené v rodine PLD enzýmov (Wang, 2002). PLD $\alpha$ 1 je aktivovaná pri transpiračnej strate vody, čím bráni vyschnutiu rastliny (Sang *et al.*, 2001b, Zhang *et al.*, 2004), zatiaľ čo PLD $\delta$  je aktivovaná v reakciách pri rapidnej dehydratácii (Bargmann *et al.*, 2009). PLD $\alpha$ 1 spolu s produktom kyselinou fosfatidovou (PA) sa podieľajú napríklad na regulácii organizácie mikrotubulov, čo má dôsledok v reakcii na soľný stres a ABA (kyselina abscisová) signalizáciu (Zhang *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2014).

Ako už bolo spomenuté, fosfolipázy D hydrolyzujú fosfatidylcholin za vzniku PA a cholínu (Obr. 3) (Jenkins a Frohman, 2005). Táto kyselina môže priamo ovplyvňovať zakrivenie biologických membrán, slúžiť ako miesto pre proteíny asociované s

membránami (Roth, 2008) a v bunke môže byť premenená na iné bioaktívne lipidy, diacylglycerol a kyselinu lyzofosfatidovú (Rivera a Chun, 2008). PA, ktorá predstavuje menej než 1% z celkových bunkových fosfolipidov, slúži hlavne ako lipidový posol a je produkovaná enzymatickými reakciami prostredníctvom PLD alebo pomocou diacylglycerol kinázy (Wang *et al.*, 2006). Takisto pôsobí aj ako spojka medzi plazmatickou membránou a mikrotubulmi cez MAP65-1 proteín a v odpovedi na solný stres u *A. thaliana* má pozitívny vplyv na stabilizáciu mikrotubulov (Zhang *et al.*, 2012). PLD má unikátnu možnosť prenosu fosfátu z fosfolipidu na primárny alkohol, ktorý uprednostňuje pred vodou a tým dochádza k produkcii fosfatidilalkoholu (Heller, 1978).

Na základe sekvenovania genómu a biochemických štúdií bolo potvrdené, že rodina rastlinných PLD je omnoho rozmanitejšia než u iných eukaryotických organizmov. Je známych 12 izoenzýmov nachádzajúcich sa u *Arabidopsis thaliana*. Desiat' z týchto izoenzýmov (PLD z  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\epsilon$ -typov) obsahuje doménu C2 a sú závislé od  $\text{Ca}^{2+}$ , zatiaľ čo dvaja členovia tejto skupiny (PLD $\zeta$ 1, PLD $\zeta$ 2) obsahujú PH a PX doménu rovnako ako cicavce a nie sú závislé od  $\text{Ca}^{2+}$  (Wang, 2000; Elias *et al.*, 2002; Qin a Wang, 2002). Jednotlivé izoenzýmy sa od seba líšia substrátovou špecifickosťou a afinitou k regulačným molekulám (Mansfeld a Ulbrich-Hofmann, 2009).

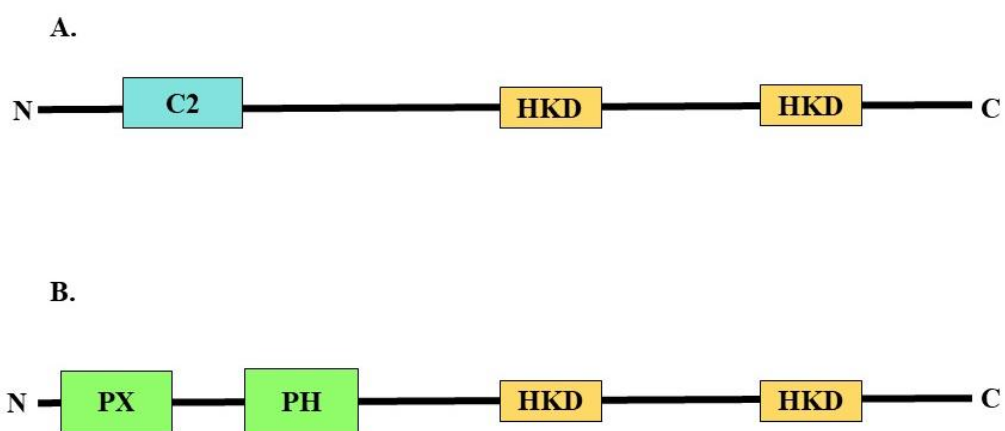
Model rastlinnej PLD bol zostavený na základe katalytického mechanizmu PLD zahrňujúceho dvojstupňovú „ping-pong“ reakciu, v ktorej je tvorba kovalentného fosfatidyl-enzýmového intermediátu nasledovaná buď hydrolýzou alebo transfosfatidyláciou (Stanacev a Stuhne-Sekalec, 1970). Všetky PLD enzýmy potom vo svojej aminokyselinovej sekvencii obsahujú dve konzervované HKD domény, potrebné re lypázovú aktivitu (Bargmann a Munnik, 2006). Konzervovaný histidín z HKD motívu z jednej domény slúži ako nukleofil zatiaľ čo z druhej domény je fosfoenzýmový medziprodukt hydrolyzovaný aktívnou molekulou vody alebo primárnymi krátkymi reťazcami alkoholu za uvoľnenia kyseliny fosfatidovej, či fosfatidylalkoholu (Rudolph *et al.*, 1999).



Obr. 3 PLD reakcie: PLD hydrolyzá substrátu fosfatidilcholínu za vzniku fosfatidovej kyseliny a transfosfatidylácia fosfatidilcholínu v prítomnosti primárneho alkoholu. Upravené podľa: Mansfeld a Ulbrich-Hofmann, 2009.

### 2.3.2 Štruktúra fosfolipázy D

Väčšina fosfolipáz D je charakterizovaných konzervovanými oblasťami aminokyselinovej sekvencie vrátane dvoch HKD motívov potrebných pre katalytickú aktivitu. Eukaryotické PLD majú regulačné štruktúry, ako sú homológne domény PH (phox) a PX (plextrín) nachádzajúce sa u kvasinkových a cicavčích PLD ale aj u rastlinnej PLD  $\zeta$ - triedy a N-koncové C2 domény vo väčšine PLD rastlín (Obr. 4) (Mansfeld a Ulbrich-Hofmann, 2009).

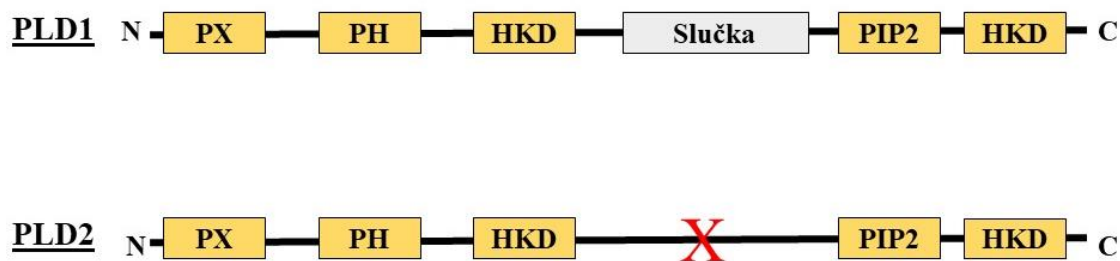


Obr. 4 Schematické znázornenie dvoch podskupín PLD. A. – doménová štruktúra  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -, a  $\epsilon$ - triedy PLD nachádzajúcich sa u rastlín, B. – doménová štruktúra  $\zeta$ - trieda PLD nachádzajúca sa u rastlín a PLD u cicavcov. Upravené podľa: Mansfeld a Ulbrich-Hofmann, 2009.

Aktívne fosfolipázy D môžeme nájsť takmer vo všetkých cicavčích bunkách okrem leukocytov a niektorých lymfocytov (Šimočková a Griač, 2009). Katalytický motív HKD, označuje sekvenciu HxxxxKxD, zloženú z aminokyselín histidínu (H), lyzínu (K), kyseliny asparágovej (D) a ktorejkoľvek inej aminokyseliny (x). (Jenkins a Frohman, 2005). PLD1 a PLD2 cicavcov obsahujú dva motívy HKD a každý z HKD motívov tvorí polovicu účinného aktívneho miesta (Sung *et al.*, 1997). Súčasťou cicavčích PLD sú i regulačné sekvencie zahŕňajúce lipid viažuce PX (Phox homologická) a PH domény ako i väzobné miesto pre fosfatidylinositol 4,5-bisfosfát (PIP<sub>2</sub>). Tieto regulačné sekvencie ohraničujú katalytické domény (Obr. 5) (McDermott *et al.*, 2004; Jenkins a Frohman, 2005). PX doména sa pravdepodobne podieľa na interakciách s inými proteínmi, či pri väzbe fosfatidylinozitolfosfátov (Xu *et al.*, 2001), zatiaľ čo PH doména ľudskej PLD1 a PLD2 a kvasinkovej Spo14p (fosfolipáza D1) sa podieľa pri tvorbe väzby enzýmu na špecifické lipidové povrchy obsahujúce PIP<sub>2</sub>. Táto PH doména však nezabezpečuje väzbu PIP<sub>2</sub>, ktorý je dôležitý k aktivácii enzýmu ale jeho väzobné miesto sa nachádza v katalytickej doméne PLD (Du *et al.*, 2003). Ďalšou súčasťou PLD1 je tzv. slučku, ktorá sa podieľa pri negatívnej regulácii proteínu (Sung *et al.*, 1999). Okrem domén sú dôležité i konce proteínov, ktoré sa podieľajú na aktivite PLD. Pomocou C-konca proteínu je definovaná jeho bunková lokalizácia (Hughes a Parker, 2001), zatiaľ čo N-koniec PLD1 je potrebný k stimulácii enzýmu pomocou proteínkinázy C (Zhang a Roomans, 1999).

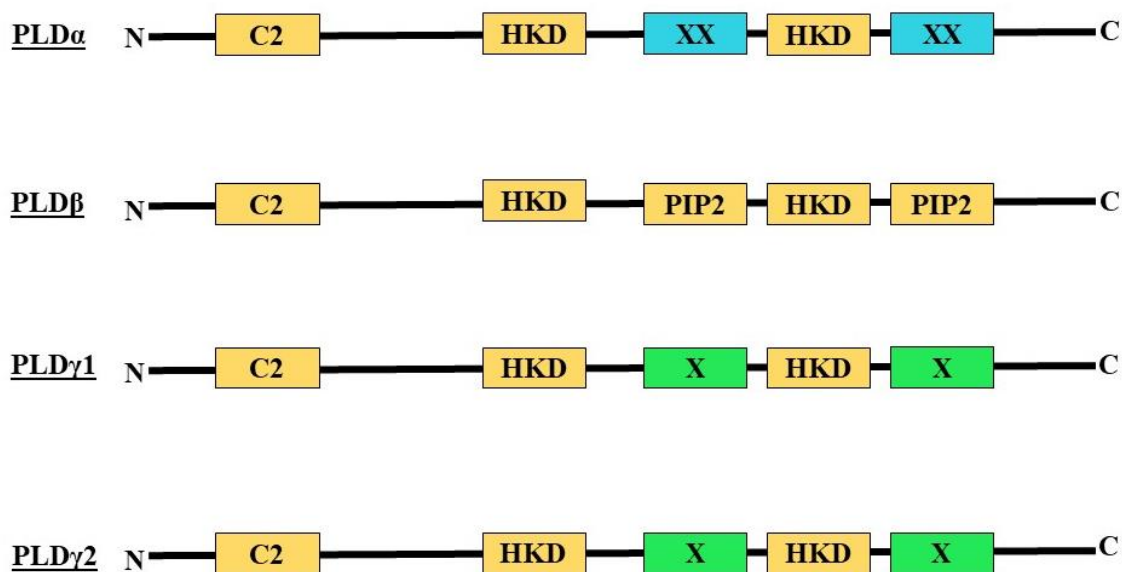
C2 doména alebo inak nazývaná CalB doména nachádzajúca sa u rastlín je prítomná v blízkosti N-konca (Obr. 6) vo všetkých rastlinných PLD a má dĺžku približne 130 zvyškov, ktoré môžu viazať Ca<sup>2+</sup> a iné efektoory vrátane fosfolipidov, inozitolfosfátov, či proteínov (Ponting a Kerr, 1996). Tento väzobný Ca<sup>2+</sup>/fosfolipid útvar bol najprv identifikovaný v izoformách závislých od Ca<sup>2+</sup> proteínovej kinázy C. Neskôr bol však nájdený aj u rôznych signalizačných proteínoch, ktoré interagujú s membránami a sprostredkovávajú kritické bunkové funkcie (Ponting a Paker, 1996; Kopka *et al.*, 1998). Väzba Ca<sup>2+</sup> je koordinovaná štyrmi až piatimi aminokyselinovými zvyškami v slučkách. PLD $\gamma$  a PLD $\beta$  uchovávajú kyslíkové aminokyseliny, ktoré koordinujú Ca<sup>2+</sup>, zatiaľ čo v C2 doméne PLD $\alpha$  sú dva z kyslých zvyškov substituované buď pozitívne nabitými alebo neutrálnymi aminokyselinami (Ponting a Paker, 1996; Pappan *et al.*, 1997a), čo dokazuje, že Ca<sup>2+</sup> afinita PLD $\alpha$  môže byť nižšia ako afinita PLD $\beta$  a  $\gamma$ . Tieto rozdiely v doménach C2 môžu byť štrukturálnym základom pre odlišné biochemické vlastnosti medzi PLD $\alpha$  od PLD $\beta$  a  $\gamma$  (Wang, 2000). Na základe štúdií bolo potvrdené, že motív bohatý na bázické

aminokyseliny, K/R(x)xxxKxK/RK/R, je zodpovedný za viazanie polyfosfoinositidov v proteínoch a spolu s obrátenou sekvenciou (RKxRxxxxR) sú prítomné v PLD $\beta$  v blízkosti druhého HKD katalytického motívu. Tri zo štyroch bázických zvyškov sú zachované v PLD $\gamma$ , zatiaľ čo PLD $\alpha$  nahrádza niekoľko bázických zvyškov kyslými zvyškami (Qin *et al.*, 1997).



Obr. 5 Základná doménová štruktúra PLD1 a PLD2. PX – plextrín homologická doména; PH – phox homologická doména, HDK – katalytický motív, PIP2 – fosfatidylinositol 4,5-bisfosfátová doména, X – znázorňujúce miesto chýbajúcej oblasti slučky. Upravené podľa: Šimočková a Griač, 2009.





Obr. 6 Znáznorenie doménovej štruktúry PLD $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ 1 a  $\gamma$ 2 u *A. thaliana*. C2 – C2 doména, HKD – katalytický motív, PIP2 – fosfatidylinositol 4,5-bisfosfátová doména, XX – označenie straty dvoch kyslých zvyškov potenciálne zapojených do väzby Ca<sup>2+</sup>, X – označenie straty jedného kyslého zvyšku. Upravené podľa: Mansfeld a Ulbrich-Hofmann, 2009.

### 2.3.3 Aktivita fosfolipázy D

Aktivita PLD $\alpha$ 1 okrem vápnika (Jiang et al., 2014), môže byť ovplyvnená aj inými látkami ako je NaCl (Zhang et al., 2012), ABA (Zhang et al., 2009) a oryzalin (Zhang et al., 2012).

Maximálna aktivita PLD rastlín vyžaduje milimolárne hladiny Ca<sup>2+</sup> na rozdiel od ľudskej PLD, ktorá je plne aktívna pri mikromolárnych hladinách Ca<sup>2+</sup>, či PLD kvasiniek, ktorá nevyžaduje žiadnu prítomnosť Ca<sup>2+</sup>. Okrem toho sú PLD u človeka i kvasiniek aktivované pomocou signalizačnej molekuly PIP2 (Drobak, 1993; Divecha a Irvine, 1995). Hydrolýza PIP2 fosfolipázou C vedie k syntéze fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfátu, ktorý aktivuje Ca<sup>2+</sup> nezávislú proteínovú kinázu C a k produkcii druhých poslov (second messengers) ako napríklad diacylglycerol a inositol trisfosfát (Pappan *et al.*, 1997b). PIP2 sa takisto podieľa na regulácii aktivity mnohých proteínov ako sú Ras GTPázy, alfa DNA polymerázy a ATPázy plazmatickej membrány citlivé na vanadát (Chen a Boss, 1991; Divecha a Irvine, 1995). V rastlinách sú fosfatidylinositol-4-fosfát (PIP) a PIP2 dôležité signalizačné zlúčeniny a ich hladiny sa menia v závislosti od reakcie na rôzne podnety. Percentuálne zastúpenie PIP2 v bunkových fosfolipidoch nepresahuje

viac ako 0,05% (Drobak, 1993) a pravdepodobne je viac koncentrovaný vo vnútorných plazmatických membránach v listoch. Niektoré membránové oblasti môžu mať vysoké hladiny polyfosfoinositidov, čo ma za následok aktiváciu PLD závislých od PIP2 (Pappan *et al.*, 1997b). Avšak štúdie používajúce PLD z komerčných zdrojov naznačujú, že aktivita rastlinnej PLD nezávisí od PIP2 (Brown *et al.*, 1993). V rastlinách, u ktorých bola potlačená milimolárna koncentrácia  $\text{Ca}^{2+}$ , bola nájdená nová PLD, ktorá dokáže fungovať pri nanomolárnych až nízkych mikromolárnych koncentráciách  $\text{Ca}^{2+}$  (Pappan *et al.*, 1997b).

### 2.3.4 PLD $\alpha$ 1

Mnohé špecifické PLD sa zapájajú do jednotlivých funkcií rastlín ako napríklad programovaná bunková smrť, či tolerancie na stres (Ohashi *et al.*, 2003; Thang *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004). Fosfolipáza D alfa 1 (PLD $\alpha$ 1, At3g15730) sa spolu s jej produktom kyselinou fosfatidovou podieľa na rôznych bunkových a fyziologických procesoch ako je napríklad cytoskeletálna remodelácia, regulácia stomatálneho uzatvárania a otvárania a na biotických, či abiotických stresových signalizáciách (Novák *et al.*, 2018). Ďalej sa PLD $\alpha$ 1 spolu s PA podieľa na produkcii  $\text{H}_2\text{O}_2$  v listoch rastliny *Arabidopsis thaliana* aktiváciou NADPH oxidázy (Sang *et al.*, 2001a). Aktivácia PLD $\alpha$ 1 takisto vedie k zvýšenej tvorbe voľnej kyseliny linolovej a kyseliny linolénovej, ktoré zohrávajú úlohu pri syntéze oxylipínu, či pri obrannej signalizácii (Ryu a Wang, 1998; Wang *et al.*, 2000). Bolo preukázané, že PLD sa zapája do odpovedí na kyselinu abscisovú (ABA) a práve nadmerná expresia PLD $\alpha$ 1 vedie k zvýšeniu citlivosti na túto kyselinu (Sang *et al.*, 2001b). PLD $\alpha$ 1 interaguje priamo s alfa podjednotkou ( $G\alpha$ ) heterotrimérnych G proteínov (Zhao a Wang, 2004), ktoré takisto zohrávajú úlohu pri sprostredkovaní ABA odpovede (Wang *et al.*, 2001). Mutantné rastliny *plda1* nevykazujú významné rozdiely v morfológických a vývojových charakteristikách v porovnaní s rastlinami divého typu (Fan *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2012).

PLD $\alpha$ 1 môže byť lokalizovaná v rozpustných a membránových frakciách. Môže sa premiestňovať z cytosolických na membránové frakcie a počas stresových podmienok vykonávať hydrolýzu membránových lipidov (Wang *et al.*, 2000, Hong *et al.*, 2016, Novák *et al.*, 2018). Subcelulárna distribúcia PLD $\alpha$ 1 na základe imunoblotovacích analýz frakcionovaných extraktov z listov rastliny *Arabidopsis thaliana* detekovala najvyšší obsah na plazmatických membránach, intracelulárnych membránach a mitochondriách,

zatiaľ čo malé množstvo tohto proteínu bolo detekované v jadre (Fan *et al.*, 1999). Výrazné hladiny expresie PLD $\alpha$ 1-YFP boli pozorované v apikálnych a v postranných bunkách koreňovej čiapočky, zatiaľ čo v meristematickej zóne koreňa vrátane rizodermi, kortexu a prokambia bola táto hladina expresie nízka. Štúdie preukázali pozoruhodne silnú expresiu i v centrálnych kolumelových bunkách. Takisto silná expresia bola zaznamenaná aj v trichoblastoch, zatiaľ čo u atrichoblastoch bola táto expresia znížená. Čo sa týka nadzemnej časti rastliny, relatívne vysoká expresia PLD $\alpha$ 1-YFP bola pozorovaná v epidermálnych bunkách hypokotylu, v epidermis listov, či v stomatálnych bunkách (Novák *et al.*, 2018).

### 2.3.5 Priemyselné využitie fosfolipáz

Enzýmy sa často využívajú pri priemyselných procesoch. Rýchly pokrok v biochemických a chemických štúdiách fosfolipidov a vývoj bioinžinierstva priniesol niekoľko výhod pri modifikácii fosfolipidov pre priemyselné využitie a ľudskú výživu (Guo *et al.*, 2005). Prasacia a ľudská podžalúdková žľaza boli prvými zdrojmi lipáz a fosfolipáz používaných v potravinárskom priemysle, avšak dnes sú hlavnými zdrojmi komerčne dostupných enzýmov hlavne kvasinky, huby a baktérie (Borrelli a Trono, 2015).

V mliekarenskom priemysle majú fosfolipázy veľké využitie, hlavne pri výrobe mlieka, syra, jogurtov ale aj zmrzliny. Pomocou hydrolýzy mliečnych fosfolipidov pred pridaním syridla sa zvýši výťažok syra bez toho, aby došlo k zníženiu jeho kvality. Takéto zlepšenie výťažku syra je pravdepodobne dôsledkom zadržovania tuku a vlhkosti v syrenine. (Lilbaek *et al.*, 2006). Fosfolipázy majú zastúpenie i v pekárskom priemysle, kde ich úlohou je zlepšenie kvality cesta. Lipidy spolu s hydrolyzovanými produktmi sú potrebné pre stabilizáciu vzduchových bublín v ceste. Tieto bubliny majú za následok jemnejšiu štruktúru cesta, čím zväčšujú objem chleba a predlžujú jeho trvanlivosť (Neron *et al.*, 2004).

Fosfolipázy sú dôležitým biokatalyzátorom, ktoré takisto syntetizujú nutraceutiká, čo sú bioaktívne zlúčeniny, ktoré môžu priaznivo vplyvať na ľudské zdravie (Borrelli a Trono, 2015). Medzi rekombinantné fosfolipázy, ktoré slúžia na produkciu nutraceutických zlúčenín, patria hlavne PLD zo *Streptomyces* spp. Napríklad rekombinantná PLD zo *S. chromofuscus* sa používa na konverziu fosfatidylcholínu a l-serínu na fosfatidylserín. Podobne bolo preukázané, že PLD zo *Streptomyces*

*racemochromogenes* exprimovaných v hostiteľskom *Streptomyces lividans* podporuje vysokú mieru konverzie fosfatidylcholínu a fosfatidyletanolamínu v sójovom lecitíne na fosfatidylglycerol a fosfatidylserín, v prítomnosti glycerolu a I-serínu (Nakazawa *et al.*, 2011).

Fosfolipázy sa takisto podieľajú aj pri výrobe endogénne vyrobených emulgátorov, ktorým je napríklad lyzolecitín. Ten je vyrobený z hydrolýzy lecitínu po úprave vaječného žĺtka s fosfolipázami. Takýto lyzolecitín sa využíva pre majonézový a omáčkový priemysel (Borrelli a Trono, 2015).

## 3. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

### 3.1 Materiál

#### 3.1.1 Chemikálie

<u>Duchefa Biochemie:</u>	MES, Murashige & Skoog - MS soli
<u>Alfa Aesar:</u>	Gellan gum
<u>Nippon Genetics:</u>	Midori green DNA Staining Solution
<u>Penta:</u>	etanol
<u>Sigma Aldrich:</u>	EDTA, Tris, kyselina octová, agaróza, sacharóza
<u>ThermoFisher scientific:</u>	Dilučný pufor, GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder, Phire Plant Direct PCR Kit, 6x DNA Loading Dye
<u>Eurofins Genomics:</u>	primery

#### 3.1.2 Zloženie média a roztokov

##### Polovičné MS médium súžiacie k pestovaniu rastlín *Arabidopsis thaliana* (1 l)

- 2,15 g MS soli
- 5 g Gellan gum
- 10 g sacharózy
- 1 g MES
- Doplnené miliQ H<sub>2</sub>O na výsledný objem 1 l

Výsledná hodnota pH 5,8; sterilizované autoklavovaním

##### 50x TAE pufor

- 100 ml 0,5 M EDTA
- 242 g Tris
- 57,1 ml kyselina octová
- Doplnené miliQ H<sub>2</sub>O na výsledný objem 1 l

Výsledná hodnota pH 8,0; pracovný roztok 1x TAE

##### 1% agarózový gél

- 0,75 g agaróza
- 75 ml 1x TAE pufor
- 3,75 µl Midori Green

### 3.1.3 Rastlinný materiál

V experimentoch boli použité rastliny *Arabidopsis thaliana*:

- ekotyp Columbia (Col-0, divoký typ)
- mutantná línia vytvorená pomocou T-DNA inzertu - SALK\_151594 (*mpk3-1*)
- mutantná línia vytvorená pomocou T-DNA inzertu - SALK\_053785 (*plda1-2*)
- mutantné línie vytvorené krížením *mpk3-1* a *plda1-2* mutantov (dvojitý mutant *mpk3-1 x plda1-2*)

### 3.1.4 Prístroje

analytické váhy XA110/2X (Radwag)

autokláv Sterivap HP IL (MMM Group)

binokulárny mikroskop Leica M165FC (Leica)

stereolupa použitá na kríženie MSZ5000 (Krüss)

dokumentačné zariadenie Gel Doc™ EZ Imager (BioRad)

elektroforetická vanička- veľká ( BioRad)

fytotronová komora (Weiss Gallenkamp)

chladnička Liebherr (MED line)

Image Scanner III (EPSON)

laboratórne predvážky S1502, (BEL)

laminárny box M 1200 (Merci)

mikrovlnná trúba MGE23 (Hitachi)

PCR cykler MyCycler™ Thermal Cycler (BioRad)

pH meter PC 2700 (Eutech Instruments)

rotátor Tube revolver (Thermo Fisher Scientific)

vortex MIXER (Labnet International, Inc.)

### **3.1.5 Software**

EPSONscan, ImageJ (<http://fiji.sc/>), ImageLab Bio-rad, LAS V4-0 (Leica), Microsoft Office Excel 2013, Microsoft Office PowerPoint 2013, Microsoft Office Word 2013, T-DNA Primer Design, Tm kalkulačka výrobca polymerázy Phire Hot Start II DNA

## **3.2 Metódy**

### **3.2.1 Povrchová sterilizácia semien *Arabidopsis thaliana***

Povrchová sterilizácia semien prebehla v sterilnom prostredí, v laminárnom boxe. Semená *A. thaliana*, odpovedajúce objemu zhruba 50  $\mu$ l boli prenesené do mikroskúmavky, kde boli zaliate 1,5 ml 70% etanolom. Mikroskúmavka so semenami bola prenesená na rotátor a inkubácia semien prebehla po dobu 5 minút za stáleho premiešavania. Semená v mikroskúmavke sa vďaka gravitácii usadili na dno mikroskúmavky a etanol sa odpipetoval. Následne sa pridal 1,5 ml 96% etanol a opäť sa semená inkubovali na rotátore ale iba po dobu 1 minúty. Po sedimentácii semien sa etanol odpipetoval. Semená boli premyté dvakrát po dobu 5 minút v sterilnej destilovanej vode a následne prenesené pomocou pipety na Petriho misku so sterilným filtračným papierom a voda sa nechala voľne odpariť. Keď filtračný papier so semenami vyschol, Petriho miska sa uzavrela pomocou parafilmu a bola skladovaná v chladničke pri 4 °C .

### **3.2.2 Príprava ½ MS média**

Polovičné MS médium slúžiace k pestovaniu rastlín *Arabidopsis thaliana* v *in vitro* prostredí bolo pripravené navážením presného množstva chemikálií (viď. kapitola 3.1.2 3.1.2. Zloženie média a roztokov) potom bolo sterilizované autoklávovaním. Médium obsahovalo MS soli, gellan gum, sacharózu, MES, destilovanú vodu s konečným pH 5,8. Neskôr sa stuhnuté médium podľa potreby rozvarilo v mikrovlnnej trúbe, rozlialo sterilne do štvorcových Petriho misiek a nechalo sa aspoň 30 minút stuhnúť.

### 3.2.3 Výsev semien *Arabidopsis thaliana* na médium

Vysterilizované semená boli v sterilnom prostredí prenesené na ½ MS médium na Petriho misku pomocou drevenej tyčinky. Miska bola uzavretá pomocou parafilmu a vložená do chladničky pri 4 °C v tme na cca 3 dni z dôvodu stratifikácie. Potom Petriho miska bola vložená do fytotrónu, kde boli semená kultivované pri teplote 23 °C s fotoperiódou 16/8 (svetlo/tma).

### 3.2.4 Návrh primerov na genotypovanie *plda1-2* a *mpk3-1* mutantov pomocou PCR

Pre návrh primerov na genotypovanie *plda1-2* (SALK\_053785) mutantu a *mpk3-1* (SALK\_151594) mutantu bol použitý program T-DNA Primer Design dostupný na webovej adrese <http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>. Týmto programom boli nájdené sekvencie jednotlivých primerov.

*Pre plda1-2:*

LP- *plda1-2*: ATTAAGTGCAGGGCATTGATG

RP- *plda1-2*: CAAGGCTGCAAAGTTTCTCTG

LBb1.3: ATTTTGCCGATTTTCGGAAC

Predpokladaná veľkosť hraničného amplikonu pre sadu primerov LBb1.3+RP je 511-811 bp. Pre sadu LP+RP je 1109 bp.

Rovnakým spôsobom bola získaná sekvencia aj pre *mpk3-1* mutantu:

LP- *mpk3-1*: ATTTTTGTCAACAATGGCCTG

RP- *mpk3-1*: TCTGCCTTTTCACGGAATATG

Predpokladaná veľkosť hraničného amplikonu pre sadu primerov LBb1.3+RP je 546-846 bp. Pre sadu LP+RP je 1229 bp.

Na výpočet teploty nasadnutia primerov k PCR reakcii sa použila Tm kalkulačka výrobcu polymerázy Phire Hot Start II DNA (Thermo Fisher Scientific) dostupná na stránke <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo->



scientific-web-tools/tm-calculator.html. Teplota nasadnutia primerov pre *plda1-2* mutanta k PCR reakcii bola určená na 65,5 °C a pre *mpk3-1* mutanta 65 °C.

### 3.2.5 Genotypizácia jednotlivých rastlín

Na genotypizáciu jednotlivých rastlín bol použitý Phire Plant Direct PCR kit. Celkovo sa genotypovali rastliny typu Col-0, *mpk3-1*, *plda1-2* a dvojitý mutant *mpk3-1* x *plda1-2*. Pri extrakcii DNA jednotlivých rastlín sa použili mikroskúmavky, do ktorých sa napipetoval komerčný dilučný pufoer o objeme 20 µl, do ktorého sa odstrihol kľíčny list 10 - 14 dní starého semenáčka (2 x 2 mm). List sa jemne rozdrvil o stenu mikroskúmavky pomocou špičky a potom sa ponoril do pufru. Následne boli mikroskúmavky položené na ľad po dobu 1 hodiny. Pri PCR reakcii bola vyextrahovaná DNA použitá ako templát. Celkovo boli pripravené dve sady k PCR reakcii pre každého mutanta, ktoré mali príslušné kombinácie primerov. Prvá reakčná zmes pre identifikáciu génu *PLDα1* respektíve *MPK3* a druhá sada pre prítomnosť T-DNA inzertu. Každá reakčná zmes obsahovala teplát, príslušné primery, 2x Phire Plant PCR pufoer, ktorý obsahoval nukleotidy, Phire® Hot Start DNA polymerázu a vodu určenú k PCR reakcii v určitých objemoch (Tab. 1). Takto pripravená zmes v mikroskúmavke sa následne vložila do termálneho cykléru, ktorý bol nastavený podľa optimálnych podmienok, potrebných pre priebeh reakcie (Tab. 2). Po nájdení homozygotnej línie *mpk3-1* respektíve *plda1-2* mutanta, boli títo mutanti prenesení do pôdy a slúžili pre vzájomné kríženie.

Tab. 1 Reakčná zmes k PCR reakcii

Chemikálie	Objem na jednu reakciu (10 µl)
2x Phire Plant PCR pufoer	5,0 µl
PCR voda	2,5 µl
Phire® Hot Start DNA polymeráza	0,2 µl
Forward primer	1,0 µl
Reverse primer	1,0 µl
DNA templát	0,3 µl

Tab. 2 Podmienky pre jednotlivé kroky k priebehu PCR reakcie

Krok PCR cyklu	Čas [t]	Teplota [T] <i>mpk3-1</i>	Teplota [T] <i>plda1-2</i>	Počet cyklov
Začiatková denaturácia	5 min	98 °C	98 °C	1x
Denaturácia	5 s	98 °C	98 °C	40x
Annealing	5 s	65 °C	65,5 °C	
Elongácia	25 s	72 °C	72 °C	
Konečná elongácia	60 s	72 °C	72 °C	1x

### 3.2.6 Príprava dvojitého mutanta *mpk3-1* x *plda1-2* pomocou kríženia

Z materskej rastliny sa pod stereomikroskopom odstránili už rozkvitnuté kvety. Ešte uzavreté púčiky sa pomocou pinzety opatrne otvorili a odstránili sa všetky tyčinky. Na bliznu piestika sa preniesol peľ z druhej rodičovskej rastliny. Krížené kvety boli označené pomocou farebnej nite a rastlina bola vrátená k dozretiu do fytotronu. Dozreté šesule, vytvorené po krížení, obsahujúce semená F1 generácie sa zozbierali, následne sa vysterylizovali a vysadili na Petriho misku so živným médiom. Prebehla stratifikácia a miska bola prenesená do fytotronu. 2- 3 týždne po vyklíčení sa identifikovali dvojité heterozygotní *mpk3-1* x *plda1-2* mutanti pomocou PCR popísanej v časti 3.2.5. Vybraní dvojité heterozygotní mutanti boli vysadení do pôdy a po dozretí boli zozbierané semená F2 generácie. Hľadanie homozygotnej línie dvojitého mutanta *mpk3-1* x *plda1-2* bolo prevedené takisto pomocou PCR. Pri PCR reakcii na identifikáciu heterozygotnej línie v F1 generácii i homozygotnej línie v F2 generácii bola celkovo použitá sada 5 primerov v 4 reakciách (Tab. 3).

Tab. 3 Kombinácie primerov pri jednotlivých reakciách PCR

	<i>plda1-2</i>	<i>mpk3-1</i>
<b>Gén</b>	LP- <i>plda1-2</i>	LP- <i>mpk3-1</i>
	RP- <i>plda1-2</i>	RP- <i>mpk3-1</i>
<b>T-DNA</b>	LBb1.3	LBb1.3
	RP- <i>plda1-2</i>	RP- <i>mpk3-1</i>

### 3.2.7 Vyhodnotenie PCR reakcie pomocou agarózovej elektroforézy

Na vyhodnotenie PCR reakcie pre prítomnosť T-DNA inzertu a génu bola prevedená elektroforéza na 1% agarózovom géle. K vzorkám, ktoré boli vytiahnuté z termálneho cykléru bol pridaný 6x DNA loading dye o objeme 2  $\mu$ l. Gél do ktorého sa napipetovali vzorky bol zložený z 0,75 g agarózy, ktorá bola rozvarená v 75 ml 1x TAE pufru. 1x TAE pufo obsahoval 40 mM Tris, 20 mM kyselinu octovú a 1 mM EDTA. Po mierom vychladnutí sa pridalo príslušné množstvo farbiva Midori Green DNA Staining Solution (5  $\mu$ l/100 ml gélu) na zviditeľnenie DNA a zmes bola naliata do vaničky na polymerizáciu do ktorej bol vložený hrebeň. Po stuhnutí gélu sa vytiahol hrebeň, ktorý vytvoril jamky. Gél sa preniesol do elektroforetickej vaničky obsahujúcej 1xTAE pufo a ten bol doplnený nad povrch gélu. Vzorky obsahujúce 6x DNA loading dye boli o objeme 10  $\mu$ l napipetované do jamiek. Po zapojení elektród prebehla elektroforéza s nepretržitým napätím 80 V počas 40 min. Výsledok elektroforézy bol dokumentovaný pomocou Geldoc<sup>TM</sup> EZ systému a softwaru ImageLab Bio-rad.

### 3.2.8 Fenotypová analýza vybraných rastlín

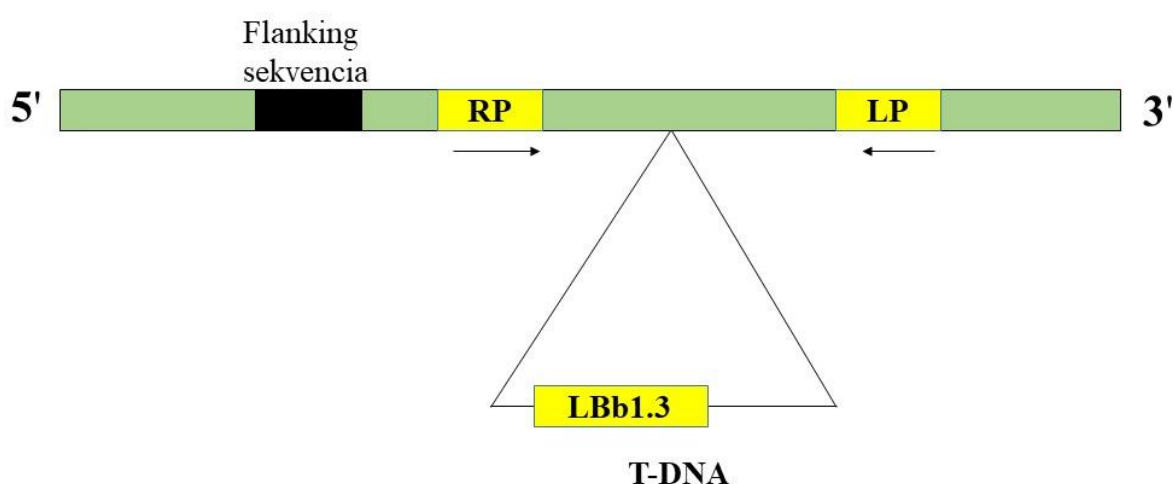
Semená rastlín *plda1-2*, *mpk3-1*, *plda1-2* x *mpk3-1* a Col-0 boli v rovnaký čas vysadené na ½ MS médium a vložené do chladničky na cca 5 dni z dôvodu stratifikácie. Po piatich dňoch boli prenesené do fytotrónu, kde sa semená kultivovali pri teplote 23 °C s fotoperiódou 16/8 (svetlo/tma). Tieto vybrané rastliny boli dokumentované v určitých časových intervaloch. Celkovo boli sledované dva fenotypové znaky. Pod binokulárnym mikroskopom (Leica) boli pozorované koreňové špičky 5. deň po vyklíčení a 8. deň po vyklíčení. Druhým fenotypovým znakom bola zaznamenaná dĺžka koreňa na 5. a 8. deň po vyklíčení pomocou scanneru. Všetky výsledky boli spracované pomocou ImageJ softwaru a vyhodnotené do grafov.

## 4. VÝSLEDKY A DISKUSIA

### 4.1 Genotypizácia *mpk3-1* a *plda1-2* mutantov

K výberu a overeniu rastlín, ktoré majú špecifickú T-DNA mutáciu sa používa napríklad metóda polymerázovej reťazcovej reakcie (McKinney *et al.*, 1995, Krysan *et al.*, 1996). K zisteniu, že dané mutantné rastliny obsahujú T-DNA inzert, musia byť najprv identifikované homozygotné línie (Krysan *et al.*, 1999).

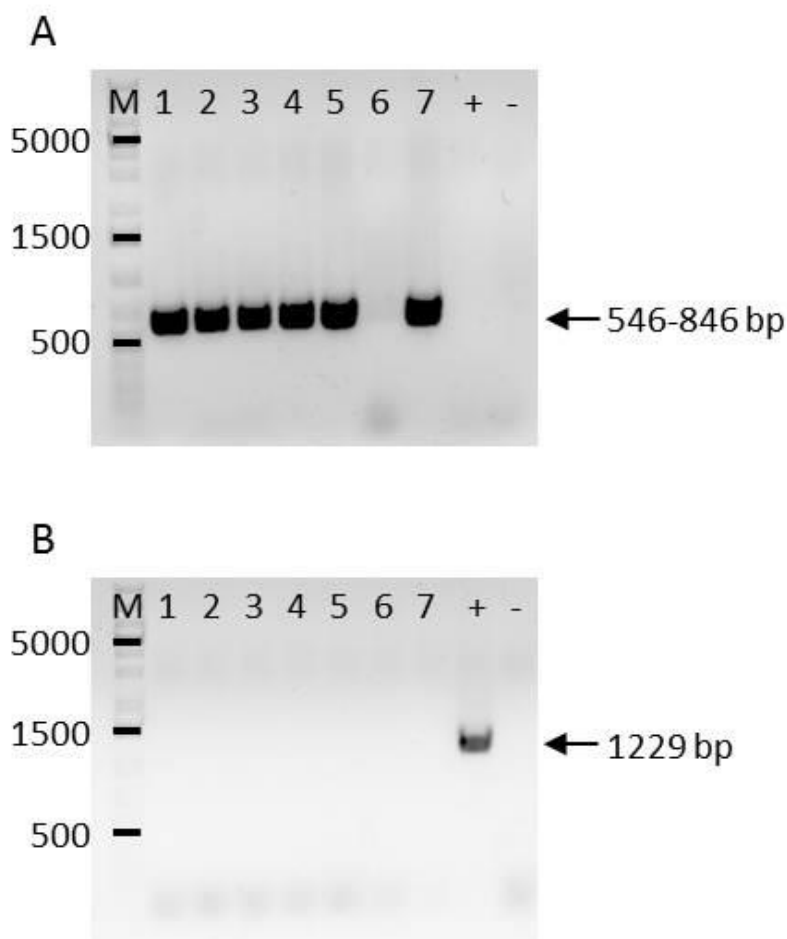
Semená Col-0 a mutantných *mpk3-1* a *plda1-2* rastlín *A. thaliana* boli vysiate na polovičné MS médium. Po 2 - 3 týždňoch po vyklíčení sa rastliny genotypovali pomocou PCR. Práve pomocou tejto metódy bolo možné rozlíšiť homozygotnú líniu od heterozygotnej línie. Pre nájdenie homozygotnej línie *mpk3-1* respektíve *plda1-2* mutantu slúžili príslušné primery. Pre T-DNA inzert, nachádzajúci sa v oblasti exónu (Obr. 7), bola príslušná kombinácia primerov RP a LBb1.3 a pre gén *MPK3-1* respektíve *PLDA1-2* kombinácia primerov LP a RP. Tieto kombinácie primerov poskytli produkt PCR reakcie v určitých veľkostiach (Tab. 4). K overeniu priebehu PCR reakcie a k vyhodnoteniu prítomnosti T-DNA inzertu a génu bola prevedená elektroforéza na 1 % agarózovom géle. Boli vybraní homozygotní *mpk3-1* mutanti (Obr. 8) respektíve *plda1-2* mutanti (Obr. 9), ktorí boli následne presadení do pôdy a slúžili pre vzájomné kríženie. Dozreté semená vzniknuté krížením homozygotných *mpk3-1* a *plda1-2* rastlín sa použili na identifikáciu dvojitého heterozygotného *mpk3-1* x *plda1-2* mutantu.



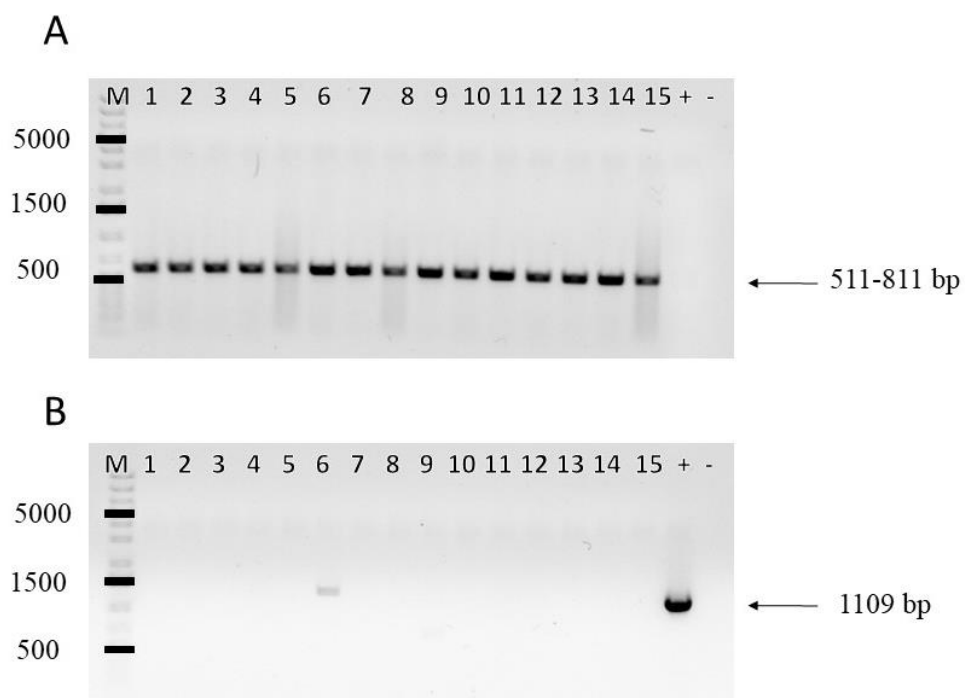
Obr. 7 Znáznornenie T-DNA inzertu nachádzajúceho sa v oblasti exónu daného génu. Príslušné kombinácie primerov (RP, LP, LBb1.3, žltá farba) použité na PCR reakciu umožňujú identifikovať prítomnosť génu a T-DNA inzertu.

Tab. 4 Predpokladaná veľkosť hraničného ampliconu pri jednotlivých kombináciách primerov

	<i>plda1-2</i>	<i>mpk3-1</i>
<b>Gén</b>	(LP+RP) 1109 bp	(LP+RP) 1229 bp
<b>T-DNA</b>	(LBb1.3+RP) 511-811 bp	(LBb1.3+RP) 546-846 bp



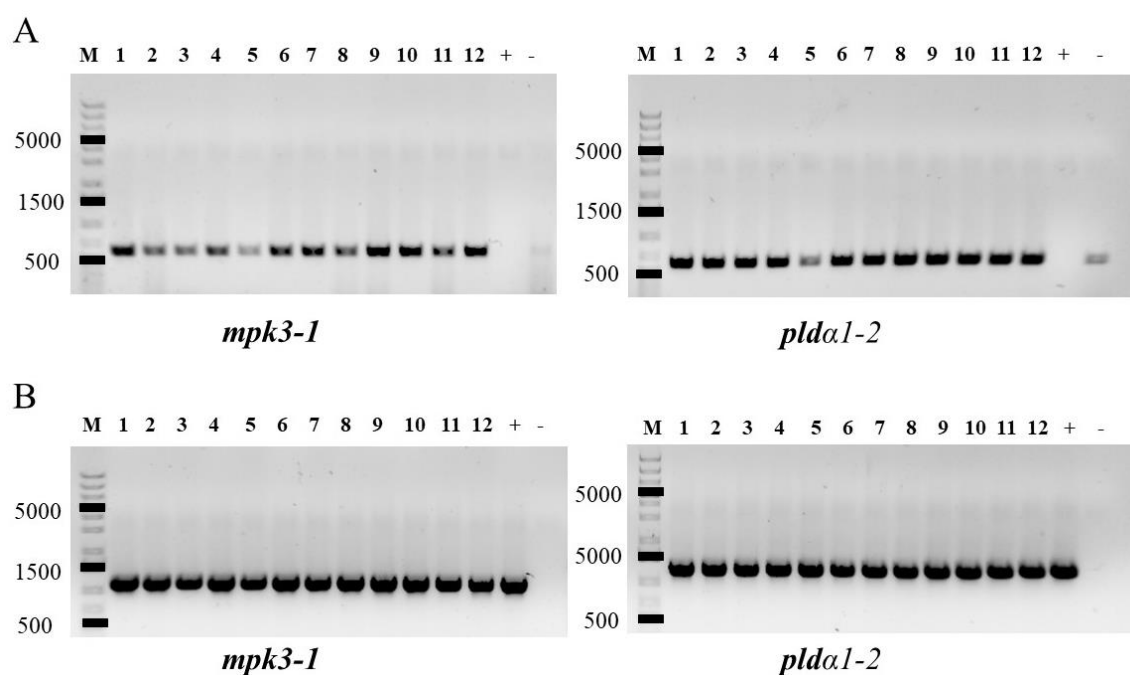
Obr. 8 Výsledok elektroforézy na 1% agarózovom géle pri genotypizácii *mpk3-1* mutantných rastlín. **A** sada primerov pre T-DNA inzert, **B** sada primerov pre gén, M = (1kb) marker, 1 až 7 (okrem 6) = homozygotné *mpk3-1* mutantné rastliny 6 = reakcia PCR neprebehla (táto rastlina nebola použitá v ďalších experimentoch), + = kontrolné rastliny Col-0, - = negatívna kontrola (bez prítomnosti templátu). Predpokladaná veľkosť hraničného ampliconu pre sadu primerov LBb1.3+RP je 546-846 bp. Pre sadu LP+RP je 1229 bp.



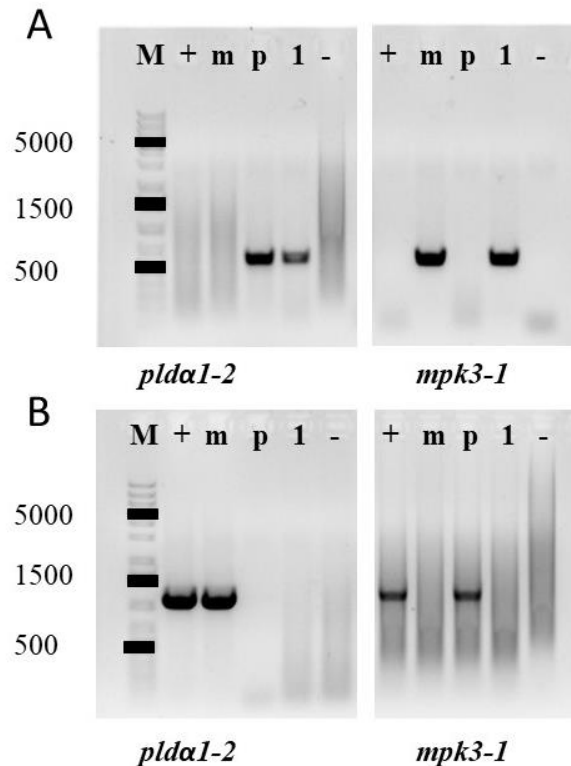
Obr. 9 Výsledok elektroforézy na 1% agarózovom géle pri genotypizácii *plda1-2* mutantných rastlín. **A** sada primerov pre T-DNA inzert, **B** sada primerov pre gén, M = (1kb) marker, 1 až 15 (okrem 6) = homozygotné *plda1-2* mutantné rastliny, + = kontrolné rastliny Col-0, - = negatívna kontrola (bez prítomnosti templátu), 6 = heterozygotná rastlina (táto rastlina nebola použitá v ďalších experimentoch). Predpokladaná veľkosť hraničného ampliconu pre sadu primerov LBb1.3+RP je 511-811 bp. Pre sadu LP+RP je 1109 bp.

## 4.2 Genotypizácia *mpk3-1 x plda1-2* mutanta

Semená ktoré vznikli po krížením homozygotných *mpk3-1* a *plda1-2* rastlín boli sterilizované a vysadené na Petriho misky. Po vyklíčení rastlín bola prevedená PCR reakcia a identifikovala sa heterozygotná línia dvojitého *mpk3-1 x plda1-2* mutanta tejto F1 generácie (Obr. 10). Templát slúžil v dvoch reakciách, čo znamená, že pri PCR reakcii bola použitá sada primerov pre *mpk3-1* i pre *plda1-2* mutantov. Annealing – nasadnutie primerov prebehlo pri jednotnej teplote 65,5 °C. Veľkosť amplikonu a prítomnosť heterozygotných alel bola overená pomocou elektroforézy na 1 % agarózovej géle po ukončení PCR reakcie. Z heterozygotnej línie F1 bola v nasledujúcej generácii F2 identifikovaná homozygotná rastlina dvojitého *mpk3-1 x plda1-2* mutanta. Prítomnosť homozygotných alel bola overená pomocou PCR reakcie a výsledok bol vyhodnotený pomocou elektroforézy na 1 % agarózovom géle (Obr. 11). Semená z identifikovaných heterozygotných i homozygotných mutantných *mpk3-1 x plda1-2* rastlín sa zozbierali a boli uskladnené pre ďalšie experimenty.



Obr. 10 Výsledok elektroforézy na 1% agarózovom géle pri genotypizácii heterozygotných *mpk3-1 x plda1-2* mutantných rastlín v F1 generácii. **A** sada primerov pre T-DNA inzert, **B** sada primerov pre gén, M = (1kb) marker, + = kontrolné rastliny Col-0, - = negatívna kontrola (bez prítomnosti templátu), 1 až 12 = *mpk3-1 x plda1-2* mutanti.



Obr. 11 Výsledok elektroforézy na 1% agarózovom géle pri genotypizácii homozygotnej *mpk3-1 x plda1-2* mutantnej rastliny v F2 generácii. **A** sada primerov pre T-DNA inzert, **B** sada primerov pre gén, M = (1kb) marker, + = kontrolná rastlina Col-0, - = negatívna kontrola (bez prítomnosti templátu), 1 = *mpk3-1 x plda1-2* mutant, m = *mpk3-1* mutant, p = *plda1-2* mutant.

### 4.3 Fenotypová analýza vybraných rastlín

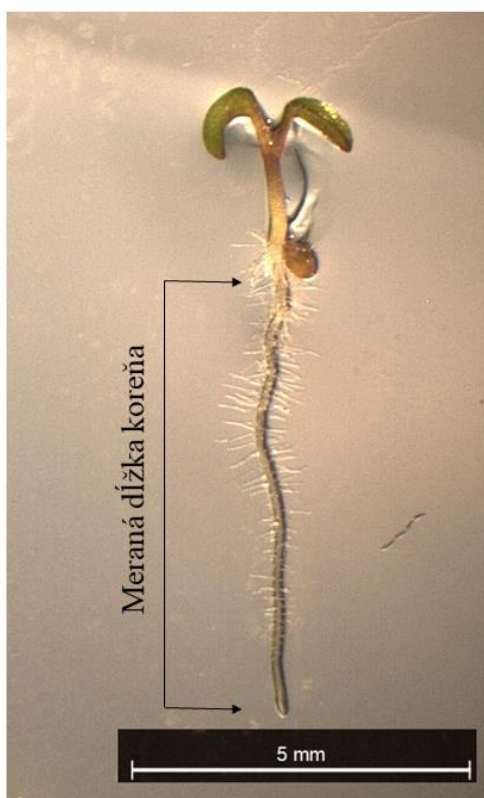
Fenotypová analýza môže byť využitá k potvrdeniu jednotlivých mutantov tým, že sa pozorujú fenotypové vlastnosti mutantov oproti divokému typu (Krysan *et al.*, 1999).

Jednotlivé fenotypové znaky rastlín sa pozorovali v určitých časových intervaloch. Bola meraná dĺžka hlavného koreňa od koreňovej špičky po hypokotyl, dĺžka koreňovej špičky po prvý koreňový vlások. Jednotlivé druhy mutantov a kontrolné rastliny boli vysadené v rovnakom čase na ½ MS médium po 10 semien a vložené do chladničky na 5 dní z dôvodu stratifikácie. Následne Petriho misky boli vytiahnuté a prenesené do fytotrónu.

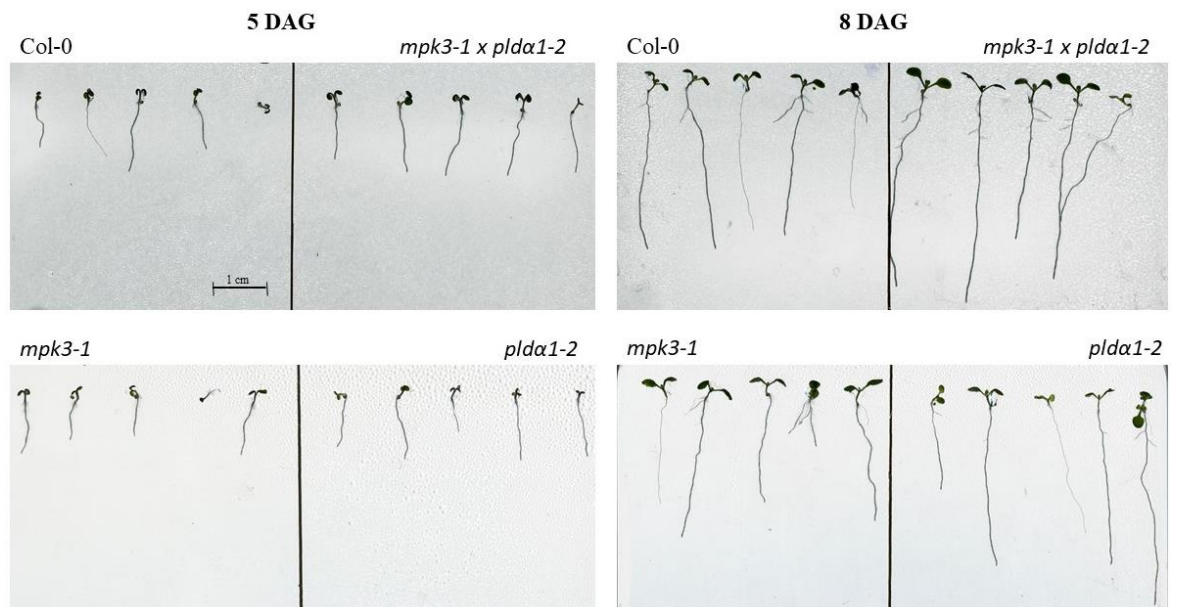
Dĺžka hlavného koreňa bola nameraná od koreňovej špičky po hypokotyl (Obr. 12). Pomocou scanneru boli nasnímané jednotlivé rastliny na Petriho miskách (Obr. 13) a jednotlivé výsledky boli spracované ImageJ softwarom, vyhodnotené a vynesené do grafu pomocou Microsoft Office Excel (Obr. 14). Táto dĺžka koreňov sa merala v dvoch časových intervaloch a to 5 DAG (deň po vyklíčení) a 8 DAG. Ako kontrolná rastlina



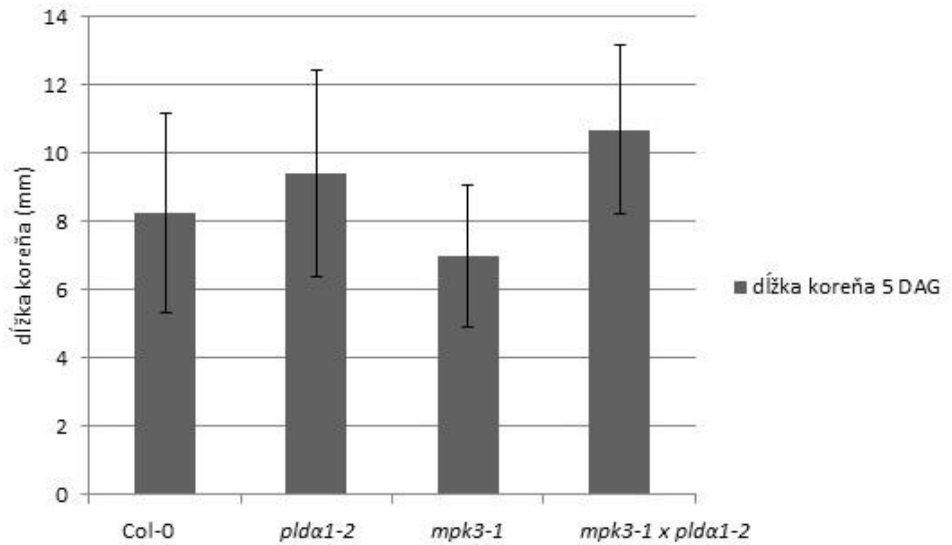
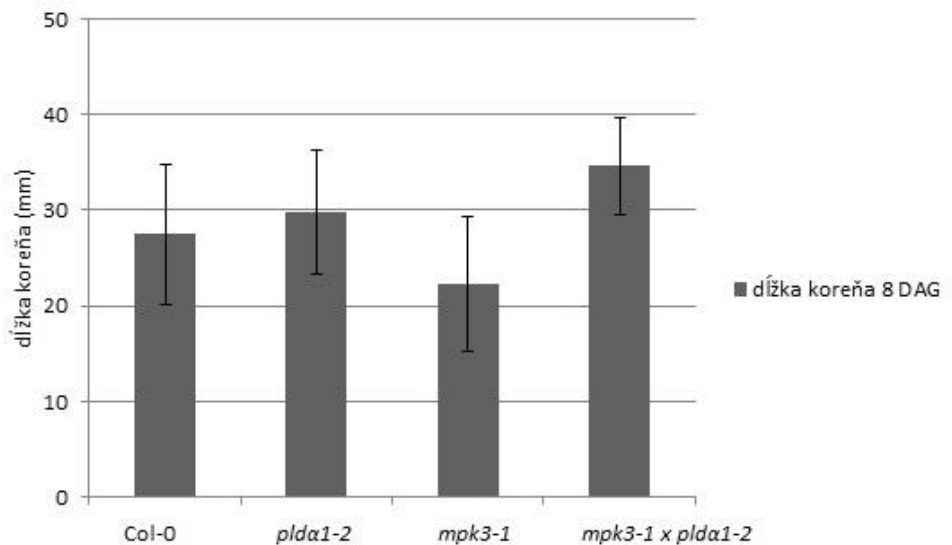
bola použitá Col-0. Dvojité *mpk3-1 x plda1-2* mutanti vykazovali najvyššiu priemernú dĺžku nameraného koreňa, teda presahovali priemernú dĺžku Col-0, *mpk3-1* i *plda1-2* mutanta. Na 5 DAG priemerná dĺžka koreňa *mpk3-1 x plda1-2* mutanta presahovala 10 mm, zatiaľ čo 8 DAG 30 mm. Priemerná dĺžka *plda1-2* mutanta bola vyššia ako dĺžka Col-0 avšak nižšia než dĺžka dvojitého *mpk3-1 x plda1-2* mutanta. Najnižšia priemerná dĺžka koreňa bola zaznamenaná u *mpk3-1* mutanta, ktorý nepresiahol dĺžku Col-0. Na základe získaných meraní možno posúdiť, že dvojité *mpk3-1 x plda1-2* mutant vykazoval najväčšiu dĺžku hlavného koreňa oproti jednoduchým mutantom i kontrolnej rastline.



Obr. 12 Znáročenie meraného úseku hlavného koreňa rastliny od koreňovej špičky po hypokotyl. Na obrázku *mpk3-1 x plda1-2* mutantná rastlina sfotená pomocou binokulárneho mikroskopu. Mierka: 5 mm.



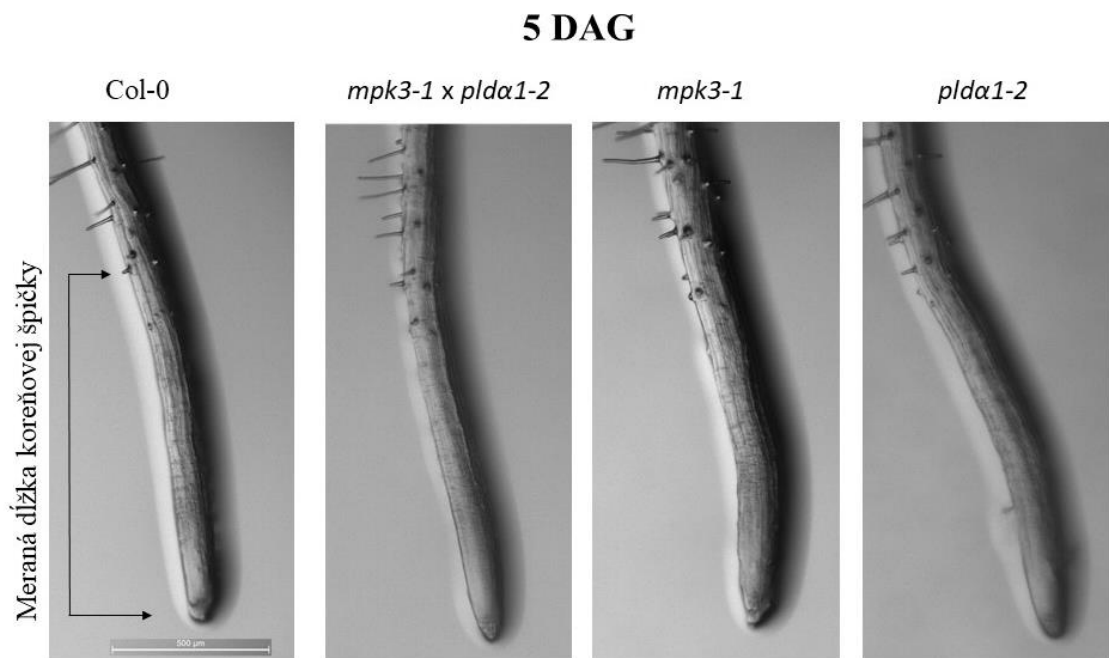
Obr. 13 Fotografická dokumentácia rastlín Col-0, *mpk3-1*, *plda1-2* a *mpk3-1 x plda1-2* 5 DAG a 8 DAG použitá na fenotypovú analýzu dĺžky hlavného koreňa. Col-0 použitá ako kontrolná rastlina. Fotky získané pomocou skenovacieho zariadenia. Mierka: 1 cm.

**A****B**

Obr. 14 Grafy znázorňujúci priemernú dĺžku hlavného koreňa rastlín Col-0, *mpk3-1*, *plda1-2* a *mpk3-1 x plda1-2*. **A** priemerná dĺžka na 5 DAG u jednotlivých rastlín, **B** priemerná dĺžka na 8 DAG u jednotlivých rastlín. Úsečky zobrazujúce smerodajnú odchýlku.

Ďalším fenotypovým znakom bola pozorovaná dĺžka koreňovej špičky po prvý koreňový vlások. Meranie prebiehalo v dvoch časových intervaloch a to 5 DAG (Obr. 15) a 8 DAG (Obr. 16). Jednotlivé rastliny boli fotograficky zdokumentované pomocou binokulárneho mikroskopu, vyhodnotené ImageJ softwarom a výsledky boli vynesené do grafov (Obr. 17). Na základe výsledkov možno zhodnotiť, že v 5 DAG najdlhšiu nameranú vzdialenosť vykazovali *mpk3-1 x plda1-2* mutantné rastliny. Nameraná priemerná dĺžka u dvojitého mutantu dosahovala takmer 1,4 mm, zatiaľ čo u *mpk3-1* mutantných rastlín nedosiahla ani 1 mm. Priemerná dĺžka u *plda1-2* mutantu dosahovala

1,2 mm. Tieto merania sa opakovali aj na 8 DAG. Namerané hodnoty u dvojitého *mpk3-1 x plda1-2* mutanta a u *plda1-2* boli skoro rovnaké. Mutantné *mpk3-1* rastliny opäť dosiahli najnižšie hodnoty.

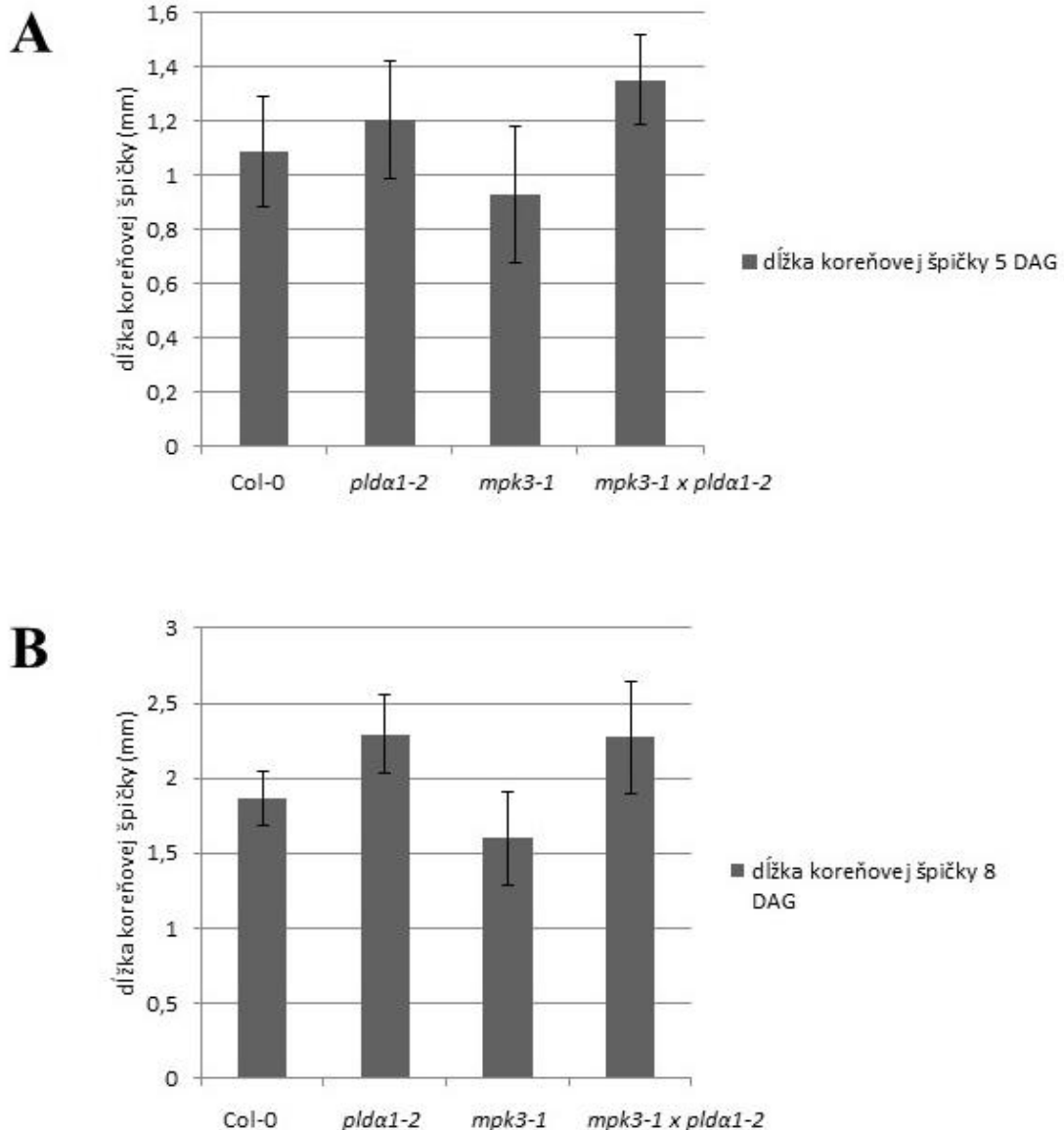


Obr. 15 Fotografická dokumentácia koreňových špičiek reprezentatívnych rastlín Col-0, *mpk3-1*, *plda1-2* a *mpk3-1 x plda1-2* 5 DAG. Meraná dĺžka od špičky koreňa po prvý koreňový vlások. Mierka: 500 µm.

## 8 DAG



Obr. 16 Fotografická dokumentácia koreňových špičiek reprezentívnych rastlín Col-0, *mpk3-1*, *plda1-2* a *mpk3-1 x plda1-2* 8 DAG. Meraná dĺžka od špičky koreňa po prvý koreňový vlások. Mierka: 1 mm.



Obr. 17 Graf znázorňujúci priemernú dĺžku koreňovej špičky u rastlín Col-0, *mpk3-1*, *plda1-2* a *mpk3-1 x plda1-2*. **A** priemerná dĺžka koreňovej špičky 5 DAG u jednotlivých rastlín, **B** priemerná dĺžka koreňovej špičky 8 DAG u jednotlivých rastlín. Úsečky zobrazujúce smerodajnú odchýlku.

Organizmus s jednou recesívnou bezfunkčnou alelou má väčšinou fenotyp divokého typu, zatiaľ čo homozygotní jedinci, ktorí majú dve kópie vykazujú mutantný fenotyp (Gantz a Bier, 2015), čo bolo potvrdené pri fenotypovej analýze dvojitého *mpk3-1 x plda1-2* mutanta. Napriek tomu je nutné ďalšie overenie nie len transkriptu dvojitého *mpk3-1 x plda1-2* mutanta pomocou qPCR ale aj overenie prítomnosti proteínu pomocou metódy western blot. Avšak na základe štúdií bolo zistené, že mnohé knockout mutanty nemajú ľahko identifikovateľný fenotyp (Krysan *et al.*, 1999). Napríklad štúdie poukazujú, že knockout *plda1* mutanty nevykazujú významné fenotypové zmeny oproti

kontrolným rastlinám (Fan *et al.*, 1997, Zhang *et al.*, 2012), avšak v tejto bakalárskej práci bol zaznamenaný rozdielny fenotyp jednoduchého *plda1-2* mutanta oproti kontrolnej rastline. Tento fenotyp je však treba overiť nezávislým opakovaním experimentu a štatistickým vyhodnotením, pretože bol z časových dôvodov prevedený len jedenkrát. Toto opakovanie bude predmetom ďalších štúdií mutantných rastlín *mpk3-1 x plda1-2*. Ďalším možným dôvodom nedostatku pozorovateľných fenotypových rozdielov je to, že individuálny členovia génových rodín môžu byť funkčný len za špecifických fyziologických podmienok. Takže pokiaľ nie je mutantná rastlina umiestnená do stavu, ktorý je požadovaný cieľovým génom, nie je pozorovaný žiadny fenotyp (Hirsch *et al.*, 1998). Tento stav môže byť navodený napríklad pomocou rôznych stresov, ako je poranenie (Wang *et al.*, 2000), pôsobenie kyseliny abscisovej (Jiang *et al.*, 2014), či napríklad soli (Novák *et al.*, 2018). Ďalšou z možností prečo nebol fenotyp u jednoduchých *plda1* mutantov pozorovaný je, že keď rodinná PLD proteínov číta 12 členov (Wang *et al.*, 2012), môže dochádzať k ich vzájemnému zastúpeniu.

Podľa databázy PhosPhAt 4.0, dostupnej na adrese <http://phosphat.uni-hohenheim.de/> (Durek *et al.*, 2010) obsahuje proteín PLD $\alpha$ 1 vo svojej sekvencii aminokyselínu serín v pozícii 481 (S481) s vysokým skóre možnej fosforylácie. Toto skóre je rovné 1,636. Na základe zatiaľ nepublikovaných dát z Oddelenia bunkovej biológie CRH, by malo dochádzať k interakcii medzi proteínmi PLD $\alpha$ 1 a MPK3. Navyše podľa kinázových štúdií bola potvrdená fosforylácia PLD $\alpha$ 1 proteínu pomocou MPK3. Práve tento serín S481 by mohol byť potenciálnym kandidátom na fosforyláciu PLD $\alpha$ 1 proteínu od proteínu MPK3, čo by v odpovedi na stres mohlo viesť k aktivácii PLD $\alpha$ 1 a následne produkcii PA, ako druhého posla, ktorý by prenášal signál v odpovedi na stres. Pre ďalšie štúdie a potvrdenie možnej interakcie medzi PLD $\alpha$ 1 a MPK3 bol v tejto práci pripravený dvojitý mutant *mpk3-1 x plda1-2*, ktorý bude ďalej využitý behom štúdií tejto interakcie.

## 5. ZÁVER

Teoretická časť tejto práce bola zameraná na signalizačné dráhy mitogén-aktivovaných proteínkináz (MAPK) a popis ich jednotlivých komponentov MAPKKK, MAPKK a MAPK, ktoré vykonávajú rôznorodé úlohy v organizmoch, ale predovšetkým sú zapojené v odpovedi na stres. Takisto bola spomenutá aj samotná MPK3 a jej úloha v bunke. Ďalej bola teoretická časť zameraná na fosfolipázy, ich štruktúru, aktivitu i priemyselné využitie a potom hlavne na fosfolipázu Da. Takisto v tejto časti boli opísané aj výhody využitia rastliny *Arabidopsis thaliana* ako modelový organizmus.

Experimentálna časť tejto práce bola zameraná na identifikácii homozygotných mutantných *mpk3-1* a *plda1-2* rastlín pomocou genotypovania. Tieto rastliny slúžili k vzájomnému skríženiu a vzniku dvojitéch mutantných *mpk3 x plda1* rastlín. Najprv sa identifikovala heterozygotná línia dvojitéch mutantných *mpk3 x plda1* rastlín, z ktorej sa odvodila stabilná homozygotná línia dvojitéch mutantných *mpk3-1 x plda1-2* rastlín. Ku genotypizácii jednotlivých rastlín bola využitá PCR metóda, pre ktorú boli vybrané príslušné primery. Primery boli navrhnuté pomocou program T-DNA Primer Design a teplota nasadenia primerov pri PCR reakcii bola vypočítaná pomocou TM kalkulačky. Jednotlivé primery v určitých kombináciách (RP, LP, LBb1.3) umožnili pomocou PCR identifikáciu prítomnosti prirodzeného génu *MPK3*, respektíve *PLDa1* a T-DNA inzertu. Veľkosť amplikonu a prítomnosť heterozygotných, či homozygotných alel bola overená pomocou elektroforézy na 1 % agarózovej géle po ukončení PCR reakcie. Nakoniec bola prevedená fenotypová analýza vybraných homozygotných dvojitéch *mpk3 x plda1* mutantných rastlín, ktoré boli porovnávané s fenotypom rastliny Col-0, ale aj *mpk3* a *plda1* mutantnými rastlinami. Všetky rastliny boli vysadené v rovnakom čase a za rovnakých podmienok. Pri tejto analýze boli pozorované dĺžky hlavného koreňa a to v dvoch časových intervaloch; 5. deň po vyklíčení a 8. deň po vyklíčení. Druhým fenotypovým znakom boli pozorované koreňové špičky po prvý koreňový vlások a to takisto v 5. deň po vyklíčení a v 8. deň po vyklíčení. Všetky semená z vybraných dvojitéch mutantných rastlín *mpk3-1 x plda1-2* boli uskladnené k ďalším experimentom.



## 6. ZOZNAM POUŽITEJ ILITERATÚRY

- Abousalham A., Riviere M., Teissere M. and Verger R. (1993): Improved purification and biochemical characterization of phospholipase D from cabbage. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1158**, 1-7.
- Ahlfors R., Macioszek V., Rudd J., Brosche M., Schlichting R., Scheel D., Kangasjarvi J. (2004): Stress hormone-independent activation and nuclear translocation of mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis thaliana* during ozone exposure. *Plant Journal* **40**, 512-522.
- Alessi D.R., Saito Y., Campbell D.G., Cohen P., Sithanandam G., Rapp U., Ashworth A., Marshall C.J., Cowley S. (1994): Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. *THE EMBO JOURNAL* **13**, 1610-1619.
- Alonso-Blanco C., Andrade J., Becker C., Bemm F., Bergelson J., Borgwardt K. M., Cao J., Chae E., Dezwaan T. M., Ding W., Ecker J. R., Exposito-Alonso M., Farlow A., Fitz J., Gan X., Grimm D. G., Hancock A. M., Henz S. R., Holm S., Horton M., Jarsulic M., Kerstetter R. A., Korte A., Korte P., Lanz Ch., Lee Ch., Meng D., Michael T. P., Mott R., Mulyati N. W., Nägele T., Nagler M., Nizhynska V., Nordborg M., Novikova P. Y., Picó F. X., Platzer A., Rabanal F. A., Rodriguez A., Rowan B. A., Salomé P. A., Schmid K. J., Schmitz R. J., Seren Ü., Sperone F. G., Sudkamp M., Svardal H., Tanzer M. M., Todd D., Volchenboum S. L., Wang C., Wang G., Wang X., Weckwerth W., Weigel D., Zhou X. (2016): 1,135 Genomes Reveal the Global Pattern of Polymorphism in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* **166**, 481-491.
- Asai T., Tena G., Plotnikova J., Willmann M.R., Chiu W-L., Gomez-Gomez L., Boller T., Ausubel F.M., Sheen J. (2002): MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* **415**, 977-983.
- Ashworth A., Nakielny S., Cohen P., Marshall C. (1992): The amino acid sequence of a mammalian MAP kinase kinase. *Oncogene* **7**, 2555-2556.
- bar.utoronto.ca home page: <http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi> (22.4.2018)
- Bargmann B.O., Munnik T. (2006): The role of phospholipase D in plant stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* **9**, 515-522.
- Bargmann B.O.R., Laxalt A.M., Riet B., Schooten B., Merquiol E., Testerink C., Haring M.A., Bartels D., Munnik T. (2009): Multiple PLDs required for high salinity and water deficit tolerance in plants. *Plant Cell Physiology* **50**, 78-89.
- Baud S., Boutin J.P., Miquel M., Lepiniec L., Rochat Ch. (2002): An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. *Plant Physiology and Biochemistry* **2**, 151-160.
- Borrelli G.M., Trono D. (2015): Recombinant Lipases and Phospholipases and Their Use as Biocatalysts for Industrial Applications. *International Journal of Molecular Sciences* **16**, 20774-840.
- Brown H.A., Gutowski S., Moomaw C.R., Slaughter C., Sternweis P.C. (1993): ADP-ribosylation factor, a small GTP-dependent regulatory protein, stimulates phospholipase D activity. *Cell* **75**, 1137-1144.
- Calderini O., Glab N., Bergounioux C., Heberle-Bors E., Wilson C. (2001): A Novel Tobacco Mitogen-activated Protein (MAP) Kinase Kinase, NtMEK1, Activates the Cell Cycle-regulated p43<sup>Ntif6</sup> MAP Kinase. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 18139-18145.
- Clemens S. (2001): Developing tools for phytoremediation: towards a molecular understanding of plant metal tolerance and accumulation. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health* **14**, 1235-9.
- Cockram J., Jones H., Leigh F.J., O'Sullivan D., Powell W., Laurie D.A., Greenland A.J. (2007): Control of flowering time in temperate cereals: Genes, domestication, and sustainable productivity. *Journal of Experimental Botany* **58**, 1231-1244.
- Colcombet J., Hirt H. (2008): *Arabidopsis* MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochemical Journal* **413**, 217-226.
- Corbesier L., Coupland G. (2005): Photoperiodic flowering of *Arabidopsis*: integrating genetic and physiological approaches to characterization of the floral stimulus. *Plant, Cell & Environment* **28**, 54-66.

- Crews C., Alessandrini A., Erikson R. (1992): The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science* **258**, 478-480.
- De Maria L., Vind J., Oxenbøll K.M., Svendsen A., Patkar S. (2007): Phospholipases and their industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* **74**, 290-300.
- Dennis, E.A. (1983): Phospholipases, In: *The Enzymes*, Vol. XVI, (Boyer P. ed.) New York, **9**, 307-353.
- Divecha N., Irvine R.F. (1995): Phospholipid signaling. *Cell* **80**, 269-278.
- Drobak B.K. (1993): Plant Phosphoinositides and Intracellular Signaling. *Plant Physiology* **102**, 705-709.
- Droillard M.J., Thibivilliers S., Cazale A.C., Barbier-Brygoo H., Lauriere C. (2000): Protein kinases induced by osmotic stresses and elicitor molecules in tobacco cell suspensions: two crossroad MAP kinases and one osmoregulation-specific protein kinase. *FEBS Letters* **474**, 217-222.
- Du G., Altshuller Y.M., Vitale N., Huang P., Chasserot-Golaz S., Morris A. J., Bader M.F., Frohman M.A. (2003): Regulation of phospholipase D1 subcellular cycling through coordination of multiple membrane association motifs. *The Journal of cell biology* **162**, 305-15.
- Duerr B., Gawienowski M., Ropp T., Jacobs T. (1993): MsERK1: a mitogen-activated protein kinase from a flowering plant. *Plant Cell* **5**, 87-96.
- Durek P., Schmidt R., Heazlewood J.L., Jones A., Maclean D., Nagel A., Kersten B., Schulze W.X. (2010): PhosPhAt: the Arabidopsis thaliana phosphorylation site database. An update. *Nucleic Acids Research* **38**, 828-834.
- Elias M., Potocky M., Cvrckova F., Zarsky V. (2002): Molecular diversity of phospholipase D in angiosperms, *BMC Genomics* **3**, 2.
- Ella K.M., Dolan J.W., Chen Q., Meier K.E. (1996): Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* deficient in expression of phospholipase D. *Biochemical Journal* **314**, 15-19.
- Errede B., Cade R.M., Yashar BM, Kamada Y., Levin D.E., Irie K., Matsumoto K. (1995): Dynamics and organization of MAP kinase signal pathways. *Molecular Reproduction and Development* **42**, 477-485.
- Fan L., Zheng S., and Wang X. (1997): Antisense suppression of phospholipase D a retards abscisic acid- and ethylene-promoted senescence of postharvest Arabidopsis leaves. *Plant Cell* **9**, 2183-2196.
- Fan L., Zheng S., Cui D., Wang, X. (1999): Subcellular distribution and tissue expression of phospholipase Da, Db, and Dg in Arabidopsis. *Plant Physiology*. **119**, 1371-1378.
- 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 N-terminal kinases? *Current Opinion in Genetics & Development* **7**, 67-74.
- Frye, C.A., Tang, D., and Innes, R.W. (2001): Negative regulation of defense responses in plants by a conserved MAPKK kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 373-378.
- 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**, 804-814.
- Gamba G. (2005) Role of WNK kinases in regulating tubular salt and potassium transport and in the development of hypertension. *American Journal of Physiology* **288**, 245–252.
- Gantz V. M., Bier E. (2015): The mutagenic chain reaction: a method for converting heterozygous to homozygous mutations. *Science (New York, N.Y.)* **348**, 442–444.
- Gómez-Gómez L., Boller T. (2000): FLS2: An LRR Receptor-like Kinase Involved in the Perception of the Bacterial Elicitor Flagellin in Arabidopsis. *Molecular Cell* **5**, 1003-1011.
- Gudesblat G.E., Iusem N.D., Morris P.C. (2007): Guard cell-specific inhibition of *Arabidopsis* MPK3 expression causes abnormal stomatal responses to abscisic acid and hydrogen peroxide. *New Phytol* **173**, 713-721.
- Guo Z., Vikbjerg A.F., Xu X. (2005): Enzymatic modification of phospholipids for functional applications and human nutrition. *Biotechnology advances* **23**, 203-59.

- Gustin M.C., Albertyn J., Alexander M., Davenport K. (1998): MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology* **62**, 1264-1300.
- Hamel L.P., Nicole M.C., Sritubtim S., Morency M.J., Ellis M., Ehltng J., Beaudoin N., Barbazuk B., Klessig D., Lee J., Martin G., Mundy J., Ohashi Y., Scheel D., Sheen J., Xing T., Zhang S., Seguin A., Ellis B.E. (2006): Ancient signals: comparative genomics of plant MAPK and MAPKK gene families. *Trends in Plant Science* **11**, 192-98.
- Hanahan D.J., Chaikoff I.L. (1947): A new phospholipide-splitting enzyme specific for the ester linkage between the nitrogenous base and the phosphoric acid grouping. *The Journal of biological chemistry* **169**, 699-705.
- Heller M. (1978): Phospholipase D. *Advances in Lipid Research* **16**, 267-326.
- Hirsch R.E., Lewis B.D., Spalding E.P., Sussman M.R. (1998): A role for AKT1 potassium channel in plant nutrition. *Science* **280**, 918-921.
- 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.
- Huang Y., Li H., Gupta R., Morris P.C., Luan S., Kieber J.J. (2000): AtMPK4, an *Arabidopsis* homolog of mitogen-activated protein kinase, is activated *in vitro* by AtMEK1 through threonine phosphorylation. *Plant Physiology* **122**, 1301-1310.
- Hughes W.E., Parker P.J. (2001): Endosomal localization of phospholipase D 1a and 1b is defined by the C-termini of the proteins, and is independent of activity. *The Biochemical journal* **356**, 727-36
- Chang L., Karin M. (2001): Mammalian MAP kinase signaling cascades. *Nature* **410**, 37-40.
- Chapman K.D. (1998): Phospholipase activity during plant growth and development and in response to environmental stress. *Trends in Plant Science* **3**, 419-426.
- Chen Q., Boss W. F. (1991): Neomycin Inhibits the Phosphatidylinositol Monophosphate and Phosphatidylinositol Bisphosphate Stimulation of Plasma Membrane ATPase Activity. *Plant Physiology* **96**, 340-343.
- Cho S.K., Larue C.T., Chevalier D., Wang H., Jinn T.L., Zhang S., Walker J.C. (2008): Regulation of floral organ abscission in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 15629-34.
- Ichimura K., Mizoguchi T., Irie K., Morris P., Giraudat J., Matsumoto K., Shinozaki K. (1998): Isolation of AtMEKK1 (a MAP kinase kinase kinase) - interacting proteins and analysis of a MAP kinase cascade in *Arabidopsis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **253**, 532-543.
- Ichimura K., Shinozaki K., Tena G., Sheen J., Henry Y., Champion A., Kreis M., Zhang S., Hirt H., Wilson C., Heberle-Bors E., Ellis B. E., Morris P. C., Innes R. W., Ecker J. R., Scheel D., Klessig D. F., Machida Y., Mundy J., Ohashi Y., Walker J. C. (2002): Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends in Plant Science* **7**, 301-308.
- ion in *Plant Biology* **5**, 408-414.
- Jenkins G. M., Frohman M. A. (2005): Phospholipase D: a lipid centric review. *Cellular and molecular life sciences* **62**, 2305-16.
- Jiang Y., Wu K., Lin F., Qu Y., Liu X., Zhang Q. (2014): Phosphatidic acid integrates calcium signaling and microtubule dynamics into regulating ABA-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. *Planta* **239**, 565-575.
- Jouannic S., Hamal A., Leprince A.S., Tregear J.W., Kreis M., Henry Y. (1999): Plant MAP kinase kinase kinases structure, classification and evolution. *Gene* **233**, 1-11.
- Jump A.S., Peñuelas J. (2005), Running to stand still: adaptation and the response of plants to rapid climate change. *Ecology Letters*, **8**, 1010-1020.
- Jung C., Müller A.E. (2009): Flowering time control and applications in plant breeding. *Trends in Plant Science* **14**, 563-573.
- Keshet Y., Seger R. (2010): The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions. *Methods in Molecular Biology* **661**, 3-38.

- Kieber J., Rothenberg M., Roman G., Feldmann K.A., Ecker J.R. (1993): CTR1 a negative regulator of the ethylene response pathway in Arabidopsis encodes a member of the Raf family of protein kinases. *Cell* **72**, 427-441.
- Koornneef M., Meinke D. (2010): The development of Arabidopsis as a model plant. *The Plant Journal* **61**, 909-921.
- Kopka J., Pical C., Hetherington A.M., Muller-Rober B. (1998): Ca<sup>2+</sup>/phospholipid-binding (C-2) domain in multiple plant proteins: novel components of the calcium-sensing apparatus. *Plant Molecular Biology* **36**, 627-637.
- Korves T.M., Schmid K.J., Caicedo A.L., Mays C., Stinchcombe J.R., Purugganan M.D., Schmitt J. (2007): Fitness effects associated with the major flowering time gene FRIGIDA in *Arabidopsis thaliana* in the field. *The American naturalist* **169**, 141-E157.
- Kosako H., Gotoh Y., Matsuda S., Ishikawa M., Nishida E. (1992): Xenopus MAP kinase activator is a serine/threonine/tyrosine kinase activated by threonine phosphorylation. *THE EMBO JOURNAL* **11**, 2903-2908.
- Kosetsu K., Matsunaga S., Nakagami H., Colcombet J., Sasabe M., Soyano T., Takahashi Y., Hirt H., Machida Y. (2010): The MAP kinase MPK4 is required for cytokinesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **22**, 3778-90.
- Krysan P.J., Young J.C., Sussman M.R. (1999): T-DNA as an Insertional Mutagen in Arabidopsis. *The Plant Cell* **11**, 2283-2290.
- Krysan P.J., Young J.C., Tax F., Sussman M.R. (1996): Identification of transferred DNA insertions within Arabidopsis genes involved in signal transduction and ion transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 8145-8150.
- Lasky J.R., Des Marais D.L., McKay J.K., Richards J.H., Juenger T.E., Keitt T.H. (2012): Characterizing genomic variation of *Arabidopsis thaliana*: the roles of geography and climate. *Molecular Ecology* **21**, 5512-29.
- Lempe J., Balasubramanian S., Sureshkumar S., Singh A., Schmid M., Weigel D. (2005): Diversity of flowering responses in wild *Arabidopsis thaliana* strains. *PLoS Genetics* **1**, 109-118.
- Lewis T.S., Shapiro P.S., Ahn N.G. (1998): Signal transduction through MAP kinase cascades. *Advances in Cancer Research* **74**, 49-139.
- Li W., Li M., Zhang W., Welti R., Wang X. (2004): The plasma membrane-bound phospholipase D $\delta$  enhances freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Biotechnology* **24**, 427-433.
- Lilbaek H.M., Broe M.L., Høier E., Fatum T.M., Ipsen R., Sørensen N.K. (2006): Improving the yield of Mozzarella cheese by phospholipase treatment of milk. *Journal of dairy science* **89**, 4114-25.
- Lin F., Qu Y., Zhang Q. (2014): Phospholipids: molecules regulating cytoskeletal organization in plant abiotic stress tolerance. *Plant Signaling & Behavior* **9**, e28337.
- 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*. *Plant Cell* **16**, 3386-99.
- Lu C., Han MH, Guevara-Garcia A, Fedoroff NV. (2002): Mitogen-activated protein kinase signaling in postgermination arrest of development by abscisic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**. 15812-15817.
- Madhani H.D., Fink G. (1998). The riddle of MAP kinase signaling specificity. *Trends in Genetics* **14**, 151-155.
- Mansfeld J., Ulbrich-Hofmann R. (2009): Modulation of phospholipase D activity *in vitro*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1791**, 913-26.
- Marshall CJ. (1994): MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Current Opinion in Genetics & Development* **4**, 82-89.
- Matsuoka D., Nanmori T., Sato K., Fukami Y., Kikkawa U., Yasuda T. (2002): Activation of AtMEK1, an *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinase, *in vitro* and *in vivo*: analysis of active mutants expressed in *E. coli* and generation of the active form in stress response in seedlings. *Plant Journal* **29**, 637-647.

- McDermott M., Wakelam M. J., Morris A. J. (2004): Phospholipase D. *Biochemistry and cell biology* **82**, 225-53.
- McKinney E.C., Ali N., Traut A., Feldmann K.A., Belostotsky D.A., McDowell J.M., Meagher R.B. (1995): Sequence-based identification of T-DNA insertion mutations in Arabidopsis: Actin mutants act2-1 and act4-1. *The Plant Journal* **8**, 613–622.
- Meinke D.W., Cherry J.M., Dean C., Rounsley S.D., Koornneef M. (1998): *Arabidopsis thaliana*: A model plant for genome analysis. *Science* **282**, 662-682.
- Meng X., Wang H., He Y., Liu Y., Walker J.C., Torii K.U., Zhang S. (2012): A MAPK cascade downstream of ERECTA receptor-like protein kinase in regulating *Arabidopsis* inflorescence architecture by promoting localized cell proliferation. *Plant Cell* **24**, 4948-60.
- Meng X., Zhang S. (2013): MAPK cascades in plant disease resistance signaling. *Annual Review of Phytopathology* **51**, 245-266.
- Meskiene I. Bögre L., Glaser W., Balog J., Brandstotter M., Zwerger K., Ammerer G., Hirt H. (1998): MP2C, a plant protein phosphatase 2C functions as a negative regulator of mitogen-activated protein kinase pathways in yeast and plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 1938-1943.
- Michael T.P., Salomé P.A., Yu H.J., Spencer T.R., Sharp E.L., McPeck M.A., Alonso J.M., Ecker J.R., McClung C.R. (2003): Enhanced fitness conferred by naturally occurring variation in the circadian clock. *Science* **302**, 1049-1053.
- Mitchell-Olds T. (2001): *Arabidopsis thaliana* and its wild relatives: a model system for ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution* **16**, 693-700.
- Mitchell-Olds T., Schmitt J. (2006) Genetic mechanisms and evolutionary significance of natural variation in *Arabidopsis*. *Nature* **441**, 947-952.
- Mizoguchi T., Ichimura K., Irie K., Morris P., Giraudat J., Matsumoto K., Shinozaki K. (1998): Identification of a possible MAP kinase cascade in *Arabidopsis thaliana* based on pairwise yeast two-hybrid analysis and functional complementation tests of yeast mutants. *FEBS Letters* **437**, 56-60.
- Mizoguchi T., Irie K., Hirayama T., Hayashida N., Yamaguchi-Shinozaki K., Matsumoto K., Shinozaki K. (1996): A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold, and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 765-769.
- Morrice N. A., Turgeon B., Meloche S., Moens U., Keyse S. M. (2004): Activation of MK5/PRAK by the atypical MAP kinase ERK3 defines a novel signal transduction pathway. *THE EMBO JOURNAL* **23**, 4780-91.
- Morris P.C. (2001): MAP kinase signal transduction pathways in plants. *New Phytologist* **151**, 67-89.
- Munnik T., Musgrave A. (2001): Phospholipid Signaling in Plants: Holding On to Phospholipase D. *Science's STKE* **42**.
- Munnik T., Arisz S.A., de Vrije T., Musgrave A. (1995): G Protein Activation Stimulates Phospholipase D Signaling in Plants. *Plant Cell* **7**, 2197-2210.
- Nakazawa Y., Sagane Y., Sakurai S., Uchino M., Sato H., Toeda K., Takano K. (2011): Large-scale production of phospholipase D from *Streptomyces racemochromogenes* and its application to soybean lecithin modification. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **165**, 1494-1506.
- Neron S., El Amrani F., Potus J., Nicolas J. (2004): Separation and quantification by high-performance liquid chromatography with light scattering detection of the main wheat flour phospholipids during dough mixing in the presence of phospholipase. *Journal of Chromatography A* **1047**, 77-83.
- Nordborg M., Borevitz J.O., Bergelson J., et al. (2002): The extent of linkage disequilibrium in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics* **30**, 190-193.
- 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.

- O'Neil P. (1999): Selection on flowering time: An adaptive fitness surface for nonexistent character combinations. *Ecology* **80**, 806-820.
- Ohashi Y., Oka A., Rodrigues-Pousada R., Possenti M., Ruberti I., Morelli G., Aoyama T. (2003): Modulation of phospholipid signaling by GLABRA2 in root-hair pattern formation. *Science* **300**, 1427-1430.
- Paliyath G., Lynch D.V., Thompson J.E. (1987): Regulation of membrane phospholipid catabolism in senescing carnation flowers. *Physiologia Plantarum* **71**, 503-511.
- Pappan K., Qin W., Dyer J.H., Zheng L., Wang X. (1997)a: Molecular cloning and functional analysis of polyphosphoinositide-dependent phospholipase D, PLD $\beta$ , from *Arabidopsis*. *The Journal of Biological Chemistry* **272**, 7055-7061.
- Pappan K., Zheng S., Wang X. (1997)b: Identification and characterization of a novel plant phospholipase D that requires polyphosphoinositides and submicromolar calcium for activity in *Arabidopsis*. *The Journal of biological chemistry* **272**, 7048-54.
- Pearson G., Robinson F., Beers G.T., Xu B.E., Karandikar M., Berman K., Cobb M.H. (2001): Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine Reviews* **22**, 153-183.
- Pedley K.F., Martin G.B. (2005): Role of mitogen-activated protein kinases in plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology* **8**, 541-47.
- Picó F.X., (2012): Demographic fate of *Arabidopsis thaliana* cohorts of autumn- and spring-germinated plants along an altitudinal gradient. *Journal of Ecology* **100**, 1009-1018.
- Pitzschke A., Schikora A., Hirt H. (2009): MAPK cascade signalling networks in plant defence. *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 421-26.
- Pleskot R., Li J., Zarsky V., Potocky M., Staiger C.J. (2013): Regulation of cytoskeletal dynamics by phospholipase D and phosphatidic acid. *Trends in plant science* **18**, 496-504.
- Ponting C.P., Kerr, I.D. (1996): A novel family of phospholipase D homologues that include phospholipid synthases and putative endonucleases: Identification of duplicated repeats and potential active site residues. *Protein Science* **5**, 914-922.
- Ponting C.P., Parker P.J. (1996): Extending the C2 domain family: C2s in PKCs  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ , phospholipases, GAPs and perforin. *Protein Science* **5**, 162-166.
- Posas F., Saito H. (1998): Activation of the yeast SSK2 MAP kinase kinase by the SSK1 two-component response regulator. *THE EMBO JOURNAL*. **17**, 1385-1394.
- Qin C., Wang X. (2002): The *Arabidopsis* phospholipase D family. Characterization of a calcium-independent and phosphatidylcholine-selective PLD $\zeta$ 1 with distinct regulatory domains, *Plant Physiology* **128**, 1057-1068.
- Qin W., Pappan K., Wang X. (1997): Molecular Heterogeneity of Phospholipase D (PLD) cloning of PLD $\gamma$  and regulation of plant PLD $\gamma$ ,  $-\beta$ , and  $-\alpha$  by polyphosphoinositides and calcium. *The Journal of Biological Chemistry* **272**, 28267-28273.
- Ren D., Liu Y., Yang K.Y., Han L., Mao G., Glazebrook J., Zhang S. (2008): A fungal-responsive MAPK cascade regulates phytoalexin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 5638-43.
- Ren D., Yang H., Zhang S. (2002): Cell death mediated by MAPK is associated with hydrogen peroxide production in *Arabidopsis*. *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 559-65.
- Rivera R., Chun J. (2008): Biological effects of lysophospholipids. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* **160**, 25-46.
- Rodriguez M.C., Petersen M., Mundy J. (2010): Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* **61**, 621-49.
- Romeis T. (2001): Protein kinases in the plant defence response. *Current Opinion in Genetics & Development* **4**, 407-414.
- Rose K., Rudge S., Frohman M.A., Morris A.J., Engebrecht J. (1995): Phospholipase D signaling is essential for meiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 12151-12155.
- Roth M.G. (2008): Molecular mechanisms of PLD function in membrane traffic. *Traffic* **9**, 1233-9.

- Rudolph A.E., Stuckey J.A., Zhao Y., Matthews H.R., Patton W.A., Moss J., Dixon J.E. (1999): Expression, characterization, and mutagenesis of the *Yersinia pestis* murine toxin, a phospholipase D superfamily member. *The Journal of biological chemistry* **274**, 11824-31.
- Ryu S.B., Wang X. (1998): Increase in free linolenic and linoleic acids associated with phospholipase D-mediated hydrolysis of phospholipids in wounded castor bean leaves. *Biochimica et Biophysica Acta* **1393**, 193-202.
- Ryu S.B., Wang, X. (1995): Expression of Phospholipase D during Castor Bean Leaf Senescence. *Plant Physiology* **108**, 713-719.
- Saito M., Kanfer J. (1975): Phosphatidohydrolase activity in a solubilized preparation from rat brain particulate fraction. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **169**, 318-323.
- Sang Y., Cui D., Wang X. (2001a): Phospholipase D and phosphatidic acid-mediated generation of superoxide in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **126**, 1449-1458.
- Sang Y., Zheng S., Li W., Huang B. & Wang X. (2001b): Regulation of plant waterloss by manipulating the expression of phospholipase D $\alpha$ . *Plant Journal* **28**, 135-144.
- Scarcelli N., Kover P.X. (2009): Standing genetic variation in FRIGIDA mediates experimental evolution of flowering time in *Arabidopsis*. *Molecular Ecology* **18**, 2039-2049.
- Seger R., Seger D., Lozeman F.J., Ahn N.G., Graves L.M., Campbell J.S., Ericsson L., Harrylock M., Jensen A.M., Krebs E.G. (1992): Human T-cell mitogen-activated protein kinase kinases are related to yeast signal transduction kinases. *The Journal of Biological Chemistry* **267**, 25628-25631.
- Sells M.A., Chernoff J. (1997): Emerging from the Pak: the p21-activated protein kinase family. *Trends in Cell Biology* **7**, 162-167.
- Seternes O. M., Mikalsen T., Johansen B., Michaelsen E., Armstrong C. G., Morrice N.A., Turgeon B., Meloche S., Moens U., Keyse S.M. (2005): Activation of MK5/PRAK by the atypical MAP kinase ERK3 defines a novel signal transduction pathway. *The EMBO Journal* **23**, 4780-9.
- Schenk P.M., Kazan K., Manners J.M., Anderson J.P., Simpson R.S., Wilson I.W., Somerville S.C., Maclean D.J. (2003): Systemic gene expression in *Arabidopsis* during an incompatible interaction with *Alternaria brassicicola*. *Plant Physiology* **132**, 999-1010.
- Směkalová V., Doskočilová A., Komis G., Šamaj J. (2014): Crosstalk between secondary messengers, hormones and MAPK modules during abiotic stress signalling in plants. *Biotechnology advances* **32**, 2-11.
- Stafstrom J.P., Altschuler M., Anderson D.H. (1993): Molecular cloning and expression of a MAP kinase homologue from pea. *Plant Molecular Biology* **22**, 83-90.
- Stanacev N.Z., Stuhne-Sekalec L. (1970): On the mechanism of enzymatic phosphatidylation. Biosynthesis of cardiolipin catalyzed by phospholipase D. *Biochimica et Biophysica Acta* **210**, 350-2.
- Sugden P.H., Clerk A. (1997): Regulation of the ERK subgroup of MAP kinase cascades through G protein-coupled receptors. *Cell Signalling* **9**, 337-351.
- Sun Y., Wang Ch., Yang B., Wu F., Hao X., Liang W., Niu F., Yan J., Zhang H., Wang B., Deyholos M. K., Jiang Y. (2014): Identification and functional analysis of mitogenactivated protein kinase kinase kinase (MAPKKK) genes in canola (*Brassica napus* L.). *Journal of Experimental Botany* **65**, 2171-2188.
- Sung T.C., Altshuller Y.M., Morris A.J., Frohman M.A. (1999): Molecular Analysis of Mammalian Phospholipase D2. *Journal of biological chemistry* **274**, 494-502.
- Sung T.C., Roper R.L., Zhang Y., Rudge S.A., Temel R., Hammond S. M. Morris A.J., Moss B., Engebrecht J., Frohman M.A. (1997): Mutagenesis of phospholipase D defines a superfamily including a trans-Golgi viral protein required for poxvirus pathogenicity. *EMBO Journal* **16**, 4519-4530.
- Šimočková M., Griač P. (2009): Degradácia Fosfolipidov: Tvorba nového zo starého. *Chemické listy* **103**, 704–711.
- Takahashi F., Yoshida R., Ichimura K., Mizoguchi T., Seo S., Yonezawa M., Maruyama K., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (2007): The mitogen-activated protein kinase cascade MKK3-MPK6 is an important part of the jasmonate signal transduction pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**, 805-18.

- Tena G., Asai T., Chiu W.L., Sheen J. (2001): Plant mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Current Opinion in Plant Biology* **4**, 392-400.
- Tena G., Boudsocq M., Sheen J. (2011): Protein kinase signaling networks in plant innate immunity. *Current Opinion in Genetics & Development* **14**, 519-29.
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000): Analysis of the genome sequence of the oowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796-815.
- tolerance in plants. *Plant Cell Physiology* **50**, 78-89.
- Wang C., Zien C. A., Afithile M., Weilt R., Hildebrand D. F., Wang X. (2000): Involvement of Phospholipase D in wound-induced accumulation of jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**, 2237-2246.
- Wang H., Ngwenyama N., Liu Y., Walker J.C., Zhang S. (2007): Stomatal development and patterning are regulated by environmentally responsive mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**, 63-73.
- Wang J., Ding B., Guo Y., Li M., Chen S., Huang G., Xie X. (2014a): Overexpression of a wheat phospholipase D gene, *TaPLD $\alpha$* , enhances tolerance to drought and osmotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **240**, 103-15.
- Wang X. (1993): Phospholipases. In: *Lipid Metabolism in Plants*, (Moore T.S., ed.) Boca Raton, Florida, 505-525.
- Wang X. (2002): Phospholipase D in hormonal and stress signalling. *Current Opinion in Plant Biology* **5**, 408-414.
- Wang X. (2000): Multiple forms of phospholipase D in plants: the gene family, catalytic and regulatory properties, and cellular functions, *Progress in lipid research* **39**, 109-149.
- Wang X., Devaiah S.P., Zhang W., Welti R. (2006): Signaling functions of phosphatidic acid. *Progress in Lipid Research* **45**, 250-278.
- Wang X., Dyer J. H. and Zheng L. (1993): Purification and immunological analysis of phospholipase D from castor bean endosperm. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **306**, 486-494.
- Wang X., Guo L., Wang G., Li M. (2014b): PLD: phospholipase Ds in plant signaling. Springer, Berlin, 3-26.
- Wang X.Q., Ullah H., Jones A.M., Assmann S.M. (2001): G protein regulation of ion channels and abscisic acid signaling in *Arabidopsis* guard cells. *Science* **292**, 2070-2072.
- Wang Y., Liu K., Liao H., Zhuang C., Ma H., Yan X. (2008): The plant WNK gene family and regulation of flowering time in *Arabidopsis*. *Plant Biology* **10**, 548-562.
- Wilczek A.M., Roe J.L., Knapp M.C., Cooper M.D., Lopez-Gallego C., Martin L.J., Muir C.D., Sim S., Walker A., Anderson J., Egan J.F., Moyers B.T., Petipas R., Giakountis A., Charbit E., Coupland G., Welch S.M., Schmitt J. (2009): Effects of genetic perturbation on seasonal life history plasticity. *Science* **323**, 930-934.
- Wilson F.H., Disse-Nicodeme S., Choate K.A., Ishikawa K., Nelson-Williams C., Desitter I., Gunel M., Milford D.V., Lipkin G.W., Achard J.M. (2001): Human hypertension caused by mutations in WNK kinases. *Science* **293**, 1107-1112.
- Wu J., Harrison J.K., Vincent L.A., Haystead C., Haystead T.A.J., Michel H., Hunt D.F., Lynch K.R., Sturgill T.W. (1993): Molecular structure of a protein-tyrosine/threonine kinase activating p42 mitogen-activated protein (MAP) kinase: MAP kinase kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 173-177.
- Xie Z., Ho W.T., Exton J.H. (2000): Association of the N- and C-terminal domains of phospholipase D. Contribution of the conserved HKD motifs to the interaction and the requirement of the association for Ser/Thr phosphorylation of the enzyme. *The Journal of Biological Chemistry* **275**, 24962-24969.
- Xu B., English J.M., Wilsbacher J.L., Stippes S., Goldsmith E.J., Cobb M.H. (2000): WNK1, a novel mammalian serine/threonine protein kinase lacking the catalytic lysine in subdomain II. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 16795-16801.
- Xu J., Zhang S. (2015): Mitogen-activated protein kinase cascades in signaling plant growth and development. *Trends in plant science* **20**, 56-64.
- Xu Y., Seet L.F., Hanson B., Hong W. (2001): The Phox homology (PX) domain, a new player in phosphoinositide signalling. *The Biochemical journal* **360**, 513-30.



- Young S.A., Wang X., Leach J.E. (1996): Changes in the Plasma Membrane Distribution of Rice Phospholipase D during Resistant Interactions with *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*. *Plant Cell* **8**, 1079-1090.
- Zeng Q., Chen J.G., Ellis B.E. (2011): AtMPK4 is required for male-specific meiotic cytokinesis in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **67**, 895-906.
- Zhang A.L., Roomans G.M. (1999): Regulation of intracellular calcium by extracellular nucleotides in pig tracheal submucosal gland cells. *Respiration physiology* **118**, 237-46.
- 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*. *Plant Cell* **24**, 4555-4576.
- Zhang Q., Zhang W. (2016): Regulation of developmental and environmental signaling by interaction between microtubules and membranes in plant cells. *Protein Cell* **7**, 81-88.
- Zhang S. (2008): Mitogen-activated protein kinase cascades in plant intracellular signaling. In: *Annual Plant Reviews*, Vol. 33: Intracellular Signaling in Plants. (Yang Z. ed.), Oxford, Wiley-Blackwell, 100-136.
- Zhang S., Klessig D.F. (2001): MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends in Plant Science* **6**, 520-527.
- Zhang W., Qin C., Zhao J. & Wang X. (2004): Phospholipase D $\alpha$ -derived phosphatidic acid interacts with ABI1 phosphatase 2C and regulates abscisic acid signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 9508-9513.
- Zhang Y., Zhu H., Zhang Q., Li M., Yan M., Wang R., Wang L., Welti R., Zhang W., Wang X. (2009): Phospholipase D $\alpha$ 1 and phosphatidic acid regulate NADPH oxidase activity and production of reactive oxygen species in ABA-mediated stomatal closure in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**, 2357-2377.
- Zhang, W., Wang, C., Qin, C., Wood, T., Olafsdottir, G., Welti, R. & Wang, X. (2003): The oleate-stimulated phospholipase D, PLD $\delta$ , and phosphatidic acid decrease H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **15**, 2285-2295.
- Zhao J., Wang, X. (2004): Arabidopsis phospholipase D $\alpha$ 1 interacts with the heterotrimeric G-protein  $\alpha$ -subunit through a motif analogous to the DRY motif in G-protein-coupled receptors. *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 1794-1800.
- Zheng C.F., Guan K. (1994): Activation of MEK family kinases requires phosphorylation of two conserved Ser/Thr residues. *THE EMBO JOURNAL* **13**, 1123-1131.

## 7. ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

bp	párov bázy
Col-0	<i>A. thaliana</i> ekotyp Columbia
LP	ľavý primer
MAPK	mitogen-aktivované proteinkinázy
MAPKK (MAP2K, MKK)	mitogen-aktivované proteinkinázy kinázy
MAPKKK (MAP3K, MEKK)	mitogen-aktivované proteinkinázy kinázy kinázy
MPK3	mitogen-aktivovaná proteinkináza 3
MS	Murashige & Skoog
PCR	polymerazová reťazcová reakcia
PLD	Fosfolipáza D
ROS	reaktívne formy kyslíka
RP	pravý primer
SALK	Inštitút biologických štúdií (Jonas Edward Salk)
T-DNA	transferová DNA