



Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Wydział Biologii

Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii

Filip Mituła

**Określenie roli kinazy kaskady MAP - MAPKKK18
w regulacji sygnalizacji kwasu abscysynowego
u *Arabidopsis thaliana***

Praca doktorska przygotowana

w Zakładzie Biotechnologii

Promotor: prof. UAM dr hab. Agnieszka Ludwików

Poznań, 2018

Serdeczne podziękowania składam:

*Pani prof. UAM dr hab. Agnieszce Ludwików
za nieocenioną pomoc udzieloną w trakcie przygotowywania
pracy doktorskiej, pomoc w jasnym formułowaniu myśli
naukowej oraz motywację do krytycznego spojrzenia
na problematykę badawczą i ciągłego doskonalenia własnych
umiejętności*

*Panu prof. dr hab. Janowi Sadowskiemu za umożliwienie
realizacji pracy doktorskiej w Zakładzie Biotechnologii UAM*

*Pani mgr Małgorzacie Marczak, Pani mgr Małgorzacie
Tajdel-Zielińskiej, Pani dr Agacie Cieśli oraz Panu mgr inż.
Maciejowi Janickiemu za pomoc w przygotowaniu części
eksperymentów, dobre rady i miłą atmosferę w laboratorium*

*Pracownikom i doktorantom Zakładu Biotechnologii oraz
Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii UAM za wszelką
pomoc i codzienną serdeczność*

Finansowanie

Niniejsza praca powstała przy finansowym udziale:

1. Narodowego Centrum Nauki (grant 2012/05/B/NZ3/00352, „Składanie i aktywacja sygnałosomu kinazy MAPKKK18: charakterystyka nieznanej ścieżki sygnalizacji ABA”, kierownik grantu: prof. UAM dr hab. Agnieszka Ludwików)
2. KNOW Poznańskie Konsorcjum RNA (01/KNOW2/2014)

Publikacje

Wyniki badań zostały przedstawione w artykułach:

1. **Mitula F.**, Tajdel M., Cieśla A., Kasprowicz-Maluński A., Kulik A., Babula-Skowrońska D. et al. (2015) *Arabidopsis ABA-Activated Kinase MAPKKK18 is Regulated by Protein Phosphatase 2C ABI1 and the Ubiquitin-Proteasome Pathway*. Plant And Cell Physiology 56: 2351-2367.
2. **Mitula F.**, Kasprowicz-Maluński A., Michalak M., Marczak M., Kuczyński K., Ludwików A. (2015) *Protein Degradation Assays in Arabidopsis Protoplasts*. Bio-protocol Vol 5, Iss 4, 2/20/2015
3. Tajdel M., **Mitula F.**, Ludwików A. (2016) *Regulation of Arabidopsis MAPKKK18 by ABI1 and SnRK2, components of the ABA signaling pathway*. Plant Signaling & Behavior, 11:4.

Ponadto opublikowano następujące prace:

1. Ludwików A., Cieśla A., Kasprowicz-Maluński A., **Mitula F.**, Tajdel M., et al. (2014) *Arabidopsis protein phosphatase 2C ABI1 interacts with type I ACC synthases and is involved in the regulation of ozone-induced ethylene biosynthesis*. Molecular Plant 7:960–976.
2. Cieśla, A., **Mitula, F.**, Misztal, L., Fedorowicz-Strońska, O., Janicka, S., Tajdel-Zielińska, M. et al. (2016) *A Role for Barley Calcium-Dependent Protein Kinase CPK2a in the Response to Drought*. Frontiers in Plant Science 7;1550.

Spis treści

Wykaz skrótów.....	8
Streszczenie.....	10
Abstract.....	12
1. Wstęp.....	14
1.1 Kwas abscysynowy	14
1.1.1 Percepcja kwasu abscysynowego, rdzeniowa sygnalizacja ABA	16
1.2 Regulacja rozwoju aparatów szparkowych – rola czynników transkrypcyjnych SPCH, MUTE, FAMA.....	20
1.3 Proces zamykania aparatów szparkowych indukowany przez ABA	25
1.4 Kaskady kinaz MAP	27
1.4.1 Kinazy MAPKKK.....	28
1.4.1.1 Kaskada MAPKKK17/18-MKK3-MPK1/2/7/14	29
1.4.2 Kinazy MAPKK	31
1.4.3 Kinazy MAPK	33
2. Założenia i cel pracy	36
3. Materiały.....	37
3.1 Szczepy bakteryjne <i>Escherichia coli</i>	37
3.2 Materiał roślinny	37
3.3 Pożywki do hodowli.....	37
3.4 Enzymy	38
3.5 Odczynniki	39
4. Metody	40
4.1 Sterylizacja powierzchniowa	40
4.2 Hodowla i traktowanie roślin <i>Arabidopsis thaliana</i>	40
4.3 Krzyżowanie linii <i>Arabidopsis thaliana</i>	40
4.4 Transformacja <i>Arabidopsis thaliana</i> metodą agroinfiltracji	41
4.5 Przygotowanie komórek kompetentnych <i>E. coli</i> metodą rubidową.....	41
4.6 Transformacja bakterii	42
4.7 Hodowla bakterii <i>E. coli</i> w pożywce płynnej i izolacja plazmidowego DNA.....	42
4.8 Charakterystyka fenotypowa mutantów <i>Arabidopsis thaliana</i>	43
4.8.1 Analizy ruchów aparatów szparkowych.....	43
4.8.2 Analiza zagęszczenia aparatów szparkowych	43

4.9	Eksperymenty z wykorzystaniem białek.....	44
4.9.1	Izolacja białka z ekstraktów roślinnych	44
4.9.2	Immunoprecypitacja białka	45
4.9.3	Elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE).....	45
4.9.4	Badanie aktywności kinazowej	46
4.10	Przygotowanie konstruktów wektorowych	47
4.10.1	Wykorzystywane wektory	47
4.10.2	Trawienie restrykcyjne	50
4.10.3	Łańcuchowa reakcja polimerazy, PCR.....	51
4.10.4	Elektroforeza w żelu agarozowym	52
4.10.5	Przygotowanie wektorów wejściowych	52
4.10.6	Mutageneza ukierunkowana	52
4.10.7	Przygotowanie wektorów końcowych w systemie Gateway.....	53
4.11	Analizy z wykorzystaniem systemu przejściowej ekspresji w protoplastach	54
4.11.1	Izolacja, transfekcja i traktowanie protoplastów	54
4.11.2	Mikroskopia konfokalna.....	55
4.11.3	Analizy oddziaływań BiFC	55
4.11.4	Analizy lokalizacji subkomórkowej	56
5.	Wyniki.....	57
5.1	Wpływ hormonów roślinnych na aktywność kinazową MAPKKK18	57
5.2	Badanie wpływu MAPKKK18 na proces kiełkowania nasion	58
5.3	Wpływ aktywności MAPKKK18 na ruchy aparatów szparkowych.....	61
5.4	Badanie lokalizacji subkomórkowej MAPKKK18.....	64
5.5	Analiza oddziaływań MAPKKK18 z białkami rdzeniowej sygnalizacji ABA	69
5.6	Rola MAPKKK18 w regulacji rozwoju aparatów szparkowych	72
5.7	Analiza oddziaływań MAPKKK18 w kaskadach kinaz MAP.....	79
6.	Dyskusja.....	82
6.1	Specyficzność indukcji aktywności kinazowej MAPKKK18.....	82
6.1.1	Rola ABA w regulacji lokalizacji subkomórkowej MAPKKK18	83
6.1.2	MAPKKK18 jest zaangażowana w procesy regulowane przez sygnalizację ABA	85
6.2	MAPKKK18 oddziałuje z elementami rdzeniowej sygnalizacji ABA	86
6.3	MAPKKK18 oddziałuje z MKK3 wewnątrz kaskady kinaz MAP.....	89
6.4	MAPKKK18 zaangażowana jest w regulację podziałów komórek linii rozwojowej aparatów szparkowych.....	90

6.4.1 MAPKKK18 reguluje rozwój aparatów szparkowych niezależnie od kaskady YODA-(MKK4/5)/(MKK7/9)-MPK4/MPK6	91
7. Podsumowanie.....	95
Wykaz rycin.....	96
Literatura	98

Wykaz skrótów

Skrót	Znaczenie
ABA	Kwas abscysynowy
ABRE	Abscisic Acid Response Element
ACS	Aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase
AREB/ABF	ABRE-Binding Proteins/ ABRE-Binding Transcription Factor
BASL	Breaking of Asymmetry in the Stomatal Lineage
bHLH	Basic Helix-Loop-Helix
CDKB1;1	Cyclin Dependent Kinase B1;1
CHALf	CHALLAH family
CYCA2	Cyclin A-type, group 2
E	Kwas glutaminowy
EPF	Epidermal Patterning Factor
ETH	Etefon
FLP	Four Lips
GMC	Guard Mother Cell
GORK	Gated Outwardly-Rectifying K ⁺ Channel
ICE1/2	Inducer of CBF Expression 1/2
JA	Kwas jasmonowy
K	Lizyna
LRR-RLK	Leucine-Rich Repeat Receptor-Like Protein Kinases
M	Metionina
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAPKAPK	MAP Kinase-Activated Protein Kinase
MAPKTD	MAPK Target Domain
MMC	Meristemoid Mother Cell
MYB88	Myb Domain Protein 88
NLS	Nuclear Localization Sequence
nt	Nukleotydy
OST1	Open Stomata 1

PIP	Plasma Membrane Intrinsic Protein
PYR/PYL/RCAR	Pyrabactin Resistant/PYR-like/Regulatory Component of ABA Receptor
QUAC1	Quickly Activating Anion Channel 1
RbohF/H	Respiratory Burst Oxidase Homolog Protein F/H
RFT	Reaktywne formy tlenu
SA	Kwas salicylowy
SCRM1/2	Scream 1/2
SLAC1	Slow Activating Anion Channel 1
SLAH3	SLAC1 Homologue 3
SLGC	Stomatal Lineage Ground Cell
SnRK2	Sucrose Non-Fermenting Kinases, group 2
SPCH	Speechless
T	Treonina
TMM	Too Many Mouths
UV-R8	UV-Resistance Locus 8

Streszczenie

Kinazy aktywowane mitogenami (MAP) tworzą u roślin rozbudowane ścieżki sygnałowe w formie kaskad. Zwyczajowo, kaskada kinaz MAP zbudowana jest z trzech poziomów, a sygnał przekazywany jest poprzez fosforylację kolejnych kinaz MAP. Transdukcja sygnału poprzez kaskady MAP rozpoczyna się od aktywacji MAPKKK, które następnie fosforylują specyficzne MAPKK. Po aktywacji, MAPKK fosforylują kinazy MAPK, których celem aktywności jest szereg białek, w tym czynniki transkrypcyjne. Aktywacja kaskady kinaz MAP prowadzi do zmiany szeregu procesów komórkowych, takich jak ekspresja genów, regulacja podziałów komórkowych, a nawet indukowanie apoptozy. Kinazy kaskad MAP są silnie zaangażowane w odpowiedź na stresy środowiskowe, zarówno o podłożu biotycznym, jak i abiotycznym. Jednym z fitohormonów silnie związanym z odpowiedzią na stresy środowiskowe jest kwas abscysynowy (ABA). Poziom ABA w komórce wpływa nie tylko na szereg procesów rozwojowych, takich jak kiełkowanie nasion oraz elongacja korzeni, ale również jest kluczowy w procesie zamykania aparatów szparkowych w odpowiedzi na stres suszy i atak patogenów. Percepcja ABA w komórce opiera się na oddziaływaniach wewnątrz tzw. rdzeniowego modułu ABA, w skład którego wchodzi trzy grupy białek – fosfatazy PP2C grupy A, kinazy SnRK grupy 2 i receptory ABA, białka PYL/PYR/RCAR. Od dawna wiadomo, że pojedyncze kinazy MAP są rekrutowane przez sygnalizację ABA, jednak w momencie rozpoczynania tej pracy nie opisano żadnej kinazy MAPKKK zaangażowanej bezpośrednio w transdukcję sygnału ABA. Obiektem badań zawartych w niniejszej pracy jest MAPKKK18, niewielka (37 kDa) kinaza MAP zidentyfikowana u *Arabidopsis*, której ekspresja jest zależna od aktywności rdzeniowej sygnalizacji ABA. Aby ustanowić MAPKKK18 jako element sygnalizacji ABA, **podjęto próbę określenia mechanizmów regulujących aktywność MAPKKK18 oraz opisanie funkcji MAPKKK18 w regulacji procesów powiązanych z sygnalizacją ABA.** Aby określić profil aktywności MAPKKK18, zbadano jak hormony roślinne wpływają na aktywność kinazową MAPKKK18 i nie zaobserwowano zmiany aktywności MAPKKK18 pod wpływem etylenu, kwasu salicylowego oraz kwasu jasmonowego. Jednocześnie udokumentowano zmianę lokalizacji subkomórkowej MAPKKK18 w wyniku indukcji ABA i eksport MAPKKK18 z jądra komórkowego do cytoplazmy. Z wykorzystaniem techniki BiFC udowodniono, że MAPKKK18 oddziałuje bezpośrednio z elementami rdzeniowej sygnalizacji ABA – fosfatazą ABI1 i kinazą SnRK2.6/OST1. Na podstawie tych wyników postanowiono zbadać wpływ aktywności genu *MAPKKK18* na fenotypy powiązane z sygnalizacją ABA. W toku badań udowodniono,

że rośliny z nadekspresją genu *MAPKKK18* kiełkują silniej na pożywce suplementowanej ABA niż rośliny typu dzikiego, a ich aparaty szparkowe są bardziej zamknięte po traktowaniu egzogennym ABA. Wyłączenie aktywności genu *MAPKKK18* prowadzi natomiast do osłabienia siły kiełkowania i bardziej otwartych aparatów szparkowych pod wpływem ABA, w porównaniu z linią typu dzikiego. *MAPKKK18* jest również zaangażowana w regulację procesu tworzenia aparatów szparkowych - nadekspresja genu *MAPKKK18* prowadzi do większej liczby aparatów szparkowych na liścieniach *Arabidopsis*, podczas gdy wyłączenie aktywności genu *MAPKKK18* prowadzi do zmniejszenia zagęszczenia aparatów szparkowych. Regulacja zagęszczenia aparatów szparkowych w epidermie przez *MAPKKK18* stanowi niezależną ścieżkę od kaskady kinaz MAP rozpoczynającej się od kinazy YODA.

Przeprowadzone badania wykazały, że *MAPKKK18* oddziałuje z elementami rdzeniowej sygnalizacji ABA, aktywność kinazowa *MAPKKK18* jest specyficznie indukowana przez ABA, a w wyniku aktywacji *MAPKKK18* jest eksportowana z jądra komórkowego do cytoplazmy. W niniejszej pracy udokumentowano również wpływ *MAPKKK18* na znoszenie spoczynku nasion i zamykanie aparatów szparkowych, a także na regulację podziałów komórkowych w rozwoju komórek linii różnicowania szparek.

Abstract

In plants mitogen-activated protein kinases (MAPK) cascades are conserved and complex signal transduction modules. Usually, MAP kinase cascade consist of three tiers: MAPKKK, MAPKK, MAPK. MAPK cascades are activated as a result of MAPKKK phosphorylation. Active MAPKKKs phosphorylate specific MAPKKs. Upon activation, MAPKKs phosphorylate MAPKs that activate wide arrays of proteins, such as transcriptional factors. Activation of MAPK cascade alters various cell functions, like gene expression, cell divisions and cell apoptosis. MAPK cascades are involved in response to biotic and abiotic stress conditions. Plant hormone abscisic acid (ABA) is involved in response to stress. ABA abundance also regulate developmental processes (such as seed germination or root elongation) and stomatal closure in response to drought and pathogenesis. It is established that ABA perception occurs via the ABA core signaling module build of three protein groups – group A protein phosphatases type 2C, SnRK kinases and ABA receptors - PYL/PYR/RCAR. MAP kinases are also recruited by ABA signaling pathways, but when this project started there was no knowledge about MAPKKK involved in the ABA signal transduction. Here we focus on MAPKKK18 – small (37kDa) MAP kinase, which expression is regulated by the ABA core signaling pathway. **To establish MAPKKK18 as an element of ABA signalosome, mechanism behind MAPKKK18 activation was analyzed and functional analysis of MAPKKK18 in ABA-regulated process was performed.** MAPKKK18 activation profiles were analyzed and no increase in kinase activity upon ethylene, salicylic acid and jasmonic acid was identified. MAPKKK18 subcellular localization was altered upon ABA stimulation and MAPKKK18 was exported from the nucleus to the cytoplasm. Using Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) analysis it was found that MAPKKK18 interacts with elements of the ABA core module – ABI1 PP2C and SnRK2.6/OST1. In addition, it was analyzed how *MAPKKK18* affects phenotypes regulated by ABA. Overexpression of *MAPKKK18* resulted in improved seed germination on ABA-supplemented medium. *MAPKKK18oe* lines exhibited reduced guard cells aperture in response to ABA treatment, more guard cells in Arabidopsis cotyledons as compared to the wild type plants. On the other hand, the *mapkkk18* knockout line showed reduced seed germination, greater guard cells aperture in response to ABA and decrease in guard cells density as compared to the wild type. Importantly, MAPKKK18-dependent regulation of stomatal density is independent YODA kinase cascade.

Analyses presented in this dissertation demonstrate that ABA activated-MAPKKK18 interacts with elements of the ABA core signaling pathway. MAPKKK18 is exported from the nucleus to cytoplasm upon ABA stimulation. MAPKKK18 is also involved in regulation of ABA-related phenotypes, like seed germination, stomatal closure and guard cell development. Overall, results presented in this dissertation establish MAPKKK18 as an effector of ABA signaling pathway, that is active directly downstream of the ABA core signaling module.

1. Wstęp

1.1 Kwas abscysynowy

Kwas abscysynowy (ABA, ang. *abscisic acid*) jest uznawany za jeden z kluczowych hormonów roślinnych. ABA to organiczny związek chemiczny o wzorze $C_{15}H_{20}O_4$, zaliczany do seskwiterpenów. W swej strukturze posiada dwa centra asymetrii. Pierwsze centrum, zlokalizowane przy węglu C1', decyduje o aktywności biologicznej kwasu abscysynowego, (forma (+)-ABA jest formą aktywną biologicznie). Natomiast drugie centrum asymetrii stanowi, łańcuch 2,4-pentadienowy, w którym grupa karboksylowa występuje w pozycji cis lub trans. Izomer (+)-2-cis-4-trans cząsteczki kwasu abscysynowego jest formą dominującą u roślin (Santiago i wsp., 2012). W komórkach roślinnych ABA występuje powszechnie, jednak jego stężenie zmienia się wraz z wiekiem rośliny – na wczesnych etapach rozwojowych jego stężenie jest podwyższone, a w dorosłych tkankach stężenie ABA jest utrzymywane na niskim poziomie (Finkelstein, 2013).

ABA jest zaangażowany w regulację szeregu procesów rozwojowych. ABA reguluje ekspresję genów, a także wpływa na zmianę przepuszczalności błon komórkowych. ABA w wielu procesach jest antagonistą innych fitohormonów, takich jak cytokininy, etylen, kwas jasmonowy, gibereliny i auksyny (Anderson i wsp., 2004; Tanaka i wsp., 2006; Weiss i Ori, 2007; Fan i wsp., 2009). Podczas dojrzewania nasion w rozwijającym się embrionie występują dwa skoki stężenia ABA. Pierwszy skok stężenia ABA pozwala zablokować podziały komórkowe pomiędzy fazami G1 i S podziału, co zapobiega przedwczesnemu kiełkowaniu niedojrzałego zarodka. Kolejny wzrost stężenia ABA odpowiedzialny jest za indukcję spoczynku nasion (Liu i wsp., 1994). Spoczynek nasion jest utrzymywany dzięki biosyntezie ABA zachodzącej w endospermie, zaś zniesienie inhibicji spoczynkowej nasion jest bezpośrednio związane z rozkładaniem ABA przez CYP707A2 (Okamoto i wsp., 2006).

Na późniejszych etapach rozwojowych ABA hamuje rozwój tkanek w stężeniach mikromolowych, a stymuluje rozwój w niższych, nanomolowych stężeniach. W taki sposób odbywa się regulacja zarówno rozgałęziania korzeni bocznych (Signora i wsp., 2001), jak i wydłużania korzenia głównego (Sharp i wsp., 2002). Niskie stężenia ABA hamują różnicowanie się komórek w centrum spoczynkowym korzenia, utrzymując je w stanie pluripotencjalnym, co umożliwia ciągły wzrost korzenia (Zhang i wsp., 2010). Prawidłowy rozwój aparatów szparkowych jest również regulowany przez ABA (Franks i Farquar, 2001).

W końcowych etapach rozwoju ABA indukuje dojrzewanie i starzenie tkanek. Udokumentowano wpływ ABA na regulację procesu kwitnienia – w warunkach normalnych ABA hamuje kwitnienie, a w warunkach stresu przyspiesza ten proces. Należy jednak zaznaczyć, że rola ABA jest w tym procesie drugorzędna w odniesieniu do giberelin i brasinosteroidów (Domagalska i wsp., 2010). W dojrzałych tkankach ABA reguluje proces starzenia. Ponadto ilość enzymów odpowiadających za syntezę ABA zwiększa się w starzejących się komórkach (Lim i wsp., 2007). Stężenie ABA w komórce reguluje poziom ekspresji genów odpowiadających za syntezę chlorofilu, wpływając w ten sposób na wydajność procesu fotosyntezy. Podejrzewa się, że ABA moduluje poziom ekspresji genów kodujących białka chloroplastowe występujących w genomie jądrowym i chloroplastowym (Yamburenko i wsp., 2013). Ponadto, ABA odpowiada za regulację procesów starzenia organów i tkanek roślinnych (Lee i wsp., 2012b).

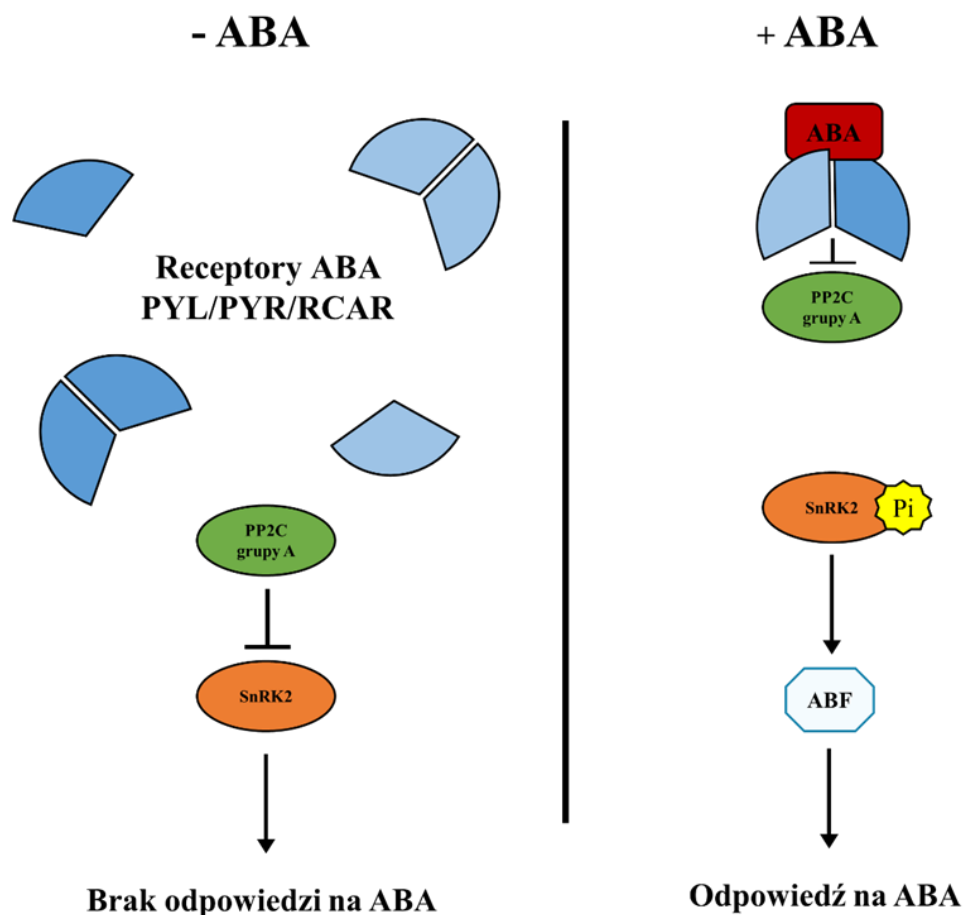
Podwyższony poziom ABA w komórce jest bezpośrednio związany z odpowiedzią na stres. ABA syntezowany jest w odpowiedzi na stres zasolenia, zimno, a w szczególności w odpowiedzi na suszę. Szacuje się, że ekspresja znacznej części genów regulowanych przez ABA jest także regulowana przez suszę i zimno (Shinozaki i wsp., 2003). Z tego powodu ABA jest uważany za główny fitohormon odpowiedzialny za modulację odpowiedzi na stres suszy u roślin (Finkelstein, 2013). W warunkach suszy podwyższony poziom ABA zwiększa akumulację substancji pomocniczych, takich jak prolina, cukry i białka hydrofilowe (Verslues i Bray, 2007). ABA reguluje także potencjał oksydacyjno-redukcyjny w komórce, ograniczając uszkodzenia spowodowane warunkami stresu (Wang i wsp., 2016). Niezwykle istotną funkcją ABA w warunkach stresu suszy jest regulacja osmotycznej homeostazy komórki. ABA zmniejsza przepuszczalność błon komórkowych i ogranicza wypływ wody z komórki regulując działanie akwaporyn (Kline i wsp., 2010). Aktywność akwaporyn jest także związana z procesem zamykania aparatów szparkowych (Joshi-Saha i wsp., 2011). ABA promuje zamykanie aparatów szparkowych oraz depozycję kalozy na wczesnych etapach infekcji patogenami (Cao i wsp., 2011). Na późniejszych etapach infekcji patogenami ABA hamuje odpowiedź roślin na stres przez współdziałanie z innymi fitohormonami takimi jak kwas salicylowy (SA) i kwas jasmonowy (JA) (Koornneef i Pieterse, 2008).

1.1.1 Percepcja kwasu abscysynowego, rdzeniowa sygnalizacja ABA

Sygnałom ABA to ponad 500 różnych oddziaływań pomiędzy co najmniej 138 białkami (Lumba i wsp., 2014). Za percepcję kwasu abscysynowego u roślin odpowiada moduł białkowy nazywany rdzeniową sygnalizacją ABA. W skład rdzeniowego modułu ABA wchodzi receptory PYL/PYR/RCAR, fosfatazy białkowe podgrupy 2C oraz kinazy białkowe SnRK grupy 2 (Ma i wsp. 2009; Park i wsp., 2009). Funkcjonowanie fosfataz białkowych 2C oraz kinaz SnRK2 jest powiązana bezpośrednio z poziomem ABA w komórce roślinnej. Przy niskich stężeniach ABA, fosfatazy PP2C defosforylują szereg białek, w tym kinazy SnRK2, powodując ich inaktywację (Soon i wsp., 2012). Natomiast w sytuacji podwyższonego poziomu ABA w komórce dochodzi do wiązania cząsteczek ABA przez receptory PYL/PYR/RCAR i zmian konformacyjnych w strukturze receptorów. Zmiany te pozwalają na oddziaływanie receptorów PYL/PYR/RCAR z PP2C i zablokowanie aktywności fosfatazowej PP2C (Antoni i wsp., 2012; Santiago i wsp., 2012). Zwolnienie kinaz SnRK2 spod inhibicji PP2C prowadzi do ich autoaktywacji i fosforylacji substratów kinaz SnRK2 (Soon i wsp., 2012).

Za wykrywanie cząsteczek ABA w komórce odpowiadają receptory białkowe z grupy PYR/PYL/RCAR (ang. *Pyrabactin Resistant/PYR-like/Regulatory Component of ABA Receptor*) (Ma i wsp. 2009; Park i wsp., 2009). Receptory PYR/PYL/RCAR to niewielkie rozpuszczalne białka (100-200 aa), występujące na obszarze jądra komórkowego i cytoplazmy. W skład grupy receptorów ABA wchodzi 13 białek: PYR1 i PYL1-12 (Fuji i wsp., 2009). U receptorów PYL/PYR/RCAR obserwuje występowanie motywu strukturalnego START (ang. *Star-Related Lipid Transfer Domain*), odpowiadające za tworzenie kieszeni umożliwiającej wiązanie dużych hydrofobowych ligandów (Radauer i wsp., 2008) takich jak ABA. W warunkach niskiego poziomu ABA w komórce, receptory ABA tworzą dimery. Po wykryciu i związaniu cząsteczki ABA przez receptory dochodzi do zmian konformacyjnych i rozbitcia kompleksu do form monomerycznych (Zhang i wsp., 2013). Niektóre receptory są zdolne do rozpoznawania chiralności związku i wiążą (+)-S-ABA i (-)-R-ABA z różną wydajnością (Santiago i wsp., 2012). Po związaniu ABA w formie monomerycznej sześciu przedstawicieli grupy receptorów PYL/PYR/RCAR (PYR1 oraz, PYL1/2/3/8/9) jest zdolnych do oddziaływania z PP2C podgrupy A (Melcher i wsp., 2009). W wyniku związania PP2C przez receptor PYR/PYL/RCAR dochodzi do fizycznego zablokowania kieszeni katalitycznej PP2C

i inhibicji aktywności fosfatazowej PP2C, co w konsekwencji prowadzi do autoaktywacji kinaz SnRK2 i transdukcji sygnału ABA (Yin i wsp., 2009).



Rysunek 1. Schemat działania rdzeniowej sygnalizacji ABA

(A) Przy niskim stężeniu ABA w komórce receptory PYL/PYR/RCAR nie są aktywne, a fosfatazy białkowe 2C podgrupy A hamują aktywność kinazową SnRK2. (B) Związanie cząsteczki ABA przez receptory PYL/PYR/RCAR prowadzi do inhibicji PP2C grupy A i autoaktywacji kinaz SnRK2. Następnie SnRK2 fosforyluje szereg białek, w tym czynniki transkrypcyjne ABF, co prowadzi do transdukcji sygnału ABA. Opracowanie własne.

U *Arabidopsis* opisuje się 80 PP2C i ze względu na podobieństwo strukturalne wyróżnia się 12 grup, A-K (Fuchs i wsp., 2013). Fosfatazy białkowe 2C działają w formie monomerycznej, a ich aktywność jest uzależniona od związania anionu Mg^{2+}/Mn^{2+} (Rodriguez i wsp., 1998). Stanowią silnie zakonserwowaną grupę białek powiązaną z odpowiedzią na stres. Dziewięciu przedstawicieli grupy A fosfataz 2C (ABI1/2, HAB1/2, HAI1/2/3, AHG1 oraz AHG3/PP2CA) wiąże się bezpośrednio z sygnalizacją ABA (Fuchs i wsp., 2013). Badania

genetyczne wykazały, że aktywność genów tych kinaz jest niezbędna do syntezy ABA i transdukcji sygnału ABA (Bhaskara i wsp., 2012). Ekspresja genów fosfataz białkowych 2C grupy A u *Arabidopsis* jest również indukowana przez ABA (Xue i wsp., 2008). To właśnie te fosfatazy uważa się za podstawowe negatywne regulatory sygnalizacji ABA (Saez i wsp., 2006; Kuhn i wsp., 2006; Nishimura i wsp., 2007). Podstawowa aktywność PP2C w sygnalizacji ABA opiera się na oddziaływaniu i defosforylacji reszt seryny i treoniny w pętli aktywacyjnej kinaz SnRK2 znajdującej się w C-końcowej części białka (Umezawa i wsp., 2009). Defosforylacja i inaktywacja kinaz SnRK2 przez PP2C prowadzi do zablokowania i wyciszenia transdukcji sygnału ABA w komórce. Aktywność PP2C grupy A jest hamowana przez wiązanie PP2C przez receptory ABA z grupy PYL/PYR/RCAR, które prowadzi do zablokowania domeny katalitycznej PP2C (Yin i wsp., 2009).

Fosfatazy białkowe ABI1 i ABI2 należą do najlepiej opisanych przedstawicieli fosfataz białkowych 2C grupy A. Pierwszy zidentyfikowany mutant w genie *ABI1*, *abi1-1*, niosący mutację dominującą negatywną charakteryzował się wyraźnym fenotypem niewrażliwości na ABA (Finkelstein i wsp., 2002). U *abi1-1* obserwowano zwiększony poziom ABA w rozwijającym się zarodku, zmniejszoną wrażliwość na ABA na etapie kiełkowania oraz zwiększoną utratę wody w procesie transpiracji (Verslues i wsp., 2006). Substytucja konserwatywnej glicyny na kwas asparaginowy w domenie fosfatazowej ABI1 (G180D) i ABI2 (G168D) całkowicie blokuje odbiór sygnału ABA (Rodriguez i wsp., 2009). W toku badań zidentyfikowano, że ABI1 defosforyluje szereg białek, regulując obok sygnalizacji ABA, także szereg procesów rozwojowych i elementów odpowiedzi na stresy tj. stres dehydratacji, stres oksydacyjny i stres związany z atakiem patogenów (Ludwików i wsp., 2009; Brandt i wsp., 2012; Cheng i wsp., 2013; Joseph i wsp., 2014; Lu i wsp., 2015). Jednym z nowszych wątków w badaniach aktywności tego białka jest badanie wpływu ABI1 na stabilność białek. ABI1 nie tylko bezpośrednio blokuje aktywność syntazy ACC ACS6, ale także poprzez defosforylację kieruje ją do degradacji przez proteasom 26S (Ludwików i wsp., 2015). Podobny mechanizm regulacji udało się udokumentować dla innej syntazy ACC, ACS7 (Cieśla, 2015), oraz przedstawiciela kinaz MAP, MAPKKK18 (Mitula i wsp., 2015).

Współcześnie opisuje się również udział fosfataz białkowych 2A w odpowiedzi na ABA, jednak aktywność PP2A opiera się na innym mechanizmie. W odróżnieniu od PP2C, które działają w formie monomerycznej, fosfatazy PP2A tworzą heterotrimeryczny holoenzym zbudowany z trzech podjednostek (PP2AA, PP2AB, PP2AC) i do swej aktywności nie potrzebują jonu metalu (Xu i wsp., 2006). W tej formie fosfatazy 2A mają potencjał

do oddziaływania z kinazami SnRK2, przez co również pełnią rolę negatywnych regulatorów sygnalizacji ABA (Waadt i wsp., 2015). Wciąż jednak to fosfatazy 2C podgrupy A uznawane są za główne negatywne regulatory sygnalizacji ABA (Fuchs i wsp., 2013).

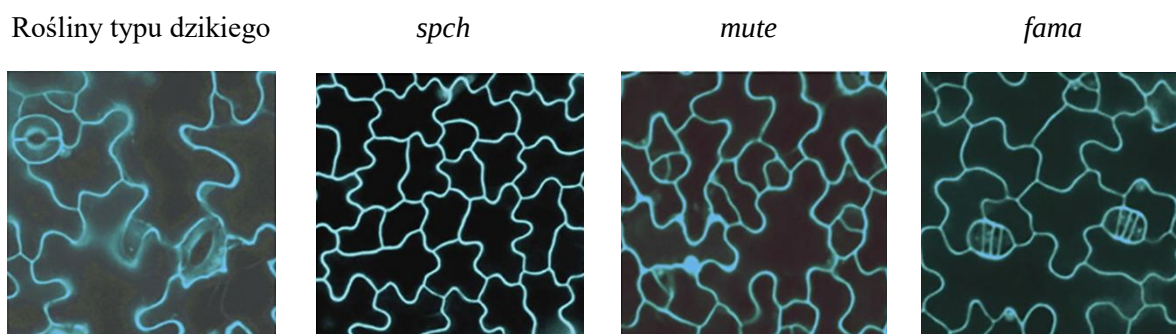
Kolejny element rdzeniowej sygnalizacji ABA to kinazy SnRK grupy 2 (SnRK2, ang. *Sucrose Non-Fermenting-Related Protein Kinases, group 2*), które pełnią rolę pozytywnych regulatorów sygnalizacji ABA. Kinazy SnRK2 to niewielkie (około 40 kDa) kinazy serynowo-treoninowe działające w formie monomerycznej (Kulik i wsp., 2011). U *Arabidopsis* zidentyfikowano 10 kinaz SnRK2, kinazy SnRK2 dzieli się na trzy podgrupy (Halford i wsp., 2009). W skład pierwszej grupy wchodzi kinazy SnRK2 nieaktywowane przez ABA, a w skład grupy drugiej włącza się kinazy SnRK2 słabo aktywowane przez ABA. Do grupy trzeciej zalicza się natomiast kinazy SnRK2 silnie aktywowane przez ABA, czyli SnRK2.2/SRK2D, SnRK2.3/SRK2I, SnRK2.6/OST1 (ang. *Open Stomata 1*) (Kulik i wsp., 2011). Kinazy SnRK2 grupy 2 pozytywnie regulują odpowiedź na stres suszy, jednak to kinazy SnRK2 grupy 3 pełnią rolę pozytywnych regulatorów rdzeniowej sygnalizacji ABA – nie opisano dotychczas hamowania aktywności kinaz SnRK2 grupy 2 przez fosfatazy białkowe 2C grupy A (Umezawa i wsp., 2009).

Celem aktywności kinaz SnRK2 grupy 3 są kanały jonowe (Sato i wsp., 2009; Maierhofer i wsp., 2014) oraz liczne efekторы sygnalizacji ABA, takie jak czynniki transkrypcyjne ABF i AREB (Furiihata i wsp., 2006; Fujii i wsp., 2007). Kinazy SnRK2.2/SRK2D, SnRK2.3/SRK2I i SnRK2.6/OST1 pełnią podobne funkcje w komórce, regulując szereg ścieżek sygnalizacyjnych ABA. Wyłączenie aktywności wszystkich trzech genów *snrk2.2*, *snrk2.3* i *snrk2.6* prowadzi nie tylko do niewrażliwości roślin na ABA, ale także do zaburzeń zamykania aparatów szparkowych, co prowadzi do zwiększonej podatności roślin na warunki stresu suszy. Również ekspresja genów związanych z odpowiedzią na ABA i stres dehydratacji jest znacząco obniżona u mutantu *snrk2.2/snrk2.3/snrk2.6* (Fujita i wsp., 2010). Obserwuje się jednak pewnie różnice w pełnionych funkcjach – SnRK2.6/OST1 jest silniej zaangażowana w regulację ruchów aparatów szparkowych zależnych od ABA (Acharya i wsp., 2009), a kinazy SnRK2.2 i SnRK2.3 z procesem spoczynku i kiełkowania nasion (Fujii i wsp., 2007).

1.2 Regulacja rozwoju aparatów szparkowych – rola czynników transkrypcyjnych SPCH, MUTE, FAMA

Komórka aparatu szparkowego jest wysoce wyspecjalizowana. Rozwój aparatu szparkowego przebiega w kilku wyraźnych etapach (Pillitteri i wsp., 2007; Ostrowski i wsp., 2015). W wyniku podziału asymetrycznego komórka protodermalna przekształca się w pierwotną komórkę macierzystą merystemoidu (MMC, ang. *Meristemoid Mother Cell*). MMC w wyniku podziału asymetrycznego dzieli się na komórkę podstawową linii różnicowania szparek (SLGC, ang. *Stomatal Lineage Ground Cell*) i merystemoid. Merystemoid ma charakterystyczny trójkątny kształt, może dzielić się kilkukrotnie, a ostatecznie przekształca się w komórkę macierzystą szparki (GMC, ang. *Guard Mother Cell*). GMC po dokonaniu pojedynczego symetrycznego podziału tworzy dojrzały aparat szparkowy (GC, ang. *Guard Cell*) zbudowany z dwóch komórek szparkowych. Powstałe po pierwszym podziale komórki podstawowe linii różnicowania szparek wciąż mają potencjał do podziału i mogą różnicować się w komórki macierzyste merystemoidów (MMC) i merystemoidy (Lau i wsp., 2013). Schemat rozmieszczenia aparatów szparkowych jest ściśle regulowany - dwa aparaty szparkowe nie mogą być zlokalizowane bezpośrednio obok siebie w epidermie, zgodnie z regułą jednokomórkowego odstępu (ang. *one-cell-spacing rule*). Uważa się, że rozdzielenie aparatów szparkowych komórką epidermalną ułatwia transport wody i jonów do wnętrza komórek szparkowych (Bergmann i wsp., 2004).

Za główne regulatory w procesie rozwoju aparatów szparkowych w epidermie uważa się trzy czynniki transkrypcyjne z motywem przestrzennym helisa-pętla-helisa (bHLH, ang. *Basic Helix-Loop-Helix*) – SPCH, MUTE i FAMA (Pillitteri i wsp., 2007). Czynniki SPCH inicjuje proces tworzenia MMC i jego asymetryczny podział. Czynniki MUTE jest odpowiedzialny za inicjację przejścia merystemoidu w komórkę macierzystą szparki (GMC), który na tym etapie traci właściwości komórki macierzystej. Natomiast aktywność czynnika transkrypcyjnego FAMA jest wymagana do przeprowadzenia ostatniego podziału przez GMC i przejścia w dwie komórki szparkowe, tworzące dojrzały aparat szparkowy. Wszystkie trzy czynniki transkrypcyjne są niezbędne do poprawnego różnicowania się komórek w aparaty szparkowe. Zablockowanie aktywności któregośkolwiek z nich prowadzi do zatrzymania procesu tworzenia aparatów szparkowych na danym etapie (Pillitteri i wsp., 2007) (Rys. 2).



Rysunek 2. Wpływ braku aktywności czynników transkrypcyjnych SPCH, MUTE, FAMA na proces tworzenia aparatów szparkowych

Obrazy mikroskopowe powierzchni epidermy roślin typu dzikiego i linii mutantów *spch*, *mute* i *fama*. Zaburzenie aktywności z czynników transkrypcyjnych SPCH, MUTE i FAMA prowadzi do zaburzenia podziałów komórek linii różnicowania szparek i zatrzymania rozwoju aparatów szparkowych na danym etapie. Na podstawie Peterson i wsp., 2010.

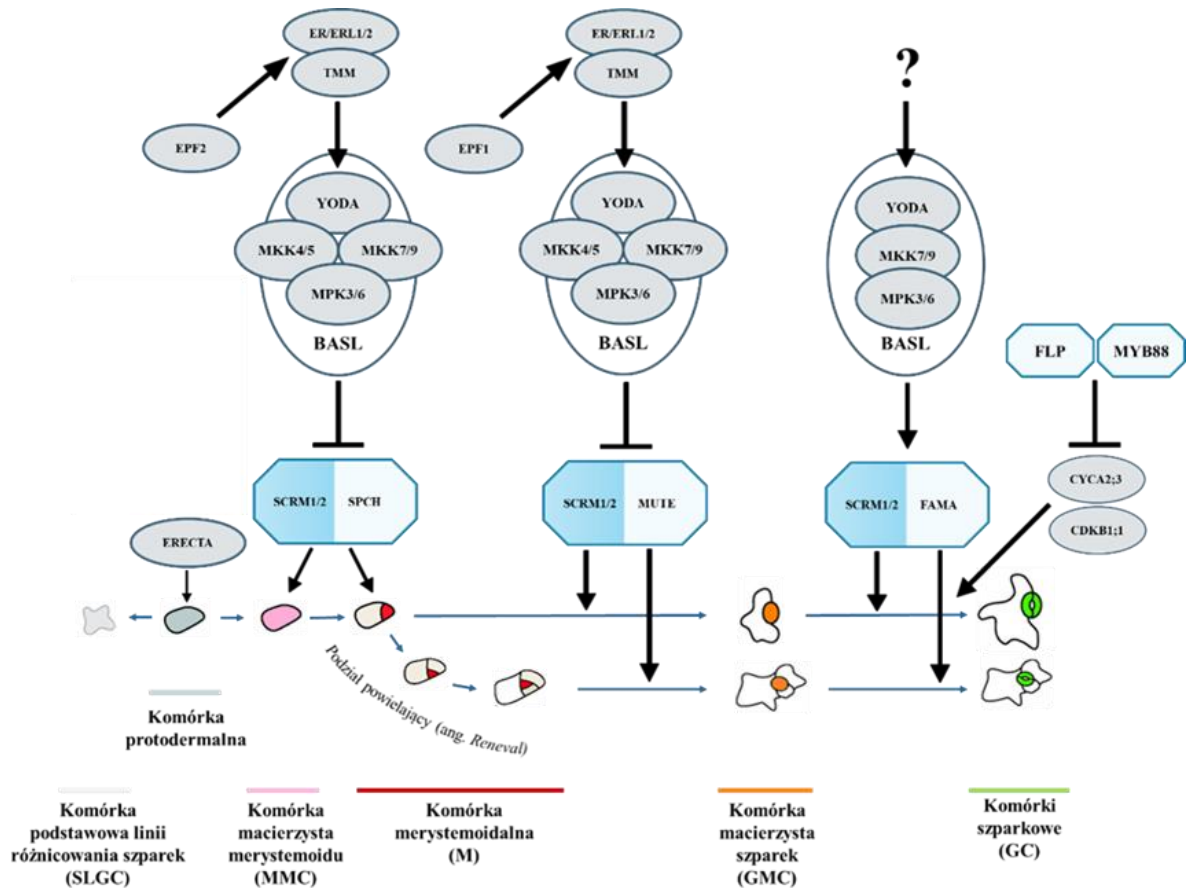
W proces rozwoju aparatów szparkowych zaangażowane są także SCRM (ang. *Scream*) i SCRM2 (ang. *Scream2*) (znane także jako ICE1/2, ang. *Inducer of CBF Expression*) należące do grupy czynników transkrypcyjnych bHLH oraz FLP (ang. *Four Lips*) i MYB88 (ang. *Myb Domain Protein 88*) (Xie i wsp., 2010). Nadaktywność czynników transkrypcyjnych SCRM prowadzi do różnicowania się wszystkich komórek epidermy w aparaty szparkowe, a wyłączenie aktywności genów *SCRM* i *SCRM2* blokuje rozwój aparatów szparkowych na etapie powstawania merystemoidów (Hachez i wsp., 2011). Czynniki transkrypcyjne SCRM i SCRM2 oddziałują bezpośrednio z czynnikami SPCH, MUTE i FAMA. Przypuszcza się, że heterodimery SPCH/MUTE/FAMA wspólnie regulują poszczególne etapy różnicowania się aparatów szparkowych (Kanaoka i wsp., 2008). Z kolei jednoczesne wyłączenie aktywności genów *FLP* i *MYB88* skutkuje grupowaniem się komórek macierzystych szparek (GMC) i aparatów szparkowych (GC) w epidermie. Pozwala to przypuszczać, że FLP i MYB88 promują dojrzewanie GMC i ograniczają ich podziały do jednego (Lai i wsp., 2005). Co istotne, żaden z tych czynników transkrypcyjnych nie oddziałuje bezpośrednio z FAMA (Ohashi-Ito i Bergmann, 2006). Rola FLP i MYB88 w procesie tworzenia aparatów szparkowych to hamowanie ekspresji białek grupy CYCA2 (ang. *Cyclin A-type, group 2*) (Vanneste i wsp., 2011) i CDKB1.1 (ang. *Cyclin Dependent Kinase B1.1*) (Boudolf i wsp., 2004; Xie i wsp., 2010). Białka grupy CYCA2 promują podziały komórkowe, a ich hamowanie prowadzi do zatrzymania cyklu komórkowego komórek linii różnicowania szparek i dojrzewania GMC (Xie i wsp., 2010; Vanneste i wsp., 2011).

Proces tworzenia aparatów szparkowych jest regulowany nie tylko przez aktywność czynników transkrypcyjnych (Hord i wsp., 2008). Istotny wpływ wywiera także rodzina receptorowych kinaz białkowych typu LRR-RLK (ang. *Leucine-Rich Repeat Receptor-Like Protein Kinases*), do której należą białka ERECTA, ERECTA-LIKE 1 i ERECTA-LIKE 2. Kinazy receptorowe typu LRR-RLK regulują procesy podziałów komórkowych na różnych etapach powstawania aparatów szparkowych. *ERECTA* ulega silnej ekspresji jedynie w komórkach protodermalnych (Lee i wsp., 2012a). Natomiast *ERECTA-LIKE 1* i *ERECTA-LIKE 2* ulegają ekspresji zarówno w merystemoidach, jak i komórkach macierzystych szparek (GMC) i młodych aparatach szparkowych (GC). *ERECTA-LIKE 1* i *ERECTA-LIKE 2* regulują (hamują) przejście merystemoidów w GMC (Hord i wsp., 2008). Ligandami dla kinaz receptorowych ERECTA, ERECTA-LIKE 1 i ERECTA-LIKE 2 są peptydy sygnałowe z rodziny białek podobnych do peptydów regulujących różnicowanie i rozmieszczenie szparek w epidermie (EPF, ang. *Epidermal Patterning Factor*). W skład grupy EPF wchodzi 11 niewielkich białek (~50 aminokwasów) bogatych w cysteiny. Białka EPF1 i EPF2 oddziałują odpowiednio z ERECTA LIKE 1/2 i ERECTA (Lee i wsp., 2012a). Para ligand-receptor EPF2-ERECTA uczestniczy w regulacji gęstości rozmieszczenia aparatów szparkowych i odpowiada za hamowanie rozwoju komórek epidermy, które sąsiadują z merystemoidami i komórkami macierzystymi merystemoidów (MMC). Natomiast para EPF1-ERECTA LIKE1/2 podczas rozwoju epidermy odpowiada za utrzymywanie reguły jednokomórkowego odstępu i reguluje ten proces poprzez blokowanie rozwoju merystemoidów (Lee i wsp., 2012a). Co ciekawe, inny przedstawiciel grupy EPFL-EPFL9 (znany także jako STOMAGEN), ulega ekspresji w komórkach mezofil. STOMAGEN reguluje aktywność białka EPF2 i odpowiada za różnicowanie komórek epidermy w komórki linii różnicowania szparek (Simmons i wsp., 2015). Białka EPFL4-6, należące do rodziny CHALLAH (CHALf, ang., *CHALLAH family*), ulegają ekspresji poza komórkami linii rozwojowej aparatów szparkowych - w młodych tkankach liścieni, gdzie są odpowiedzialne za indukcję procesów rozwojowych. Na wczesnych etapach rozwoju EPFL4-6 mogą konkurować z EPF1 o dostępność do ERECTA (Abrash i Bergamann, 2010). Za regulację tego procesu odpowiada białko TMM (ang. *Too Many Mouths*) należące do białek receptorowych typu LRR-RLP, które może pełnić rolę „izolatora” białek CHALf od kinaz receptorowych z rodziny ERECTA. Podejrzewa się, że TMM współdziała z kinazami receptorowymi z rodziny ERECTA i aktywnie blokuje transdukcję sygnału przekazywanego przez CHALf. Wyłączenie aktywności *TMM* skutkuje zaburzeniem podziałów komórek linii różnicowania szparek i grupowaniem się aparatów szparkowych w epidermie (Nadeau i Sack, 2002).

Kaskady kinaz MAP również ogrywają istotną rolę w regulacji procesu tworzenia aparatów szparkowych. Kaskada kinaz MAP YODA-(MKK4/5)/(MKK7/9)-MPK4/MPK6 na wczesnym etapie rozwoju epidermy reguluje podział asymetryczny komórek na komórkę macierzystą merystemoidu i komórkę podstawową linii różnicowania szparek (SLGC) (Lampard i wsp., 2009). Aktywność czynnika transkrypcyjnego SPCH jest specyficznie hamowana przez MPK4 lub MPK6 (Lampard i wsp., 2008). Inaktywacja czynnika SPCH odbywa się poprzez fosforylację przynajmniej pięciu reszt seryny lub treoniny w domenie MAPK (MAPKTD, ang. *MAPK Target Domain*) (Lampard i wsp., 2009). Zespołowi udało się również wykazać, że kinazy MKK4/MKK5-MPK3/MPK6 hamują proces tworzenia komórek macierzystych szparek (GMC) w epidermie (Lampard i wsp., 2009). Stwierdzono także, że kaskada YODA działa poniżej TMM (Nadeau i Sack, 2002) oraz białek rodziny ERECTA (ERECTA, ERL1 i ERL2) (Shpak i wsp., 2005). Udowodniono, że także białka z grupy EPF (ang. *Epidermal Patterning Factor*) w kompleksie z receptorami regulują aktywność kaskady YODA (Abrash i Bergmann, 2010; Hara i wsp., 2007; Hunt i Gray, 2009; Kondo i wsp., 2010; Sugano i wsp., 2010). Ponadto, nowsze badania wykazały, że moduł YODA-MKK7/MKK9 jest aktywny również na późniejszych etapach rozwoju aparatów szparkowych. Kaskada YODA-MKK7/MKK9 działa wówczas jako pozytywny regulator przejścia komórek prekursorowych w dorosłe aparaty szparkowe (Lampard i wsp., 2009).

Ciekawym aspektem aktywności kaskady YODA-(MKK4/5)/(MKK7/9)-MPK4/MPK6 jest oddziaływanie z białkiem BASL (ang. *Breaking of Asymmetry in the Stomatal Lineage*). Zhang i wsp. w 2015 roku z wykorzystaniem dwuhybrydowego systemu drożdżowego i techniki *pull down* udowodnili, że BASL silnie oddziałuje z elementami modułu YODA-MKK4/MKK5 i może stanowić rusztowanie dla całej kaskady MAP. Udokumentowano, że białko BASL zmienia polarnie lokalizację w komórce i bierze udział w wyznaczeniu płaszczyzny przyszłego podziału asymetrycznego komórki protodermalnej. W wyniku akumulacji BASL w jednej części komórki, po asymetrycznym podziale komórka potomna z większą ilością BASL przekształca się w komórkę podstawową linii różnicowania szparek (SLGC), natomiast druga komórka przekształca się w merystemoid (Dong i wsp., 2009). Tym samym przy asymetrycznym podziale komórki epidermy moduł YODA-MKK4/MKK5 trafia wraz z BASL do komórki potomnej, gdzie hamuje aktywność czynnika transkrypcyjnego SPCH i przez to rozwój merystemoidów (Zhang i wsp., 2015). Co więcej, czynnik transkrypcyjny SPCH odpowiada za aktywację genu *BASL* (Lau i wsp., 2015). Schemat

podsumowujący skomplikowaną sieć interakcji pomiędzy białkami kluczowymi dla procesu tworzenia aparatów szparkowych przedstawiono na rysunku poniżej (Rys. 3).



Rysunek 3. Proces tworzenia aparatów szparkowych

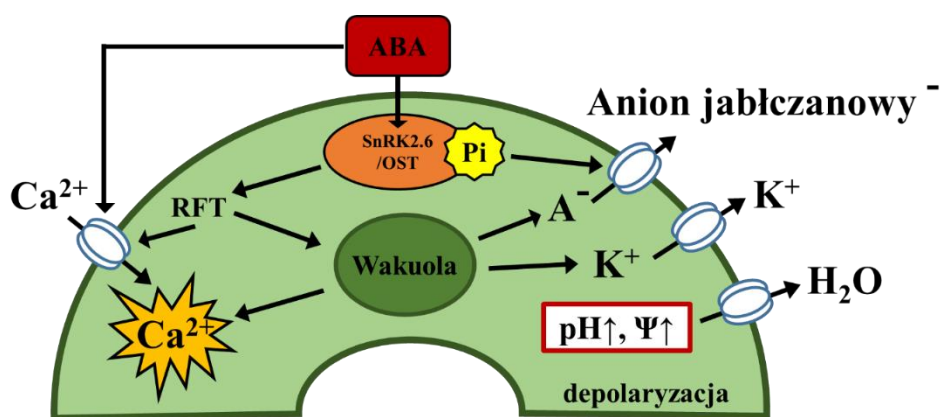
Rozwój aparatów szparkowych jest regulowany przez aktywność trzech czynników transkrypcyjnych, SPCH, MUTE, FAMA. SPCH reguluje przejście komórki protodermalnej w komórkę macierzystą merystemoidu (MMC), MUTE kontroluje przemianę MMC w merystemoid. Czynnik FAMA odpowiada natomiast za dojrzewanie aparatu szparkowego. Kaskada kinaz MAP YODA-(MKK4/5)(MKK7/9)-MPK3/6, białka EPF1/2 (wykrywane przez TMM i białka rodziny ERECTA) oraz czynniki transkrypcyjne FLP i MYB88 hamują rozwój aparatów szparkowych. Na późniejszych etapach rozwoju kaskada YODA-MAPKK4/5/7/9-MPK3/6 pełni jednak funkcję pozytywnego regulatora tego procesu poprzez regulację aktywności czynnika transkrypcyjnego FAMA. Opracowanie własne na podstawie Liu i wsp., 2010.

1.3 Proces zamykania aparatów szparkowych indukowany przez ABA

Zamykanie aparatów szparkowych i ograniczenie transpiracji jest podstawową metodą obrony roślin przez warunkami stresu suszy. Proces zamykania aparatów szparkowych regulowany jest przez kanały jonowe typu R (szybkie) oraz typu S (wolne), które wypompowują z komórek szparkowych jony NO_3^- , Cl^- , SO_4^{2-} i anion jabłczanowy (Gallietta i wsp., 2001). Kanały typu R, których najlepiej opisanym przedstawicielem jest QUAC1 (ang. *Quick-Activating Anion Channel 1*), charakteryzują się bardzo szybką aktywacją (kilka milisekund) i dezaktywacją zaledwie po kilku minutach działania (Dreyer i wsp., 2012). Kanał QUAC1 jest zlokalizowany w błonie komórkowej komórek szparkowych i odpowiada za transport jonów SO_4^{2-} i jonów jabłczanowych (Meyer i wsp., 2010). Kanały typu S, jak np. kanały SLAC1 (ang. *Slow-Activating Anion Channel 1*) oraz SLAH3 (ang. *SLAC1 Homologue 3*), aktywują się wolniej i w odróżnieniu od kanałów typu R, nie ulegają automatycznej deaktywacji w czasie lub podczas depolaryzacji błony (Schroeder i Keller, 1992). Uważa się, że to właśnie kanały typu S pełnią główną rolę w procesie zamykania aparatów szparkowych (Negi i wsp., 2008; Vahisalu i wsp., 2008). Przepuszczalność jonów przez kanały anionowe typu S różni się – badania aktywności kanałów w komórkach szparkowych bobu (*Vicia faba L.*) wykazały, że przepuszczalność jonów jest największa dla NO_3^- , a najmniejsza dla jonu jabłczanowego (Schmidt i Schroeder, 1994). U *Arabidopsis* udokumentowano, że kanał SLAC1 odpowiada głównie za transport jonów Cl^- , a kanał SLAH3 za usuwanie z komórki jonów NO_3^- (Kollist i wsp., 2014). Stwierdzono także, że aktywność kanałów biorących udział w zamykaniu aparatów szparkowych jest regulowana przez białka sygnalizacji ABA (tj. OST1, fosfatazy białkowe 2C grupy A) oraz jony wapnia (Geiger i wsp., 2010; Brandt i wsp., 2012; Albert i wsp., 2017). Kanał SLAH3 jest aktywowany przez kinazy zależne od wapnia CDPK21 i CIPK23 (Geiger i wsp., 2011) a hamowany przez fosfatazy białkowe 2C z grupy A tj. ABI1 i ABI2 (Geiger i wsp., 2010). Do pełnej aktywacji kanału SLAC1 niezbędna jest fosforylacja dwóch reszt aminokwasowych: Ser59 i Ser120 (Maierhofer i wsp., 2014). Reszty Ser59 i Ser120 są defosforylowane przez ABI1, a fosforylowane przez CPK6 i SnRK2.6/OST1 (Brandt i wsp., 2012). To właśnie kinaza SnRK2.6/OST1 odgrywa kluczową rolę w regulacji kanałów jonowych w aparatach szparkowych.

OST1 fosforyluje kanał KAT1 wpompowujący jony K^+ (Sato i wsp., 2009) oraz transportery potasu z grupy HAK/KUP w tym KUP6 i KUP8 (Osakabe i wsp., 2013). Fosforylacja kanałów przez OST1 prowadzi do zwiększenia wypływu jonów i przyśpieszenia

procesu zamykania aparatów szparkowych. OST1 w odpowiedzi na ABA fosforyluje oksydazy NADPH RbohF (ang. *Respiratory Burst Oxidase Homolog Protein F*) i RbohD (ang. *Respiratory Burst Oxidase Homolog Protein F*), co skutkuje nadprodukcją reaktywnych form tlenu (RFT) w komórkach aparatów szparkowych (Mustilli i wsp., 2002; Yoshida i wsp., 2002). Podwyższony poziom RFT w komórce prowadzi do zmiany stężenia wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} , poprzez aktywację kanałów wapniowych i uwalnianie jonów wapnia z retikulum endoplazmatycznego, wakuoli i plastydów (Hetherington i Brownlee, 2004; Roelfsema i wsp., 2010). Samo podwyższenie poziomu wapnia w komórce nie prowadzi do pełnej aktywacji kanałów typu R i S (Siegel i wsp., 2009). Dopiero w obecności ABA i aktywnych kinaz SnRK uruchamiane są kinazy CDPK (ang. *Calcium-Dependent Protein Kinases*), które aktywują kanały jonowe R i S (Brandt i wsp., 2015). Aktywne kanały powodują depolaryzację błony komórkowej komórek szparkowych, co pociąga za sobą aktywację kanału GORK (ang. *Gated Outwardly-Rectifying K^+ Channel*) (Hosy i wsp., 2003) i hamowanie kanału KAT1 (Osakabe i wsp., 2014). W wyniku obniżenia stężenia anionów i jonów K^+ w cytozolu dochodzi do zwiększenia ciśnienia osmotycznego w komórce i aktywacji akwaporyn. Wypompowywanie wody z komórek szparkowych przez akwaporyny PIP (ang. *Plasma Membrane Intrinsic Protein*) a w szczególności PIP2.1, prowadzi do obniżenia turgoru komórki szparkowej i zamknięcia aparatu szparkowego (Grondin i wsp., 2015; Groszmann i wsp., 2017). Uproszczony schemat ABA-indukowanego zamykania aparatu szparkowego przedstawiono na rysunku poniżej (Rys. 4)



Rysunek 4. Uproszczony schemat zamykania aparatów szparkowych indukowanego przez ABA

Podwyższony poziom ABA w komórce prowadzi do autoaktywacji kinazy SnRK2.6/OST1, uwalniania jonów z wakuoli i podwyższenia wewnątrzkomórkowego poziomu Ca^{2+} . Podwyższony poziom Ca^{2+} w cytoplazmie prowadzi do aktywacji szybkich i wolnych kanałów anionowych. Wypływ anionów prowadzi do depolaryzacji

blony i aktywacji kanałów wypompowujących K^+ i inhibicji kanałów wypompowujących K^+ , efektywnie obniżając poziom wewnątrz komórkowego K^+ . W sytuacji podwyższenia pH i ciśnienia osmotycznego w komórce dochodzi do aktywacji akwaporyn, obniżenia turgoru i zamknięcia aparatu szparkowego. Opracowanie własne.

1.4 Kaskady kinaz MAP

Kaskady kinaz MAP są konserwatywnymi modułami odpowiadającymi za transdukcję sygnału w komórkach eukariotycznych (Cargnello i wsp., 2011). U *Arabidopsis* kaskady kinaz MAP stanowią skomplikowaną sieć sygnałową i ogrywają niezwykle istotną rolę w regulacji procesów rozwojowych oraz odpowiedzi roślin na stres, zarówno biotyczny i abiotyczny (Danquah i wsp., 2015; Jalmi i Sinha, 2015; Xu i wsp., 2015). Typowa kaskada kinaz MAP ma hierarchiczną strukturę i zbudowana jest z trzech elementów: kinaz MAPKKK, MAPKK i MAPK. Kinazy MAPKKK aktywują MAPKK, a aktywne MAPKK następnie fosforylują kinazy MAP. W genomie *Arabidopsis* zidentyfikowano 80 genów kinaz MAPKKK, 10 genów kinaz MAPKK i 23 genów MAPK (Li i wsp., 2017). Zidentyfikowano także MAPKKKK, kinazy MAP bezpośrednio aktywujące MAPKKK (Shen i wsp., 2013) oraz kinazy aktywowane poniżej kaskady MAP- MAPKAPK (ang. *MAP Kinase-Activated Protein Kinase*) (Sinha i wsp., 2011). Szacuje się, że 10% wszystkich roślinnych kinaz może być zaangażowanych w transdukcję sygnału poprzez kaskady kinaz MAP (Colcombet i Hirt, 2008).

Kinazy MAPKKK rozpoczynające kaskadę kinaz MAP mogą być aktywowane przez szereg czynników, takich jak białka G, receptory, cytokiny oraz wspomniane wcześniej MAPKKKK (Naor i wsp., 2002; Champion i wsp., 2004; Keshet i wsp., 2010; Hamel i wsp., 2012). Aktywacja kinaz MAPKKK jest skutkiem autofosforylacji lub fosforylacji reszt seryny i treoniny znajdujących się w pętli aktywacyjnej białka. Następnie aktywne MAPKKK fosforylują kinazy niższego rzędu, MKK, poprzez fosforylację konserwatywnego motywu S/T-X3-5-S/T w sekwencji MKK zlokalizowanego pomiędzy subdomenami VII i VIII. W swej sekwencji MKK kodują również motyw K/R-K/R-K/R-X1-6-LX-L/V/I, odpowiedzialny za oddziaływanie z MAPK (Ichimura i wsp., 2002; Jin i wsp., 2003; Tanoue i Nishida, 2003). MAPK stanowią ostatni element kaskady kinaz MAP. MAPK w sekwencji swojej pętli aktywacyjnej posiadają konserwatywne motywy TEY lub TDY, które są celem dla fosforylacji dokonywanej przez MAPKK (Mohanta i wsp., 2015). Należy zaznaczyć, że niektóre z MAPK, jak na przykład MPK6, mogą również ulegać autoaktywacji (Wang i wsp., 2016). Aktywne

MAPK fosforylują szereg substratów, a celem ich aktywności jest motyw S/T-P, który występuje u większości białek Arabidopsis (Taj i wsp., 2010).

1.4.1 Kinazy MAPKKK

Strukturalnie, przedstawiciele MAPKKK u Arabidopsis wykazują duże podobieństwo w obrębie domeny katalitycznej. Różnią się natomiast strukturą N- i C-końcowych regionów regulatorowych białka (Çakır i Kılıçkaya, 2015). W obrębie sekwencji MAPKKK znajduje się sekwencja lokalizacji jądrowej (NLS, ang. *Nuclear Localization Sequence*) oraz rejony transbłonowe umożliwiające transport kinaz MAP z cytoplazmy do jądra komórkowego (Samajova i wsp., 2013). Ze względu na podobieństwo strukturalne domeny kinazowej MAPKKK u Arabidopsis dzieli się na trzy podgrupy: kinazy podobne do kinaz Raf (tzw. Raf-like), kinazy podobne do kinaz MEKK (MEKK-like), oraz kinazy podobne do kinaz ZIK (ZIK-like) (Colcombet i Hirt., 2008). Kinazy MAPKKK należące do podgrupy kinaz podobnych do kinaz Raf to 21 białek z charakterystycznym motywem GTxx(W/Y)MAPEV w domenie kinazowej, wykazujących podobieństwo do kinazy MAP typu RAF u ssaków. Białka tej podgrupy posiadają na N-końcu sekwencji białka domenę regulatorową, a na C-końcu białka domenę kinazową. W skład podgrupy MEKK wchodzi 48 białek. Charakteryzują się one motywem G(T/S)Px(W/Y/F)MAPEV występującym w domenie kinazowej i wykazującym podobieństwo strukturalne do ssacej kinazy MAP - MEKK1 (Ichimura i wsp., 2002). Wewnątrz podgrupy występuje różnorodność pod względem lokalizacji domen regulatorowych i kinazowych – występują one zarówno na N- jak i na C-końcu oraz w środku sekwencji białek. Do ostatniej podgrupy - ZIK - zalicza się 11 białek z charakterystycznym motywem GTPEFMAPE(L/V)Y. Cechą wspólną MAPKKK jest występowanie domeny regulatorowej zawsze na C-końcu sekwencji białka (Çakır i Kılıçkaya, 2015). Członkowie podgrup kinaz podobnych do MEKK oddziałują z kinazami MAPKK u roślin i biorą udział w transdukcji sygnału poprzez kaskady kinaz MAP (Hirt i wsp., 2008). Brakuje dowodów eksperymentalnych na oddziaływanie kinaz MAPKKK podgrupy ZIK i Raf z MAPKK u roślin.

Pomimo 80 różnych MAPKKK u Arabidopsis scharakteryzowano w pełni jedynie kilka kompletnych kaskad kinaz MAP. Pierwszą opisaną w pełni kaskada kinaz MAP u Arabidopsis była kaskada MEKK1-MKK4/MKK5-MPK3/MPK6 (Asai i wsp., 2002). Kaskada ta jest zaangażowana w odpowiedź obronną na patogeny poprzez aktywację czynników transkrypcyjnych WRKY22 i WRKY29, a kinaza MEKK1 (MAPKKK8) jest aktywowana bezpośrednio przez receptor bakteryjnej flagelliny (FLS2, ang. *Flagellin Sensitive 2*)

(Asai i wsp., 2002). Drugą opisaną kaskadą kinaz MAP, również rozpoczynającą się od MEKK1, była kaskada MEKK1-MKK2-MPK4/MPK6 (Teige i wsp., 2004). Kaskada jest zaangażowana w odpowiedź na stres zimna i stres zasolenia (Teige i wsp., 2004; Kong i wsp., 2012). Trzecią kaskadą opisaną u *Arabidopsis* była kaskada YODA-MKK4-MKK5-MPK3/MPK6. Kaskada rozpoczynająca się kinazy YODA zaangażowana jest przede wszystkim w rozwój aparatów szparkowych w epidermie (Wang i wsp., 2007), ale również reguluje procesy związane z kwitnieniem (Meng i wsp., 2012). W roku 2009 Lampard i wsp. udokumentowali, że kinaza YODA aktywuje również kinazy MKK7 i MKK9, które fosforylują kinazy MPK3/MPK6, a cały moduł reguluje rozwój aparatów szparkowych (Lampard i wsp., 2009). Rolę kaskady YODA-(MKK4/5)(MKK7/9)-MPK3/6 w procesie tworzenia aparatów szparkowych opisano szczegółowo w rozdziale 1.2 (Wstęp, 1.2). W roku 2015 opisano pierwszą kaskadę aktywowaną przez ABA – MAPKKK17/18-MKK3-MPK1/2/7/14 (Matsuoka i wsp., 2015; Danquah i wsp., 2015), a w roku 2016 kolejną – MKKK20-MKK5-MPK6 (Li i wsp., 2017). Kaskada rozpoczynająca się od MKKK20 (AIK1) pozytywnie reguluje aktywność aparatów szparkowych i procesy związane z wydłużaniem korzenia głównego. Linie typu nokaut w genie *AIK1* wykazują zwiększoną utratę wody w procesie transpiracji, a aparaty szparkowe badanych roślin pozostają bardziej otwarte po traktowaniu egzogennym ABA, niż aparaty szparkowe linii typu dzikiego. W epidermie dorosłych roślin linii *aik* obserwuje się jednocześnie więcej aparatów szparkowych, w porównaniu z linią typu dzikiego (Li i wsp., 2017). MAPKKK20 oddziałuje również z modułem kinazą MKK3 w kolejnej kaskadzie zaangażowanej w procesy związane z rozwojem korzeni (Benhamman i wsp., 2017). Zespół udokumentował również, że MAPKKK20 fosforyluje bezpośrednio kinazę MPK18, bez udziału kinazy MKK (Benhamman i wsp., 2017). Stanowi to zupełnie nowy i nieudokumentowany wcześniej mechanizm regulacji transdukcji sygnału poprzez kaskady kinaz MAP.

1.4.1.1 Kaskada MAPKKK17/18-MKK3-MPK1/2/7/14

MAPKKK18 jest najmniejszym przedstawicielem kinaz MAPKKK u *Arabidopsis* i należy do podgrupy MEKK. Białko to zbudowane jest z 339 aminokwasów, o łącznej masie 37,7 kDa. MAPKKK18 wyróżnia się spośród pozostałych członków podgrupy MEKK brakiem charakterystycznej domeny regulatorowej na N-końcu sekwencji, przez co białko składa się prawie wyłącznie z domeny katalitycznej. Wyrażne zwiększenie transkrypcji *MAPKKK18* obserwuje się wyniku indukcji egzogennym ABA, kwasem jasmonowym (Manges i wsp.,

2008) i ozonem (Ludwików i wsp., 2009). W wyniku indukcji egzogennym ABA obserwuje się aktywność promotora genu *MAPKKK18* w aparatach szparkowych, hydatodach, merystemach wierzchołkowych korzeni i organach kwiatowych – płatkach, trzonkach pręcików i słupku (Okamoto i wsp., 2013; Mituła i wsp., 2015). Zwiększona transkrypcja *MAPKKK18* jest także indukowana przez zranienie i stres osmotyczny (Hoth i wsp., 2002; Leonhardt i wsp., 2004). Ekspresja genu *MAPKKK18* jest także regulowana w odpowiedzi na działanie promieni UV-B – poprzez aktywność fotoreceptora UV-R8 (ang. *UV-Resistance Locus 8*) (Fierro i wsp., 2014). Indukcja ekspresji *MAPKKK18* przez stres osmotyczny jest zależna od ścieżki sygnalizacyjnej ABA (Li i wsp., 2016).

Pomimo szeregu wyników wskazujących na udział *MAPKKK18* w transdukcji ABA u *Arabidopsis* kaskada kinaz MAP zależna od *MAPKKK18* została zidentyfikowana w 2015 r. Matsuoka z zespołem, wykorzystując dwuhybrydowy system drożdżowy udokumentowali oddziaływanie pomiędzy *MAPKKK18* i *MAPKK3*. Co więcej, wykazali także, że aktywność kinazowa *MAPKKK18* jest indukowana przez ABA, a *MAPKKK18* może również ulegać autoaktywacji. Poziom ekspresji *MAPKKK18* rośnie w wyniku indukcji ABA, zwiększając się 60-ciokrotnie w czasie 180 minut od indukcji. Podobny wzrost ekspresji zaobserwowali dla genu fosfatazy *ABI1*, stanowiącego kontrolę eksperymentu. Zespół stawia hipotezę, że *MAPKKK18* bierze udział w procesach związanych ze starzeniem tkanek. Nadekspresja *MAPKKK18* u *Arabidopsis* prowadzi do obniżenia ilości chlorofilu w liściach, w porównaniu z linią typu dzikiego, w normalnych warunkach hodowli. Po podaniu egzogenego 50 μ M ABA przez cztery dni obserwowano szybsze zażółcenie liści rozety linii roślin z nadekspresją genu *MAPKKK18* (*35S:MAPKKK18*). Utrata chlorofilu, w porównaniu z linią typu dzikiego, zwiększona była o 50%. Również poziom utraty wody z tkanek jest większy w przypadku linii z nadekspresją *MAPKKK18* (Vaidya i wsp., 2017).

W tym samym roku 2015 Danquah i wsp. scharakteryzowali pełną kaskadę kinaz MAP rozpoczynającą się od *MAPKKK18* i *MAPKKK17*. *MAPKKK17*, podobnie jak *MAPKKK18*, jest przedstawicielem podgrupy MEKK. Obie kinazy charakteryzuje wysokie podobieństwo sekwencji na poziomie białka. Białko *MAPKKK17* zbudowane jest z 372 aminokwasów, o łącznej wadze 42 kDa. Ekspresja *MAPKKK17*, podobnie jak *MAPKKK18*, indukowana jest przez ABA i stres związany z atakiem patogenów (Menges i wsp., 2008). Do roku 2015 niewiele było wiadomo na temat funkcji *MAPKKK17* u *Arabidopsis*, aż zespół Danquah i wsp. wykazał podobieństwo funkcjonalne pomiędzy *MAPKKK17* i *MAPKKK18* (Danquah i wsp., 2015). Badania Choi i wsp. (2016) sugerują, że również inne kinazy MEKK

(MAPKKK14/15/16/17) mogą pełnić podobne funkcje jak MAPKKK17 i MAPKKK18 (Choi i wsp., 2016). Zespół Danquah i wsp. udokumentował oddziaływanie MAPKKK17/18 z MAPKK3 z wykorzystaniem dwuhybrydowego systemu drożdżowego i techniki BiFC. Wykazano także zdolność modułu MAPKKK17/18-MAPKK3 do aktywacji wszystkich MAPK podgrupy C - MPK1, MPK2, MPK7 oraz MPK14, która nie została zidentyfikowana jako element kaskady w badaniach Matsuoka i wsp., (2015). Dodatkowo, wyniki Danquah i wsp. (2015) potwierdzają wcześniejsze doniesienia (Ludwików i wsp., 2009), że do transkrypcji genu *MAPKKK18* niezbędna jest poprawnie działająca rdzeniowa sygnalizacja ABA. Najnowsze badania również potwierdzają ten wniosek - obserwuje się obniżenie o 80% ilości transkryptu *MAPKKK18* w linii mutantu *pyr1/pyl1* (Vaidya i wsp., 2017). Aktywność MAPKKK18 jest ściśle kontrolowana nie tylko na poziomie transkrypcyjnym, ale także na poziomie potranslacyjnym - traktowanie egzogennym ABA ogranicza degradację MAPKKK18, aktywność ABI1 wpływa na stabilizację MAPKKK18, poprzez kierowanie białka do degradacji przez proteasom 26S (Mituła i wsp., 2015). Fosfataza białkowa ABI1 również hamuje aktywność kinazową MAPKKK18 (Mituła i wsp., 2015). Li i wsp. w 2016 roku powiązali rolę MAPKKK18 w sygnalizacji ABA z odpowiedzią na stres suszy. Nadekspresja genu *MAPKKK18* prowadzi do zwiększonej odporności, a wyłączenie genu do większej wrażliwości na stres suszy. Zespół zaobserwował także zwiększoną aperturę aparatów szparkowych i większą ich liczbę na dojrzałych liściach u roślin typu nokaut w genie *MAPKKK18* (Li i wsp., 2016).

1.4.2 Kinazy MAPKK

MKK stanowią najmniejszą podgrupę spośród wszystkich kinaz MAP u roślin. U *Arabidopsis* opisuje się jedynie 10 MKK, dziewięć u kukurydzy, a jedynie osiem u ryżu (Kumar i wsp., 2014). MKK u *Arabidopsis* podzielono na cztery podgrupy: A (MKK1, MKK2 i MKK6), B (MKK3), C (MKK4 MKK5) i D (MKK7, MKK8, MKK9 i MKK10) (Ichimura i wsp., 2002). Wewnątrz poszczególnych podgrup, MKK oddziałują z określonymi MPK w regulacji w różnych procesów komórkowych. Wszyscy przedstawiciele podgrupy A aktywują MPK4, funkcjonalnie natomiast MKK1 jest wiązana z odpowiedzią na patogenezę i w sygnalizacji powiązanej z RFT (Pitzke i wsp., 2009), kinaza MKK2 z odpowiedzią na stres zimna i zasolenia (Teige i wsp., 2004), a MKK6 z regulacją procesu mitozy i cytokinezy (Takahashi i wsp., 2010). Jedyne przedstawiciel podgrupy B, kinaza MKK3, charakteryzuje się specyficzną budową – na C-końcu sekwencji posiada tzw. czynnik transportu jądrowego (NTF,

ang. *Nuclear Transfer Factor*), jednak nie opisano konkretnego wpływu tego motywu na funkcje MKK3 (Hamel i wsp., 2006). MKK3 oddziałuje z MPK6 w sygnalizacji kwasu jasmonowego (Takahashi i wsp., 2007), z MPK7 i MPK8 w sygnalizacji związanej z RFT (Dóczy i wsp., 2007) oraz z kinazami MPK1/2/7/14 w odpowiedzi na ABA (Danquah i wsp., 2015). Przedstawiciele podgrupy C, czyli MKK4 i MKK5 oddziałują z MPK3 i MPK6 w ścieżkach związanych z odpornością roślin na patogeny – nie tylko aktywują ekspresję czynników transkrypcyjnych WRKY22/WRKY29 (Asai i wsp., 2002), ale również regulują proces tworzenia aparatów szparkowych poprzez blokowanie wejścia komórek epidermy w linię rozwojową aparatów szparkowych i tworzenie komórek macierzystych szparek (GMC) (Wang i wsp., 2007). Kinazy MKK4 i MKK5 posiadają specyficzne motywy regulujące ich aktywność, zlokalizowane w N-końcowych domenach białek. Udział MKK5, ale już nie MKK4, opisano również w odpowiedzi na stres oksydacyjny MKK5 (Xing i wsp., 2013). Przedstawiciele podgrupy D, kinazy MKK7 i MKK9, zaangażowane są w odpowiedź na stres związany z atakiem patogenów - poprzez aktywację kinaz MPK3 i MPK6 regulują ścieżkę sygnalizacyjną etylenu (Hahn i Harter, 2009). Kinazy MKK7 i MKK9 biorą również udział w procesie tworzenia aparatów szparkowych, gdzie wraz z MKK4 i MKK5 na początkowych etapach blokują rozwój aparatów szparkowych, a na końcowym etapie promują dojrzewanie GMC (Lampard i wsp., 2014). Aktywność MKK7 i MKK9 zaobserwowano również w procesie starzenia tkanek (Zhou i wsp., 2009). Z wykorzystaniem dwuhybrydowego systemu drożdżowego udokumentowano również oddziaływanie MKK7 z MPK15 oraz MKK9 z MPK7/17/19, brak jednak dalszych dowodów na potwierdzenie oddziaływań tych kinaz (Lee i wsp., 2008). Kinazy MKK7 i MKK9 posiadają w C-końcowej części białka domeny dokujące, które są odpowiedzialne za właściwą aktywność kinaz, poprzez regulację ich lokalizacji komórkowej (Lampard i wsp., 2014). Niewiele wiadomo na temat funkcji dwóch pozostałych przedstawicieli podgrupy D kinaz MKK – MKK8 i MKK10. Dotychczas nie udokumentowano żadnego oddziaływania MKK8 z MAPK (Lee i wsp., 2008, Kumar i wsp., 2012). Brak oddziaływań z MAPK jest prawdopodobnie spowodowany jej niskim poziomem ekspresji, ponieważ kinaza MKK8 posiada w swojej sekwencji wszystkie motywy charakterystyczne dla MKK, niezbędne do fosforylacji MAPK (Hamel i wsp., 2006). Natomiast w sekwencji MKK10 występuje trójaminokwasowa delekcja wewnątrz konserwatywnego motywu S/T-X3-5-S/T. Pomimo uszkodzenia konserwatywnego motywu wymaganego do aktywacji MKK, z wykorzystaniem dwuhybrydowego systemu drożdżowego udokumentowano oddziaływanie MKK10 z MPK17. Nie sprawdzono jednak tego oddziaływania *in vitro* (Lee i wsp., 2008). Inne badania, z wykorzystaniem mikromacierzy, wykazały, że MKK10 może fosforylować *in vitro*

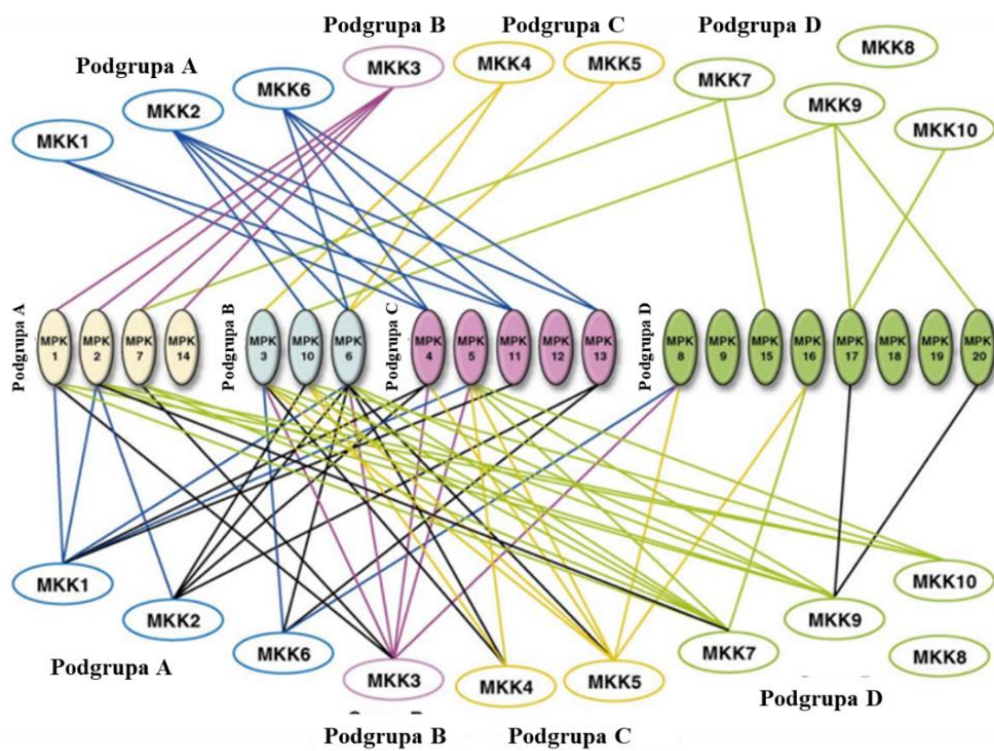
kinazy MAPK1/2/5/10 (Popescu i wsp., 2009). Dotychczas nie określono w jakich ścieżkach sygnalizacyjnych mogą być aktywne kinazy MKK8 i MKK10.

1.4.3 Kinazy MAPK

U *Arabidopsis* do podgrupy MAPK zalicza się 23 białka, które ze względu na podobieństwo sekwencji zostały na cztery podgrupy: A (MPK3/6/10), B (MPK4/5/11/12/13), C (MPK1/2/7/14), D (MPK8/9/15/16/17/18/19/20) (Ichimura i wsp., 2002). Pod względem struktury białka, kinazy należące do podgrup A, B i C są do siebie podobne i posiadają charakterystyczny motyw TEY w sekwencji pętli aktywacyjnej. Białka podgrupy D charakteryzują się motywem TDY wewnątrz pętli aktywacyjnej oraz brakiem domeny katalitycznej na C-końcu sekwencji, odpowiedzialnej za oddziaływania z MAPKK i innymi białkami (Hirt i wsp., 2008). Aktywność kinaz MAPK podgrupy A wiąże się z odpowiedzią na fitohormony i stres środowiskowy (Ichimura i wsp., 2002, Dóczy i wsp., 2007; Hirt i wsp., 2008, Matsuoka i wsp., 2015, Danquah i wsp., 2015). Grupa B kinaz MAPK została funkcjonalnie powiązana z odpowiedzią na stres i regulacją procesów rozwojowych (Meng i wsp., 2012; Guan i wsp., 2014; Sethi i wsp., 2014; Xu i wsp., 2014). Wszyscy przedstawiciele podgrupy C są aktywowani przez MAPKK3 i biorą udział w transdukcji sygnału związanej z atakiem patogenów (Dóczy i wsp., 2007). Niewiele wiadomo natomiast na temat funkcji przedstawicieli podgrupy D. Oddziaływania pomiędzy MKK i MAPK tworzą skomplikowaną sieć interakcji, w której krzyżują się i komunikują różne ścieżki sygnalizacyjne. Pojedyncza MAPK może być aktywowana przez kilka MKK, a aktywna MAPK może fosforylować wiele substratów (Popescu i wsp., 2009; Andreasson i Ellis, 2010). Rozbudowana sieć oddziaływań pomiędzy MKK, MAPK i ich substratami powoduje, że dotychczas nie opisano szczegółowo funkcji wielu MAPK.

Wszyscy przedstawiciele podgrupy A kinaz MAPK są elementem jednej kaskady kinaz MAP - MAPKKK17/18-MKK3-MPK1/2/7/14, która jest aktywowana przez ABA, reguluje procesy starzenia tkanek oraz transpiracji (Dóczy i wsp., 2007; Matsuoka i wsp., 2015; Danquah i wsp., 2015; Wstęp 1.4.1.1). Najlepiej scharakteryzowanym przedstawicielem kinaz MAPK podgrupy B jest MPK6, dla której opisano najwięcej partnerów białkowych i funkcji. MPK6 jest aktywowana przez szereg MKK - MKK2 (Teige i wsp., 2004), MKK3 (Sethi i wsp., 2014), MKK4, MKK5 (Zhao i wsp., 2014), MKK7 (Jia i wsp., 2016) i MKK9 (Zhou i wsp., 2009), a jednocześnie fosforyluje ponad 39 białek (Feilner i wsp., 2005). Należy w tym miejscu zaznaczyć, że pojedyncza MAPK może fosforylować ponad 100 różnych substratów (Popescu

i wsp., 2009). Kolejny przedstawiciel podgrupy B, kinaza MPK3, charakteryzuje się podobną aktywnością jak MPK6 (Leissing i wsp., 2016). Do najważniejszych substratów MPK6 i MPK3 należą czynniki transkrypcyjne SPCH (regulator procesu tworzenia aparatów szparkowych) (Lampard i wsp., 2008), EIN3 (regulator sygnalizacji etylenu) (Yoo i wsp., 2008) oraz czynniki transkrypcyjne WRKY22/29 (regulatory odporności na patogeny) (Asai i wsp., 2002). Kinazy MPK3 i MPK6 są aktywowane przez ABA (Ichimura i wsp., 2000; Brock i wsp., 2010) oraz regulują proces zamykania aparatów szparkowych w reakcji obronnej przeciw patogenom (Gudesblat i wsp., 2007; Montillet i wsp., 2013). Niewiele wiadomo na temat funkcji MPK10, trzeciego przedstawiciela podgrupy B. Kinaza MPK10 pełni inną rolę niż MPK3/6 i jest aktywna jedynie w wąskim przedziale czasowym na wczesnych etapach rozwoju liści, kiedy to odpowiada za regulację transportu auksyn, pomimo bardzo niskiego poziomu ekspresji (Stanko i wsp., 2014).



Rysunek 5: Oddziaływania pomiędzy kinazami MKK i MAPK u Arabidopsis

W górnym rzędzie przedstawiono oddziaływania udokumentowane z wykorzystaniem drożdżowego systemu dwuhybrydowego, w dolnym rzędzie oddziaływania udokumentowane metodami *in vitro* lub *in planta*. Kolorami oznaczono przynależność do poszczególnych podgrup kinaz MKK i MAPK. Na podstawie Adreasson i Ellis, 2010.

Kolejną dobrze poznaną kinazą MAPK jest kinaza MPK4, przedstawiciel podgrupy C. MPK4 odgrywa bardzo istotną rolę we wczesnej reakcji obronnej przeciw patogenom, gdzie odpowiada za komunikowanie się dwóch ścieżek sygnalizacyjnych – kwasu salicylowego i kwasu jasmonowego. MPK4 poprzez oddziaływanie w kompleksie z MKS1 (ang. *MPK4 substrate 1*) reguluje aktywność czynników transkrypcyjnych WRKY25 i WRKY33 (Andreasson i wsp., 2005), co prowadzi do zmian profilu ekspresji genów i hamowania ścieżek sygnalizacyjnych w reakcjach obronnych regulowanych przez SA (Zheng i wsp., 2007), przy jednoczesnym promowaniu reakcji obronnych regulowanych przez JA (Zheng i wsp., 2006). Obecność białka MPK4 dokumentuje się również w komórkach szparkowych (Zhao i wsp., 2008). MPK4 jest aktywowana przez ABA (Brock i wsp., 2010) i jej aktywność wiąże się z procesem zamykania aparatów szparkowych przed patogenami, jednak nie bezpośrednio z regulacją ruchów szparek (Berriri i wsp., 2012).

Kinazy MPK12 i MPK9 również stanowią istotny element mechanizmu zamykania aparatów szparkowych (Jammes i wsp., 2009). W linii *mpk9mpk12* obserwuje się nie tylko brak zamykania aparatów szparkowych pod wpływem ABA, ale także zahamowanie otwierania szparek. Jest to wynikiem aktywności kanałów anionowych w komórkach szparkowych mutantu *mpk9mpk12*, co skutkuje zwiększoną utratą wody w procesie transpiracji (Jammes i wsp., 2009).

Do najsłabiej poznanej podgrupy MAPK należy podgrupa D. Wiadomo, że przedstawiciele podgrupy D mają potencjał do oddziaływań z MAPK (Popescu i wsp., 2009), jednak do tej pory opisano jedynie udział MPK8 w transdukcji sygnału podczas stresu zranienia, gdzie MPK8 odpowiada za regulację aktywności RFT w komórce. Do pełnej aktywacji wymaga fosforylacji przez MKK3 przy jednoczesnym oddziaływaniu z kalmoduliną (Takahashi i wsp., 2011).

Niewiele wiadomo na temat pozostałych przedstawicieli MAPK. W literaturze szeroko opisuje się indukcję ekspresji szeregu MAPK przez wiele czynników zewnętrznych (Menges i wsp., 2008), jednak niewiele wiadomo na temat konkretnych funkcji pozostałych przedstawicieli MAPK.

2. Założenia i cel pracy

Kluczowym nurtem obecnie prowadzonych badań jest identyfikacja genów regulujących odpowiedź roślin na stres oraz modelowanie regulowanych przez nie sieci sygnalizacyjnych. Kwas abscysynowy (ABA) jest uznawany za najważniejszy hormon roślinny regulujący odpowiedź roślin na stres suszy. Jednym z kluczowych mechanizmów transdukcji sygnału ABA są kaskady kinaz MAP i pomimo ich niezwykle ważnej funkcji w tej sygnalizacji, kompleks kaskady kinaz MAP aktywowanej przez ABA pozostawał nieznany. W niniejszej pracy, opierając się na przesłankach literaturowych i wynikach badań prowadzonych z Zakładzie Biotechnologii, postanowiono sprawdzić, czy kinaza MAPKKK18 uczestniczy w transmisji sygnału ABA. Promotor genu *MAPKKK18* nie tylko jest silnie indukowany przez ABA, ale również jego aktywność obserwuje się w merystemach korzeni oraz aparatach szparkowych. Na tej podstawie głównym celem tej pracy jest **poznanie ścieżki sygnałowej regulowanej przez MAPKKK18**.

Pracę badawczą skoncentrowano na dwóch zagadnieniach: 1) poznaniu funkcji MAPKKK18 jako elementu ścieżki sygnalizacyjnej ABA oraz 2) identyfikacji mechanizmów regulujących aktywność kinazową MAPKKK18. W związku z tym, w prezentowanej rozprawie doktorskiej, aby osiągnąć wyznaczone cele, określono następujące zadania:

1. Analiza aktywności kinazowej MAPKKK18;
2. Identyfikacja mechanizmów determinujących lokalizację subkomórkową MAPKKK18;
3. Charakterystyka oddziaływań MAPKKK18 z białkami rdzeniowej sygnalizacji ABA;
4. Analiza funkcji MAPKKK18 w regulacji kiełkowania nasion oraz rozwoju i ruchów aparatów szparkowych;
5. Analiza oddziaływań między białkami kompleksu kinazy MAPKKK18.

3. Materiały

3.1 Szczepy bakteryjne *Escherichia coli*

- DB3.1 *gyrA462 endA1 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20 glnV44 (=supE44) ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20 xyl5 leuB6 mtl1*
- DH5α F⁻ *endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17(rK⁻,mK⁺), supE44, relA1F⁻, Φ 80 (lacZ)ΔM15, Δ (lacZYA-argF),U169*
- One Shot® TOP10, F⁻ *mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 Δ lacX74 recA1 araD139Δ(araleu)7697galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG (Invitrogen)*
- One Shot® OmniMAX™2T1R, F⁺{*proAB lacIq lacZΔM15 Tn10(TetR)Δ(ccdAB)*} *mcrA Δ(mrr hsdRMS-mcrBC) Φ 80(lacZ)ΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 endA1 recA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA panD (Invitrogen)*

3.2 Materiał roślinny

- *Arabidopsis thaliana* ekotyp Columbia (Col-0)
- *mapkkk18-1* (SALK_087047)
- *mapkkk18-2* (GK-244G02)
- *MAPKKK18oe* (Col-0/35S:MAPKKK18-GFP)
- *mkk7* (CS104671)
- *mkk7mapkkk18* (CS104671 x SALK_087047), linia przygotowana przez mgr Małgorzatę Tajdel-Zielińską, Zakład Biotechnologii UAM

3.3 Pożywki do hodowli

- **Pożywka LB (Lysogeny Broth) do hodowli bakterii**
0,5% (w/o) ekstrakt drożdżowy (BIOCORP), 1% (w/o) trypton (BIOCORP), 1% (w/o) NaCl (Chempur), pH 7,4 uzyskiwane za pomocą 1M NaOH (Chempur). Do pożywki stałej po sterylizacji i ostudzeniu pożywki do temperatury ~50°C, dodano agar w stężeniu 1,5% (w/o) i antybiotyków o stężeniu podanym w poniższej tabeli.

Antybiotyk	Stężenie wyjściowe	Stężenie końcowe
Kanamycyna	25 mg/ml	25 µg/ml
Ampicylina	100 mg/ml	100 µg/ml
Chloramfenikol	35 mg/ml	35 µg/ml

- **Pożywka do podlewania roślin**

Skład na 1000 ml gotowej pożywki: 5 ml roztwór KNO₃ (10% w/o), 2,5 ml roztwór Na₂EDTA·2H₂O (0,75% w/o), 2,5 ml roztwór FeSO₄·7H₂O (0,56 % w/o), 2,5 ml roztwór KH₂PO₄ (17,42% w/o), 2 ml roztwór MgSO₄ (24,65% w/o), 2 ml roztwór Ca(NO₃)₂ (23% w/o), 1 ml roztwór mikroelementów (70 mM H₃BO₃, 14 mM MnCl₂, 0,5 mM CuSO₄, 1 mM ZnSO₄, 0,2 mM NaMoO₄, 10 mM NaCl, 0,01 mM CoCl₂).

Przed przygotowaniem pożywki roztwory wyjściowe sterylizowano. Poprzez autoklawowanie (121°C, 1 atm., 20 minut) poddawano sterylizacji bufor KNO₃, KH₂PO₄. Roztwory MgSO₄, Ca(NO₃)₂ i roztwór mikroelementów filtrowano przez sącze z filtrem o średnicy porów 0,22 µm (Millipore). Roztwory Na₂EDTA·2H₂O, FeSO₄·7H₂O zagotowywano, nie autoklawowano.

- **Pożywka MS (Murashige and Skoog, 1962) do hodowli roślin *in vitro* (Sigma)**

Do przygotowania 200 ml pożywki ½ MS wykorzystano 0,44 g gotowej pożywki MS z witaminami, 1,6 g agaru do roślin i 1% (w/o) sacharozy. Pożywkę sterylizowano w autoklawie, a po ostudzeniu do temperatury poniżej 50°C stosowne porcje pożywki wylano na sterylne szalki.

3.4 Enzymy

- *Mlu*I – Thermo Fisher Scientific
- Celulaza, macerozym - Serva
- *Taq* polimeraza DNA – Thermo Fisher Scientific
- *Pfu* polimeraza DNA – Thermo Fisher Scientific

3.5 Odczynniki

- Akrylamid (BioShop)
- APS (Sigma-Aldrich)
- Etanol (POCH)
- SDS (Sigma-Aldrich)
- TEMED (Sigma-Aldrich)
- Tris (Sigma-Aldrich)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich)
- Metanol (POCH)
- MES (Sigma-Aldrich)
- Mannitol (Sigma-Aldrich)
- PEG3000 (Sigma-Aldrich)
- MgCl_2 (POCH)
- KCL (POCH)
- „Dynabeads[®] z białkiem A o stęż. 30 mg Dynabeads/ml (Thermo Fisher Scientific)
- MBP (Sigma-Aldrich)
- Marker masy “PageRuler™ Prestained Protein Ladder”, 10-180 kDa (Thermo Fisher Scientific)
- Marker długości DNA „GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific)

4. Metody

4.1 Sterylizacja powierzchniowa

Nasiona przeznaczone do hodowli na torfach sterylizowano poprzez jednokrotne przemycie nasion 70% roztworem etanolu, jednokrotne przemycie 30% roztworem wybielacza ACE i czterokrotne przemycie wodą destylowaną.

Nasiona przeznaczone do sterylnych hodowli na szalkach sterylizowano w oparach 3% HCl i 5,2% wybielacza ACE przez 4,5 godziny.

4.2 Hodowla i traktowanie roślin *Arabidopsis thaliana*

Nasiona po sterylizacji wysiano na torfy lub szalki z pożywką $\frac{1}{2}$ MS z dodatkiem 1% sacharozy. Nasiona wernalizowano trzy dni w temperaturze 4°C. Hodowle prowadzono w szafach hodowlanych w warunkach: fotoperiod 16 godz. światła i 8 godz. ciemności, temperatura 21°C, naświetlenie 150-200 $\mu\text{E}/\text{m}^2$. Traktowanie materiału roślinnego kwasem abscysynowym ($\pm\text{ABA}$) i nadtlenkiem wodoru (H_2O_2) wykonano na 3-tygodniowych roślinach poprzez rozpylenie z atomizera czynnika traktującego bezpośrednio na liście rozety. Końcowe stężenia czynników indukujących podano przy opisie eksperymentów.

4.3 Krzyżowanie linii *Arabidopsis thaliana*

Do procedury krzyżowania przystępowano w godzinach rannych, kiedy pąki kwiatowe są otwarte. Przed przystąpieniem do krzyżowania z roślin usuwano pesetą otwarte kwiaty i zapylone słupki. U rośliny matczynej otwierano pąk kwiatowy z pomocą pesety i usuwano z niego pręciki. Na tak odsłonięty pręcik наносzono pyłek bezpośrednio z kwiatów rośliny ojcowskiej. Po zapyleniu, słupki rośliny matczynej zabezpieczano folią. Procedurę powtarzano dla około 10 kwiatów każdej z matczynek roślin. Tak przygotowane rośliny hodowano w normalnych warunkach przed 15-25 dni, aż do wykształcenia łuszczyнки z nasionami. Po tym czasie łuszczyнки przenoszono do próbek typu Eppendorf i wysiewano dopiero po zakończeniu dojrzewania nasion.

4.4 Transformacja *Arabidopsis thaliana* metodą agroinfiltracji

Rośliny *Arabidopsis thaliana* hodowano w torfach aż do etapu wykształcenia łodyg kwiatowych. Przed rozpoczęciem transformacji usuwano rozwinięte pąki kwiatowe z łodyg. Do transformacji wykorzystywano płynną hodowlę w fazie logarytmicznego wzrostu bakterii *Agrobacterium tumefaciens* transformowanych wektorem pEarleyGate103 niosącym odpowiedni gen. Hodowlę następnie wirowano 20 minut, 10 tys. rpm. Po wirowaniu supernatant usuwano, a pelet bakteryjny zawieszono w 5% roztworze sacharozy. Bakterie ponownie wirowano 5 minut, 10 tys. rpm. Po odebraniu supernatantu osad zawieszano w 2 ml roztworu 5% sacharozy. Tak przygotowane bakterie dodawano do 190 ml roztworu infiltracyjnego (5% sacharoza, 0.03% Silwet L-77). Nierozwinięte pędy kwiatowe zanurzano w przygotowanej zawieszynie bakteryjnej na 30 sekund. Następnie rośliny umieszczano w kuwetach w pozycji poziomej i nakrapiano zawiesinę bakteryjną na pąki kwiatowe. Kuwety szczelnie przykrywano folią aluminiową w celu zapewnienia braku dostępności światła i warunków wysokiej wilgotności. Następnego dnia rośliny przenoszono do fitotronu i hodowano w standardowych warunkach aż do zbioru nasion.

4.5 Przygotowanie komórek kompetentnych *E. coli* metodą rubidową

Szczepy bakteryjne hodowano przez noc w 37°C z wytrząsaniem, następnie zaszczipiano w 20 ml płynnej pożywki LB. Hodowlę prowadzono do OD₆₀₀ na poziomie 0,3-0,5 (wczesna faza logarytmicznego wzrostu), następnie wirowano, a pelet bakteryjny zawieszano w 4 ml buforu CM1. Bakterie inkubowano w buforze przez 20 minut w temp. 4°C, po czym hodowlę wirowano i osad zawieszano w 400 µl buforu CM2. Bakterie zawieszone w buforze CM2 inkubowano 3 godziny w temp. 4°C, po czym porcjowano po 50 µl i zamrażano w ciekłym azocie. Tak przygotowane komórki kompetentne przechowywano w temp. -80°C, do momentu użycia.

- **Bufor CM1:** 100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 10 mM NaOAc, 5 mM NaCl, , 15% glicerol
- **Bufor CM2:** 70 mM CaCl₂, 10 mM RbCl, 10 mM NaOAc, , 5 mM MnCl₂, 15% glicerol

4.6 Transformacja bakterii

- Komórki kompetentne *E. coli* rozmrożono w lodzie, dodano 100 ng wektora i inkubowano 30 minut w temp. 4°C. Po inkubacji mieszaninę umieszczono w temp. 42°C na 2 minuty (tzw. *heat shock*). Po schłodzeniu do mieszaniny dodano 1 ml pożywki LB. Bakterie hodowano z wytrząsaniem przez 1 godz. w temp. 37°C. Zregenerowane bakterie wirowano 2 minuty, 12 tys. rpm. Po usunięciu supernatantu pelet bakteryjny zawieszono w 50 µl sterylnej wody i wysiano na szalki z odpowiednim antybiotykiem selekcyjnym.
- *Agrobacterium tumefaciens* hodowano w 20 ml płynnej pożywki LB z odpowiednimi antybiotykami w 28°C z wytrząsaniem. Po uzyskaniu OD600 hodowli na poziomie 1.0, bakterie wirowano (10 min., 4°C, 1000 g). Pelet bakteryjny zawieszano w objętości 250 µl 20 mM CaCl₂. Następnie 100 µl bakterii przenoszono do probówki typu Eppendorf o objętości 1,5 ml zawierającej 500 ng plazmidowego DNA. Bakterie zamrażano w ciekłym azocie i natychmiast przenoszono do temperatury 37°C i inkubowano 5 min. Po tym czasie do bakterii dodawano 1 ml płynnej pożywki LB i inkubowano 3,5 godziny (28°C, z wytrząsaniem). Następnie bakterie wirowano, zawieszano w 100 µl pożywki LB i 50 µl zawiesiny wysiewano na szalki ze stałą pożywką LB i odpowiednimi antybiotykami. Bakterie hodowano w temperaturze 28°C przez 2 dni, aż do uzyskania kolonii.

4.7 Hodowla bakterii *E. coli* w pożywce płynnej i izolacja plazmidowego DNA

Wyselekcjonowane kolonie bakterii *E. coli* zaszczerpiono do płynnej pożywki LB, hodowano przez noc (16 godz.) w temp. 37°C z wytrząsaniem (200 rpm). Po zakończonej inkubacji hodowlę wirowano (12 tys. rpm). Osad bakteryjny wykorzystano do izolacji plazmidowego DNA z użyciem zestawów:

- GeneJET Plasmid Miniprep Kit (ThermoFisher Scientific) – plazmidowe DNA izolowane zestawem używano do przygotowania konstruktyw wektorowych;
- NucleoBond® Xtra Midi (Macherey Nagel) - plazmidowe DNA izolowano do transfekcji protoplastów.

Izolacje plazmidowego DNA z bakterii prowadzono zgodnie z protokołami dostarczonymi przez producentów zestawów.

4.8 Charakterystyka fenotypowa mutantów *Arabidopsis thaliana*

4.8.1 Analizy ruchów aparatów szparkowych

Ruchy aparatów szparkowych analizowano na 5-tygodniowych liściach *Arabidopsis thaliana* Col-0 (linia dzika WT), u mutantów *mapkkk18-1* (SALK_087047), *mapkkk18-2* (GK-244G02) oraz roślin z nadekspresją *MAPKKK18* - *MAPKKK18oe* (Col-0/35S:MAPKKK18-GFP). Materiał umieszczono w buforze otwierającym i inkubowano w świetle przez 2 godz. w temp. 20°C. Po inkubacji z użyciem mikroskopu świetlnego potwierdzano pełne otwarcie aparatów szparkowych. Następnie liście ponownie inkubowano w tych samych warunkach w buforze otwierającym, zawierającym czynniki indukujące 15µM ABA, 1% H₂O₂ i 1 mM CaCl₂. Po inkubacji dokumentowano otwarcie co najmniej 60 aparatów szparkowych z trzech różnych fragmentów liścia. Obliczenia długości i szerokości aparatów szparkowych wykonywano z wykorzystaniem systemu mikroskopii świetlnej Nikon Eclipse Ti z kamerą Digital Sight DS-Fi1c.

- **Bufor otwierający:** 10 mM KCl, 7,5 mM EGTA, 10 mM MES-KOH, pH 6.15

4.8.2 Analiza zagęszczenia aparatów szparkowych

Do obliczeń zagęszczenia aparatów szparkowych (SI, ang. *Stomatal Index*) zastosowano metodę opisaną przez Tanaka i wsp. (2013). W każdym powtórzeniu eksperymentu dokumentowano co najmniej 100 fragmentów epidermy, tj. co najmniej po 5 fragmentów epidermy obu liścieni, pochodzących od 10 siewek analizowanej linii *Arabidopsis*. Ilość aparatów szparkowych i pozostałych komórek epidermalnych liczono na powierzchni epidermy sześć- i dziesięciodniowych liścieni roślin WT Col-0, *mapkkk18-1*, *mapkkk18-2*, *MAPKKK18oe*, *mkk7* oraz *mkk7mapkkk18-1*. Do dokumentacji wykorzystano system mikroskopii świetlnej Nikon Eclipse Ti z kamerą Digital Sight DS-Fi1c. Wartość SI dla pojedynczego liścienia obliczano ze wzoru $SI = \frac{[\text{liczba aparatów szparkowych}]}{[\text{liczba aparatów szparkowych} + \text{liczba pozostałych komórek epidermalnych}]}$. Istotność statystyczną otrzymanych wyników obliczano testem t-Studenta.

4.9 Eksperymenty z wykorzystaniem białek

4.9.1 Izolacja białka z ekstraktów roślinnych

Materiał roślinny (1,5 g liści traktowanych zadaniem czynnikiem oraz mock według metody opisanej w rozdziale 4.2) rozcierano w ciekłym azocie w moździerz. Po starannym rozdrobnieniu materiału do moździerza dodawano bufor do izolacji białek (w objętości odpowiadającej ilości homogenizowanej tkanki tj. w stosunku 1:1 w/o) i kontynuowano homogenizację tkanek. Dalsze etapy przygotowywania ekstraktów białkowych prowadzono na lodzie (w temp. 4°C). Po 10 minutach inkubacji przygotowany materiał przeniesiono do 2 ml próbek typu Eppendorf i wirowano przez 30 minut w temp. 4°C, 12 tys. rpm. Uzyskany w wyniku wirowania supernatant przenoszono do nowych próbek i wykorzystywano do dalszych analiz. Stężenie białka w ekstrakcie mierzono metodą Bradforda. Do przygotowania krzywej wzorcowej sporządzono roztwór wzorcowy BSA o stężeniu 1 mg/ml. Próby wzorcowe przygotowano zgodnie z instrukcją zawartą poniżej:

	BSA (1 mg/ml)	Bufor do izolacji	Odczynnik Bradford	H ₂ O
1	5 µg	50 µl	200 µl	745 µl
2	10 µg	50 µl	200 µl	740 µl
3	20 µg	50 µl	200 µl	730 µl
4	30 µg	50 µl	200 µl	720 µl
5	40 µg	50 µl	200 µl	710 µl
6	50 µg	50 µl	200 µl	700 µl

Próby badane wykonano następująco: 10 µl ekstraktu roślinnego, 40 µl buforu do izolacji, 200 µl odczynnik Bradforda, 700 µl H₂O.

Po przygotowaniu próby inkubowano przez 5 minut w temp. pokojowej. Pomiarów absorbancji wykonywano przy długości fali 595 nm. Stężenie białka w ekstraktach obliczano za pomocą równania prostej.

- **Bufor do izolacji:** 20 mM HEPES pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 1 mM ditriotreitol, 1 mM fluorek fenylometylosulfonylu (PMSF), 0.1 mM NaVO₃, inhibitory proteaz (Complete Mini EDTA-free protease inhibitors, Roche)

4.9.2 Immunoprecypitacja białka

Do immunoprecypitacji białek wykorzystywano złożę Dynabeads® z białkiem A, w stężeniu końcowym 1,5 mg Dynabeads®/próbę. Przed wiązaniem przeciwciał złożę płukano dwukrotnie buforem PBST na statywie magnetycznym. Po płukaniu, do złoża dodano 5 µg przeciwciała anty-MAPKKK18 (Agrisera, AS13 2673). Mieszaninę inkubowano 1 godz. w temp. pokojowej na rotatorze poziomym. Po inkubacji, by usunąć niezwiązane przeciwciała, roztwór ze złożem umieszczono na statywie magnetycznym. Po usunięciu buforu, złożę przemyto dwukrotnie 500 µl buforu PBST. Po usunięciu buforu, do przygotowanej porcji złoża dodano 500 µg ekstraktu białka przygotowanego wg metody opisanej w rozdziale 4.9.1. Immunoprecypitację prowadzono przez noc na rotatorze, w temp. 4°C. Immunokompleksy zawierające MAPKKK18 używano do analiz aktywności kinazowej (Metody, 4.9.4).

- Bufor 1x PBST: 137 mM NaCl, 12 mM Phosphate, 2.7 mM KCl, 0,01% Tween 20, pH 7.4

4.9.3 Elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)

Elektroforezę białek w warunkach denaturujących prowadzono z użyciem systemu BioRad Mini-PROTEAN. Białka przed nałożeniem na żel denaturowano w temp. 98°C przez 10 minut w obecności buforu denaturującego z obciążaczem. Elektroforezę prowadzono w 1x stężonym buforze Laemmli przy napięciu 120 woltów. Rozdział białek prowadzono względem markera masy PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific).

Bufory do przygotowania żeli poliakrylamidowych (PA):

- Roztwór akrylamidu: 30% akrylamid i metylenobisakrylamid w stosunku 30:0,08. 10% SDS, 10% APS, TEMED, 0,5M Tris-HCl pH 6,8, 1,5M Tris-HCl pH 8,8

Żele poliakrylamidowe przygotowywano wg poniższego schematu:

- **Korek uszczelniający:** 300 µl roztwór akrylamidu, 700 µl woda, 10 µl 10% APS, 5 µl 10% TEMED.
- **Żel zagęszczający 5%:** 300 µl akrylamid, 450 µl Tris 0,5 M pH 6,8, 1020 µl woda, 18 µl 10% SDS, 12 µl APS, 5 µl 10% TEMED.

- **Żel rozdzielający 12%:** 1680 µl roztwór akrylamidu, 1050 µl bufor Tris 1,5 M pH 8,8, 1400 µl, 42 µl 10% SDS, 21 µl APS, 6,3 µl 10% TEMED.

Bufory wykorzystywane do elektroforezy:

- **Bufor 6XSB do denaturacji prób:** 50% glicerol, 250 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,05% błękit bromofenolowy; 250 mM DTT, 5% SDS
- **10x Bufor Laemmli:** (30 g Tris, 144 g glicyna, 10 g SDS)

4.9.4 Badanie aktywności kinazowej

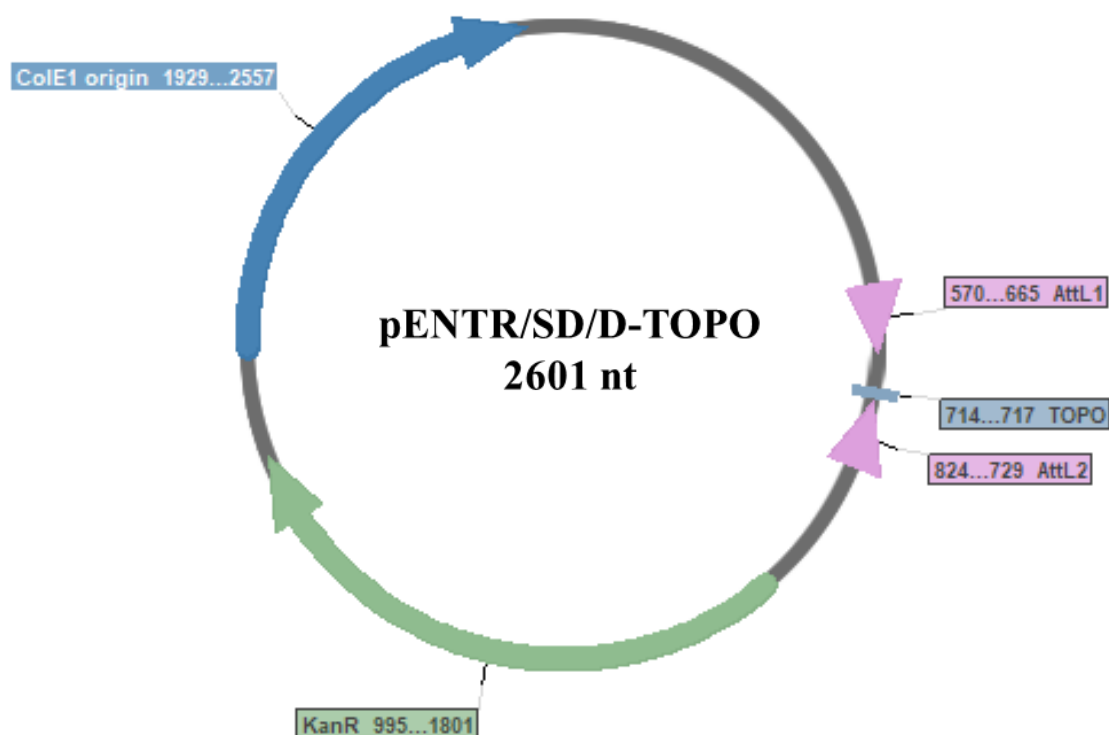
Do analiz aktywności kinazowej wykorzystywano kinazę MAP związaną uprzednio (Metody, 4.9.2) ze złożem Dynabeads® z białkiem A. Supernatant odbierano na statywie magnetycznym umieszczonym w lodzie, a złożę 3x przepłukano buforem do płukania I i 1x buforem do płukania II. Następnie próby przepłukiwano 1x buforem do kinazowania. Po odebraniu buforu złożę zawieszano w 25 µl buforu do kinazowania z dodatkiem 8 µg białka mieliny ludzkiej (MBP), 25 µM ATP i 2 µCi znakowanego radioaktywnie ATP. Reakcję kinazowania prowadzono przez 1 godzinę w temp. 30°C i zatrzymywano przez dodanie buforu denaturującego. Tak przygotowane próby denaturowano przez 10 min. w temp. 98°C i rozdzielano na żelu PA (Metody, 4.9.3). Po rozdziale żele barwiono z wykorzystaniem Coomassie Brilliant Blue i odbarwiano w buforze do odbarwiania. Odbarwione żele suszono. Ekspozycje prowadzono z wykorzystaniem systemu do audioradiografii FLA-5000 (Fuji film Medical Systems) w Wydziałowej Pracowni Izotopowej. Intensywność świecenia prążków analizowano z wykorzystaniem programu ImageJ (Schneider i wsp., 2012).

- **Bufor do płukania I:** 20 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% Triton X-100
- **Bufor do płukania II:** 20 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 1 M NaCl, 1% Triton X-100
- **Bufor do kinazowania:** 20 mM HEPES, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT
- **Bufor do bawienia:** 0.1% Coomassie Brilliant Blue R-250 (Thermo Fisher Scientific), 50% metanol, 10% kwas octowy lodowaty
- **Bufor do odbarwiania:** 40% metanol, 10% kwas octowy lodowaty

4.10 Przygotowanie konstruktów wektorowych

4.10.1 Wykorzystywane wektory

- pENTR/SD/D-TOPO - wektor wejściowy do systemu Gateway Cloning System (Invitrogen). Dołączona do zestawu topoizomeraza I pozwala na ligację produktów reakcji PCR. Wektor pENTR/SD/D-TOPO posiada sekwencje AttL1 i AttL2 umożliwiające rekombinację i przeniesienie klonowanego cDNA do końcowych wektorów systemu Gateway z wykorzystaniem klonazy RL.

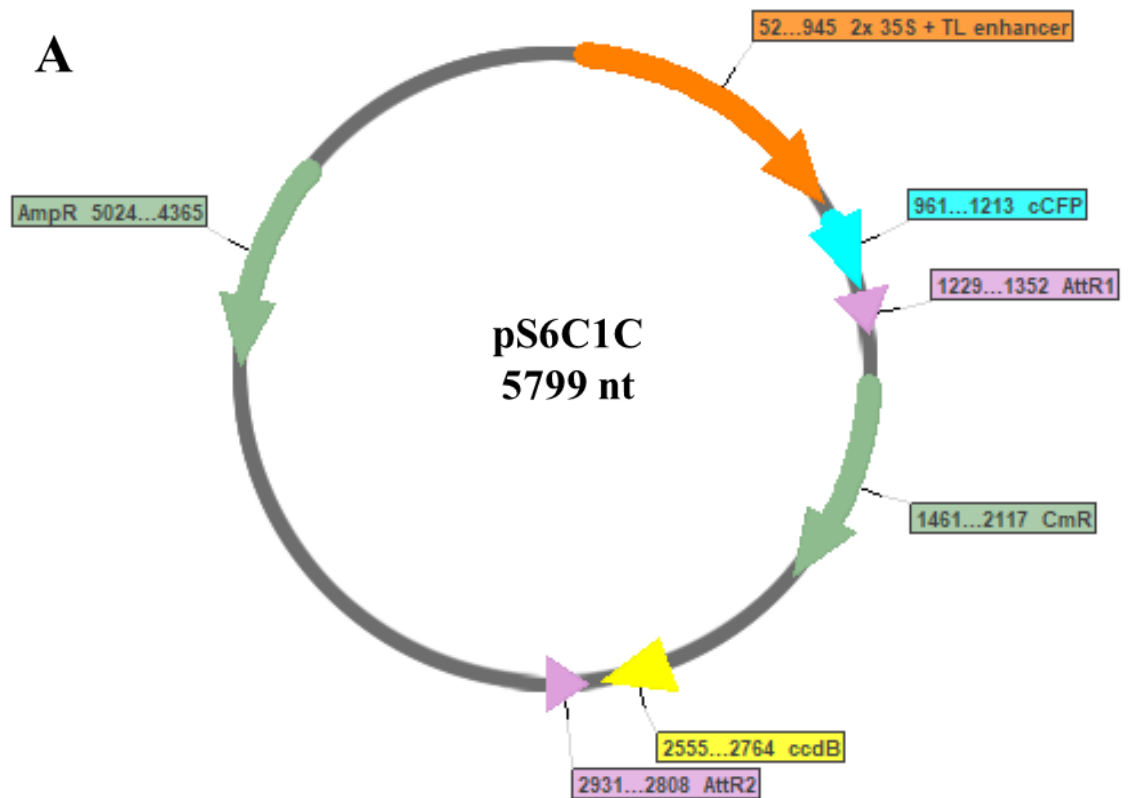


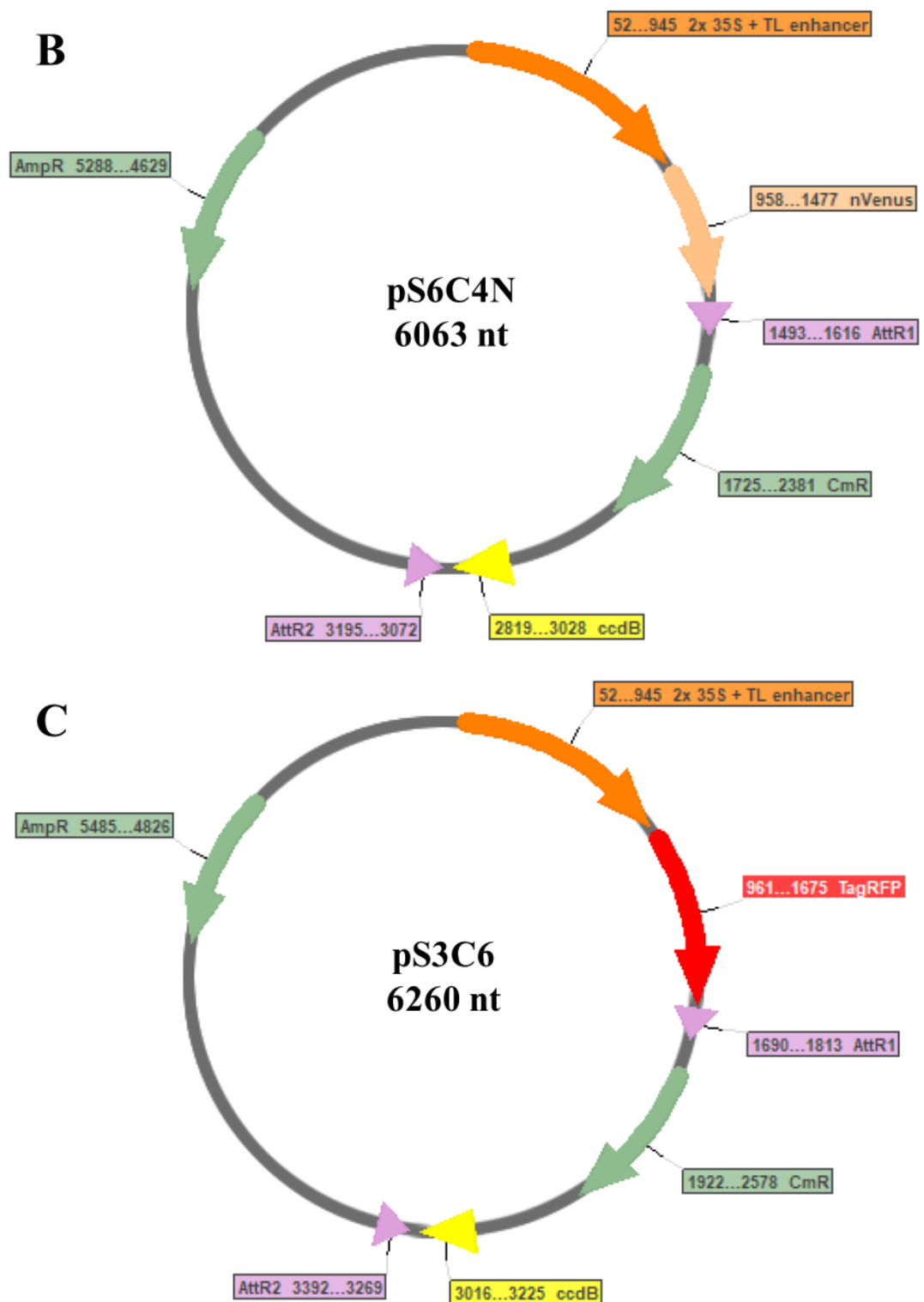
Rysunek 6. Wektor pENTR/SD/D-TOPO

Oznaczenia skrótów: AttL1, AttL2 – miejsca rekombinacji, KanR – gen odporności na kanamycynę, ColE1 origin – miejsce startu replikacji plazmidu, TOPO – miejsce przyłączenia topoizomerazy. Rysunek przygotowany z wykorzystaniem programu Serial Cloner (SerialBasics).

- Grupa wektorów pS5C1C, pS6C4N i pS3C6. Wektory kompatybilne z systemem Gateway, wykorzystywane do analiz oddziaływań metodą BiFC. Wektory zmodyfikowane przez dr Michała Michalaka z Zakładu Biologii Molekularnej i Komórkowej UAM, dla których bazę stanowiły wektory serii pSAT (Tzfira i wsp., 2005).

	pS5C1C	pS6C4N	pS3C6
Znacznik	cECFP	nVenus	TagRFP
Fuzja	N-końcowa	N-końcowa	N-końcowa

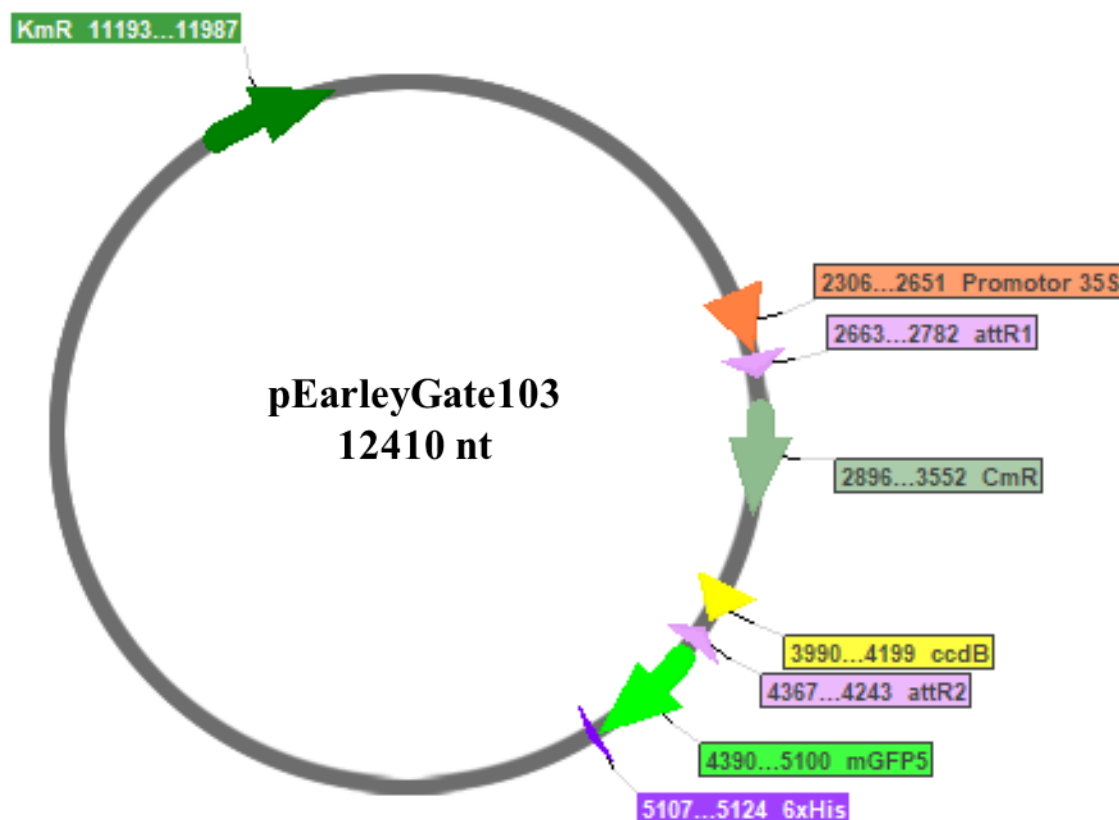




Rysunek 7. Wektory serii pSAT

(A) wektor pS6C1C, (B) wektor pS6C4N, (C) wektor pS3C6. Oznaczenia skrótów: AttR1; AttR2 – miejsca rekombinacji, AmpR – gen odporności na ampicylinę, CmR – gen odporności na chloramfenikol, ccdB – kaseta ccdB, TL enhancer – wzmacniacz translacji. Rysunek przygotowany z wykorzystaniem programu Serial Cloner (SerialBasics).

- Wektor pEarleyGate103 (pEG103) (Earley i wsp., 2006) do analiz lokalizacji komórkowej białek. Wektor kompatybilny z systemem Gateway, przyłączający w C-końcowej fuzji dwa znaczniki – histydynowy i fluorescencyjny, mGFP5 (wariant białka GFP o zwiększonej stabilności w komórkach roślinnych). Wektor może być również wykorzystywany do stabilnej transformacji *Arabidopsis* z wykorzystaniem *Agrobacterium tumefaciens*.



Rysunek 8. Wektor pEarleyGate103

Oznaczenia skrótów: AttR1, AttR2 – miejsca rekombinacji, KmR – gen odporności na kanamycynę, CmR – gen odporności na chloramfenikol, ccdB – kaseta ccdB, 6xHis – znacznik histydynowy. Rysunek przygotowany z wykorzystaniem programu Serial Cloner (SerialBasics).

4.10.2 Trawienie restrykcyjne

Trawienia wektorów do analizy restrykcyjnej dokonywano z wykorzystaniem zestawu FastDigest Value Pack (Thermo Fisher Scientific). W skład zestawu wchodzi 20 enzymów restrykcyjnych (*Bam*HI, *Bgl*II, *Eco*32I, *Eco*RI, *Hind*III, *Kpn*I, *Nde*I, *Not*I, *Pst*I, *Sal*I, *Sma*I, *Xba*I, *Xho*I), których kombinacje wykorzystywano do przeprowadzenia analizy restrykcyjnej

przygotowywanych wektorów. Reakcję prowadzono według zaleceń producenta enzymu restrykcyjnego. Do przygotowania pojedynczej reakcji wykorzystywano 2 µl 10X stężonego buforu, 500 ng plazmidowego DNA, 0,5 µl enzymu restrykcyjnego i MiliQ do objętości 20 µl. Trawienie prowadzono przez 60 minut w temperaturze 37°C, a następnie próbę rozdzielano w żelu agarozowym (Metody 4.10.4).

4.10.3 Łańcuchowa reakcja polimerazy, PCR

Pojedyncza reakcja PCR w objętości 25 µl: 0,5 µM starter forward, 0,5 µM starter reverse, 0,2 mM DNTP, 2µl 10X bufor do reakcji, 50 pg - 1 µg matryca DNA, MiliQ do objętości 25 µl. Wykorzystywane startery przedstawiono w tabeli.

Starter	Sekwencja 5'-3'
MAPKKK18 Forward	<u>CACCATGAATTGG</u> ACTAGAGGAAAAAC
MAPKKK18 Reverse	CTAATTCCGTCGAACCGTGATCC
M3K18 LP	TTACCGGGTCGGATATTTAGG
M3K18 RP	GAATGACTCATCAACATGGCC
GFP2	CGACGGGAAC TACAAGACAC
GFP3	GCTGTTACAAACTCAAGAAGG

Warunki reakcji PCR:

	Warunki	
Wstępna denaturacja	95°C, 1-3 min	
Denaturacja	95°C, 30 sekund	25-35 cykli
Annealing	(Temperatura topnienia starterów)-2°C, 30 sekund	
Wydłużanie	72°C, 1 minuta/1kb	
Końcowe wydłużanie	72°C, 5 minut	

4.10.4 Elektroforeza w żelu agarozowym

Rozdział DNA przeprowadzano w 1,1% żelu agarozowym, w buforze 1xTAE z dodatkiem bromku etydyny (5 µg/ml). Do badanych prób przed nałożeniem na żel i rozdziałem dodawano 1/6 objętości roztworu obciążającego. Rozdział DNA prowadzono przy napięciu 4V/cm wobec markera długości DNA (Thermo Fisher Scientific). Żel po rozdzielaniu obserwowano w świetle UVB i dokumentowano z pomocą systemu G-BOX (Syngene).

- **10x TAE:** 40 mM Tris, 2 mM EDTA pH 8.0
- **Roztwór obciążający 6x SB:** 0.09% bromophenol blue, 0.09% xylene cyanol FF, 60% glicerol, 60 mM EDTA

4.10.5 Przygotowanie wektorów wejściowych

Do przygotowania wektora wejściowego do systemu Gateway – wektora pENTR/SD/D-TOPO niosącego dziką i zmutowaną formę genu *MAPKKK18* wykorzystano cDNA *MAPKKK18* amplifikowane z wykorzystaniem polimerazy *Pfu* i starterów MAPKKK18 Forward i MAPKKK18 Reverse. Starter MAPKKK18 Forward zawiera w swojej sekwencji motyw CACC (tabela w rozdziale 4.10.4, fragment CACC pogrubiono) rozpoznawany przez topoisomerazę dołączoną do wektora wejściowego pENTR™/SD/D-TOPO®. Procedurę klonowania przeprowadzano według protokołu dostarczonego przez producenta zestawu. Przygotowany wektor sekwencjonowano, w celu potwierdzenia wklonowania wstawki oraz jej właściwej orientacji. Wektory pENTR niosące wstawkę z dziką i zmutowaną formą MAPKKK18 (Metody 4.10.6) namnażano w szczepie *E. coli* One Shot® TOP10.

4.10.6 Mutageneza ukierunkowana

Mutagenezę ukierunkowaną MAPKKK18 prowadzono z wykorzystaniem zestawu QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent, 200521) zgodnie z protokołem producenta. Do przygotowania pojedynczej reakcji wykorzystywano: 5 µl bufor do reakcji 10x stężony, 10 ng matrycy DNA (wektor pENTR), 125 ng startera forward, 125 ng startera reverse, 1 µl DNTP mix, 3 µl bufor QuikSolution, MiliQ do objętości 50 µl. Do przygotowanej próby dodawano 1 µl polimerazy DNA PfuUltra HF (2.5 U/µl). Reakcję PCR prowadzono według zaleceń producenta. Gotowy produkt reakcji trawiono z wykorzystaniem enzymu *DpnI*

przez 90 minut. Tak przygotowany produkt wykorzystywano do transformacji szczepu One Shot® TOP10.

Startery wykorzystywane do mutagenazy ukierunkowanej:

Starter	Sekwencja 5'-3'
T167E Forward	GAACCGGTTAGAGGAGAACCGGCGTTCATGGCTC
T167E Reverse	GAGCCATGAACGCCGGTTCTCCTCTAACCGGTTC
K32M Forward	CACTCGCCGTAATGTCCGCCGAGT
K32M Reverse	ACTCGGCGGACATTACGGCGAGTG

4.10.7 Przygotowanie wektorów końcowych w systemie Gateway

Konstrukty do lokalizacji subkomórkowej MAPKKK18 przygotowywano z wykorzystaniem zestawu Gateway™ LR Clonase™ II Enzyme mix (Thermo Fisher Scientific). Ponieważ zarówno wektor wejściowy pENTR, jak i wektor docelowy pEG103 kodują odporność na antybiotyk kanamycynę, przed przystąpieniem do rekombinacji wektory pENTR poddawano trawieniu restrykcyjnemu. Wektor *pENTR* niosący sekwencje kodującą MAPKKK18, CBP20 (marker lokalizacji jądrowej; wektor przygotowany przez dr Agatę Stępień z Zakładu Ekspresji Genów UAM) lub zmutowane wersje MAPKKK18 trawiono enzymem *MluI* (Thermo Fisher Scientific) w buforze dostarczonym przez producenta enzymu, by usunąć z wektora gen odporności na kanamycynę. Trawienie wektora prowadzono przez 1 godz. w 37°C, produkty trawienia rozdzielano na żelu agarozowym. Fragment DNA o długości ~2650 pz (~1650 pz fragment wektora plus sekwencja kodująca genu) oczyszczano z żelu metodą opisaną przez Sun i wsp., 2012. W próbówce typu Eppendorf o pojemności 0,5 ml z pomocą igły wykonywano otwór w podstawie i wewnątrz próbówki umieszczano fragment gazy. Do próbówki przenoszono wycięty prążek żelu agarozowego. Zamkniętą próbówkę Eppendorf umieszczano następnie wewnątrz próbówki typu Eppendorf o objętości 1,5 ml. Tak przygotowaną próbówkę wirowano następnie 5 minut przy 10 tys. rpm. Stężenie zebranego DNA plazmidowego w otrzymanym roztworze oznaczano z wykorzystaniem systemu NanoDrop. Oczyszczone DNA plazmidowego wykorzystywano następnie do reakcji rekombinacji.

Konstrukty do analiz oddziaływań między białkami metodą BiFC i analiz lokalizacji subkomórkowej białka przygotowywano na bazie wektorów pSAT również z wykorzystaniem

zestawu Gateway® LR Clonase II Enzyme Mix (Thermo Fisher Scientific). Ponieważ wektory z serii pSAT nie kodują odporności na antybiotyk kanamycynę, do reakcji rekombinacji wykorzystywano pełne wersje wektorów wejściowych pENTR.

Do przeprowadzenia reakcji rekombinacji stosowano następujące warunki:

- 0,5 µl enzymu klonazy
- 40 ng wektora wejściowego pENTR niosącego wstawkę z genem
- 20 ng plazmidu docelowego (wektor pEG103 do analiz lokalizacji, wektory pS5C1C, ps6C4N dla analiz BiFC, wektor pS3C6 dla kontroli lokalizacji jądrowej)
- bufor TE pH 8.0 do objętości 7 µl

Zgodnie z zaleceniami producenta zestawu, przygotowaną mieszaninę reakcyjną inkubowano przez 1 godz. w temp. 30°C. Po inkubacji mieszaninę transformowano komórki kompetentne bakterii *E. coli* - One Shot® OmniMAX™ (rekombinowane wektory pEG103) lub komórki kompetentne DH5α (wektory pS5C1C, ps6C4N i pS3C6). Puste wektory pS5C1C, ps6C4N i pS3C6, ze względu na obecność toksycznej kasety CcdB (Smith i wsp., 2012), namnażano w szczepie DB3.1, a pusty wektor pEG103 (Earley i wsp., 2006), ze względu na wielkość namnażano w szczepie One Shot® OmniMAX™.

4.11 Analizy z wykorzystaniem systemu przejściowej ekspresji w protoplastach

4.11.1 Izolacja, transfekcja i traktowanie protoplastów

Izolację i transformację protoplastów z komórek mezofilu *Arabidopsis* wykonywano według protokołu Mituła i wsp., 2015b. Po oddzieleniu epidermy, liście umieszczono na powierzchni roztworu enzymatycznego tkanką mezofilową do dołu i wytrząsano przy 55 rpm przez 1 godzinę. Lizat zawierający protoplasty z tkanki mezofilowej przenoszono do próbek 50 ml i wirowano (3 min, 150 g, 4°C). Osad protoplastów delikatnie zawieszano w 5 ml roztworu W5 i wirowano 3 minuty w 4°C, 150 g. Wirowanie powtarzano, a otrzymany osad zawieszano w buforze MMg do uzyskania stężenia 2×10^4 komórek w 100 µl roztworu. W celu transformacji protoplastów do 2 ml próbek z zaokrąglonym dnem dodawano 8 µg konstruktu wektorowego, a następnie ściętym tipsem dodano 100 µl roztworu protoplastów oraz nawarstwiono 110 µl PEG. Po delikatnym wymieszaniu, roztwór inkubowano 20 minut w temp. pokojowej. Po inkubacji do protoplastów dodawano 450 µl roztworu W5 i wirowano

300 g, 3 min. Po usunięciu supernatantu protoplasty ostatecznie zawieszono w 300 µl roztworu W1. Próby inkubowano 16 godzin w temperaturze pokojowej, w zacienionym miejscu w pozycji poziomej.

- **Roztwór enzymatyczny**, 10 ml: 1,2% celulaza R10, 0,4% macerozym R10, 0,4 M mannitol, 20 mM KCL, 20 mM MES, MiliQ do 10 ml
- **W1**, 50 ml: 0,5M mannitol, 20 mM KCL, 4 mM MES, MiliQ do 50 ml
- **W5**, 50 ml: 154 mM NaCl, 125 mM CaCl₂, 5 mM KCl, 2 mM MES, MiliQ do 50 ml
- **MMg**, 50 ml: 0,4 M mannitol, 15 mM MgCl₂, 4 mM MES, MiliQ do 50 ml
- **PEG**: 4 g PEG4000, 2,5 ml 0,8 M mannitol, 1 ml 1M CaCl₂, MiliQ do 10 ml

4.11.2 Mikroskopia konfokalna

Do dokumentacji protoplastów wykorzystywano system mikroskopii konfokalnej Nikon Eclipse Ti z obiektywem Plan Apo VC 20x/0.75 DIC N2, a obserwacje źródeł fluorescencji prowadzono przy długościach fali świetlnej (wzbudzenie/emisja) [nm]: GFP 470/510 RFPtag 561/595.

4.11.3 Analizy oddziaływań BiFC

Do analiz oddziaływań białek w systemie BiFC wykorzystywano pary zrekombinowanych wektorów pS6C4N (kodujący N-końcowy fragment białka Venus w N-końcowej fuzji z badanym białkiem) i pS6C1C (kodujący C-końcowy fragment białka CFP w N-końcowej fuzji z badanym białkiem) i wektor pS3C6-CBP20, stanowiący kontrolę transformacji i lokalizacji jądrowej. Wektory do transformacji mieszano w stosunku 1:1:1.

Oddziaływanie	Wektor 1	Wektor 2	Kontrola
MAPKKK18-SnRK2.6	pS6C1C-MAPKKK18	SnRK2.6-pS6C4N	CBP20-pS3C6
MAPKKK18-ABI1	pS6C1C-MAPKKK18	ABI1-pS6C4N	CBP20-pS3C6
MAPKKK18-ABI2	pS6C1C-MAPKKK18	ABI2-pS6C4N	CBP20-pS3C6
MAPKKK18-MKK3	pS6C1C-MAPKKK18	MKK3-pS6C4N	CBP20-pS3C6
MAPKKK18-MKK5	pS6C1C-MAPKKK18	MKK5-pS6C4N	CBP20-pS3C6
MAPKKK18-MKK7	pS6C1C-MAPKKK18	MKK7-pS6C4N	CBP20-pS3C6

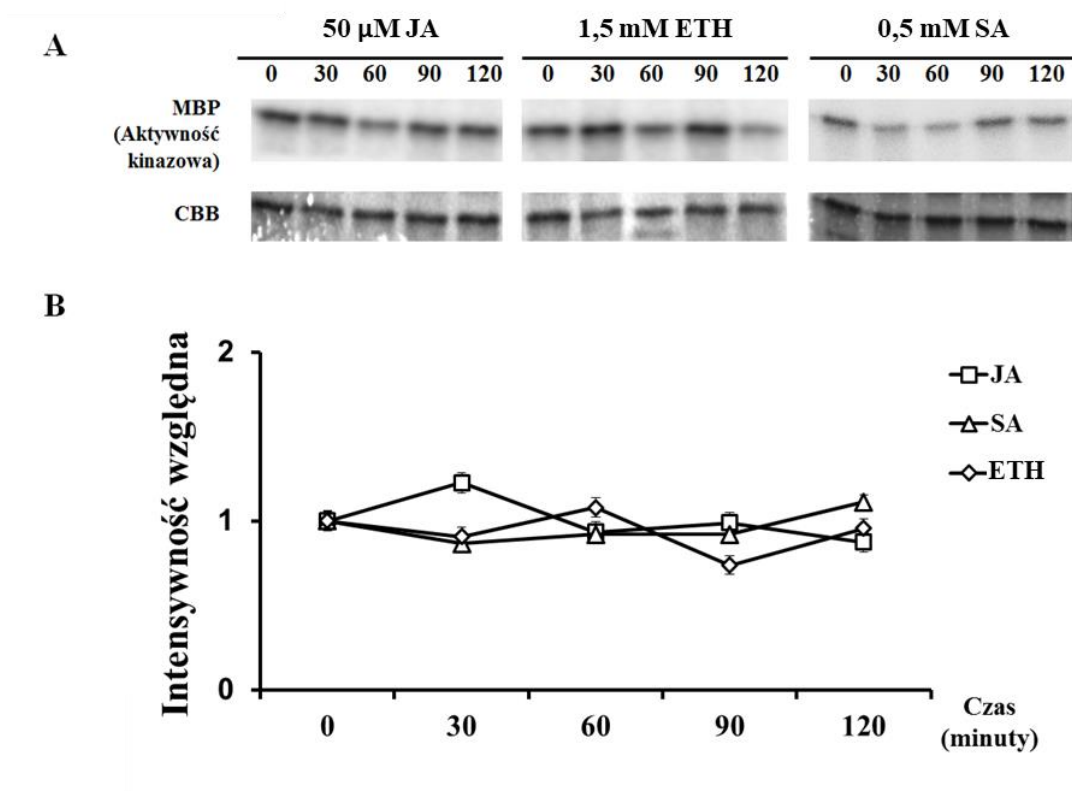
4.11.4 Analizy lokalizacji subkomórkowej

Dla eksperymentów związanych z lokalizacją MAPKKK18 wykorzystywano do transformacji protoplastów (w stosunku ilościowym 1:1) konstrukty: 35S:MAPKKK18-GFP-His w wektorze pEarlyGate103 (powstaje fuzyjne białko MAPKKK18-mGFP5), oraz 35S:RFP-CBP20 w wektorze pS3C6 (powstaje fuzyjne białko RFP-CBP20). Traktowanie protoplastów przeprowadzano poprzez wprowadzenie czynnika indukującego (50 μ M ABA, 30 nM leptomycyna B) bezpośrednio do próbówki z populacją transformowanych protoplastów.

5. Wyniki

5.1 Wpływ hormonów roślinnych na aktywność kinazową MAPKKK18

Ścieżki sygnalizacyjne hormonów roślinnych przeplatają i komunikują się ze sobą, przez co transdukcja sygnału w komórkach może przebiegać nieliniowo (Beguerisse-Diaz i wsp., 2016). Kinazy kaskad MAP są jednak w większości aktywowane przez określone sygnały. Wysoka specyficzność mechanizmu aktywacji kaskady umożliwia precyzyjną regulację procesu transdukcji sygnału. Badania przeprowadzone w Zakładzie Biotechnologii wykazały, że MAPKKK18 jest aktywowana w obecności ABA (Mituła i wsp., 2015a), a maksymalną aktywność kinazową osiąga w czasie 90 minut od indukcji. By zidentyfikować czynniki regulujące aktywność MAPKKK18 i zależnej od niej kaskady kinaz MAP sprawdzono, czy inne fitohormony aktywują aktywność kinazową MAPKKK18. W tym celu analizowano trzytygodniowe rośliny *A. thaliana* linii Col-0, które traktowano 0,5 mM kwasem salicylowym (SA), 50 μ M kwasem jasmonowym (JA) lub 1,5 mM etefonem (ETH) – regulatorem wzrostu, który jest metabolizowany w roślinach do etylenu (Villarreal i wsp., 2016). Dawki związków użytą w eksperymencie ustalono na podstawie dostępnej literatury (Van der Does i wsp., 2013; Oh i wsp., 2005; Chico i wsp., 2014). Materiał roślinny zbierano w czasie 0, 30, 60, 90 i 120 minut od indukcji wymienionymi czynnikami, a następnie przygotowano z niego ekstrakty białkowe wg procedury opisanej w rozdziale Metody 4.9.1. Z ekstraktów białkowych z użyciem przeciwciał skierowanych przeciw MAPKKK18 strącano natywną kinazę (Metody 4.9.2). Przygotowane immunokompleksy wykorzystano następnie do analiz aktywności kinazowej MAPKKK18, zgodnie z protokołem zamieszczonym w rozdziale 4.9.3 (Metody 4.9.3). Jako substrat w reakcji kinazowania wykorzystano białko mieliny ludzkiej (MBP). Eksperyment wykonano w trzech powtórzeniach biologicznych.



Rysunek 9. Aktywność kinazowa MAPKKK18 jest indukowana specyficznie przez ABA

(A) Aktywność kinazowa immunokompleksów MAPKKK18 względem białka mieliny obserwowana po indukcji JA, SA i ETH. Barwienie Commassie (CBB) umożliwia porównanie ilości białka MBP w kolejnych próbach. (B) Wykres intensywności świecenia radioaktywnego fosforu ^{32}P przeniesionego na MBP w wyniku aktywności kinazowej MAPKKK18 względem punktu 0.

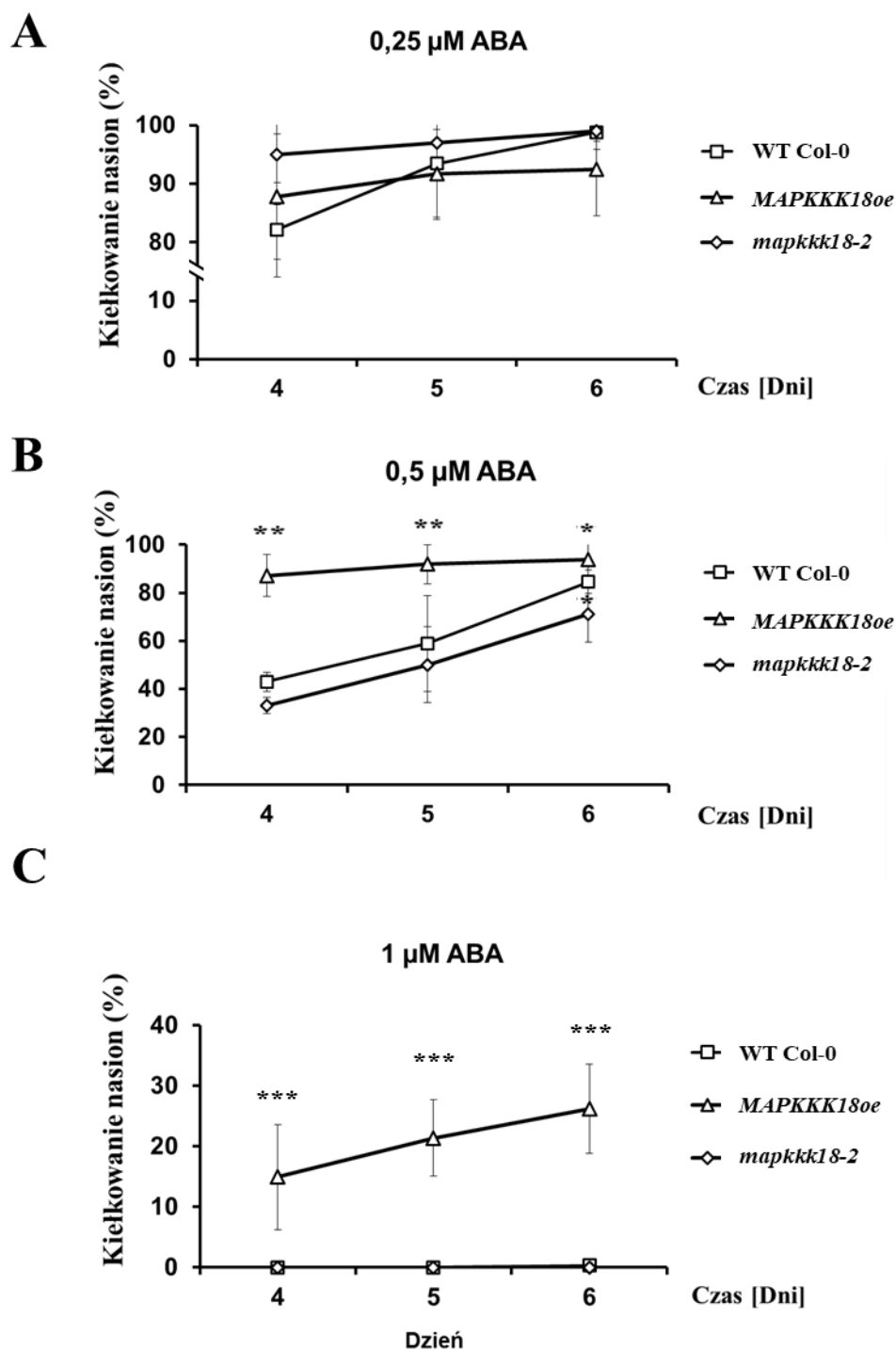
Jak udokumentowano na Rysunku 9A i 9B przeprowadzone analizy wykazały brak zmian w poziomie aktywności kinazowej białka MAPKKK18 w odpowiedzi na traktowanie SA, JA i ETH. W analizowanych punktach czasowych względna intensywność sygnału w poszczególnych punktach czasowych oscylowała wokół wartości bazowej, w porównaniu z punktem wyjściowym (Rys. 9B). Otrzymane wyniki wskazują, że aktywność kinazowa MAPKKK18 nie jest regulowana przez wskazane czynniki.

5.2 Badanie wpływu MAPKKK18 na proces kiełkowania nasion

ABA jest znanym regulatorem kiełkowania nasion (Liu i wsp., 1994; Okamoto i wsp., 2006; Liu i wsp., 2015). Spoczynek nasion jest bezpośrednio powiązany z podwyższonym poziomem ABA w endospermie, a przełamanie spoczynku i kiełkowanie nasion zachodzi

w wyniku obniżenia stężenia ABA (Nonogaki i wsp., 2014). Ocena siły kiełkowania nasion jest uznawana za jeden z podstawowych testów w badaniu ścieżek sygnalizacyjnych ABA. Mając na uwadze, że zarówno ekspresja, jak i aktywność kinazowa MAPKKK18 jest indukowana przez ABA, postanowiono sprawdzić, czy MAPKKK18 uczestniczy w regulacji procesu kiełkowania nasion. Analizie poddano rośliny z nadekspresją genu *MAPKKK18* (*MAPKKK18oe*), linię mutanta insercyjnego typu nokaut w genie *MAPKKK18* (*mapkkk18-2*) oraz rośliny typu dzikiego WT Col-0. Nasiona badanych genotypów wysiewano na pożywkę MS z dodatkiem 0,25 μ M, 0,5 μ M i 1 μ M ABA. Rośliny hodowano na szalkach z pożywką MS i obserwowano w czwartym, piątym i szóstym dniu od wyłożenia szalek na światło, a następnie zliczano ilość kiełkujących nasion, tj. z pękniętą łupiną nasienną i widocznym korzeniem zarodkowym (Metody 4.2).

Zaobserwowano, że na pożywce wzbogaconej 0,25 μ M ABA brak jest wyraźnych różnic w poziomie kiełkowania pomiędzy badanymi genotypami. Nasiona wszystkich badanych linii kiełkowały z wydajnością powyżej 90% po sześciu dniach od wyciągnięcia szalek z nasionami na światło (Rys. 10A). Z kolei ocena zdolności kiełkowania wykonana na pożywce z dodatkiem 0,5 μ M ABA wykazała większą siłę kiełkowania nasion linii *MAPKKK18oe*, w porównaniu z pozostałymi genotypami. Linia *MAPKKK18oe* kiełkowała szybciej niż linia typu dzikiego – w czwartym dniu obserwacji odnotowano kiełkowanie 87% ($p < 0,005$) nasion, w piątym 92% ($p < 0,005$) nasion, a w szóstym aż 94% ($p < 0,05$) nasion. Podczas gdy linia WT Col-0 kiełkowała z wydajnością 43% w czwartym dniu, 59% w piątym dniu i 84% w szóstym dniu. Tym samym, linia *MAPKKK18oe* w czwartym dniu obserwacji osiągnęła wyższy procent kiełkowania niż WT Col-0 w dniu szóstym. Natomiast nasiona nokauta *mapkkk18-2* kiełkowały wolniej w porównaniu z linią dziką - w czwartym dniu osiągając efektywność kiełkowania na poziomie 33%, w piątym 50%, a w szóstym dniu analizy 67% ($p < 0,05$) (Rys. 10B).



Rysunek 10. MAPKKK18 reguluje proces kiełkowania nasion

Efektywność kiełkowania wyrażona w procentach w czwartym, piątym i szóstym dniu od wyłożenia nasion na światło. Analizowano nasiona linii WT Col-0, nasiona linii z nadekspresją genu *MAPKKK18* (*MAPKKK18oe*) i nasiona linii typu nokaut w genie *MAPKKK18* (*mapkkk18-2*). Pożywkę MS suplementowano 0,25 μ M ABA (A), 0,5 μ M ABA (B) lub 1 μ M ABA (C).

Na pożywce z dodatkiem 1 μ M ABA również wykazano wyraźne statystycznie istotne różnice w efektywności kiełkowania nasion poszczególnych linii. Dla linii typu dzikiego WT Col-0 i linii *mapkkk18-2* zaobserwowano całkowite wstrzymanie procesu kiełkowania pod wpływem wysokiego stężenia ABA w analizowanych ramach czasowych. Efektywność kiełkowania nasion linii *MAPKKK18oe* wynosiła 15% ($p < 0,005$) w czwartym dniu, 21% ($p < 0,005$) w piątym i 23% ($p < 0,005$) w szóstym dniu obserwacji (Rys. 10C). Otrzymany wynik pozwala stwierdzić, że MAPKKK18 funkcjonuje jako pozytywny regulator sygnalizacji ABA podczas kiełkowania u *Arabidopsis*.

5.3 Wpływ aktywności MAPKKK18 na ruchy aparatów szparkowych

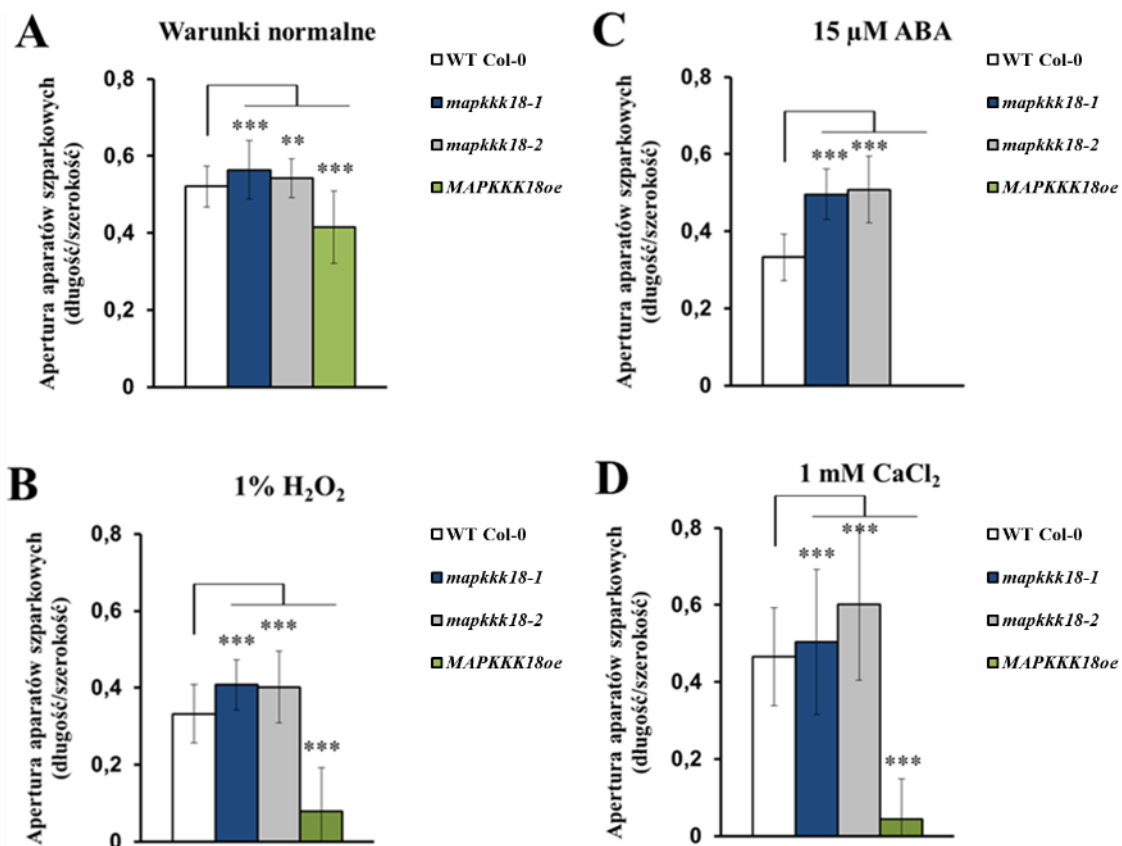
Aparaty szparkowe to wyspecjalizowane wytwory skórki służące do regulacji procesów transpiracji i wymiany gazowej (Zhang i wsp., 2015). Szparki odpowiadają na szereg czynników środowiskowych i wewnątrzkomórkowych, a regulacja procesu zamykania i otwierania aparatów szparkowych jest ściśle kontrolowana przez wiele czynników i ścieżek sygnalizacyjnych, również kaskad kinaz MAP (Jammes i wsp., 2009; Montillet i wsp., 2013; Des Marais i wsp., 2014). Dotychczas udokumentowano udział pojedynczych kinaz MAP (MPK3/6/9/12) w procesie zamykania aparatów szparkowych w odpowiedzi na stres biotyczny i ABA (Jammes i wsp., 2009; Montillet i wsp., 2013). Mechanizm zamykania aparatów szparkowych został szczegółowo opisany w rozdziale 1.3 (Wstęp 1.3). Wykrycie cząsteczek ABA przez receptory komórek szparkowych prowadzi m.in. do produkcji cząsteczek RFT w komórkach szparkowych (Zhang i wsp., 2009). Podwyższony poziom RFT prowadzi do zwiększenia stężenia jonów Ca^{2+} w cytozolu, a następnie do aktywacji kanałów jonowych, zmiany turgoru komórki i zamknięcia poru aparatów szparkowych (Lim i wsp., 2015). Gen *MAPKKK18* ulega silnej ekspresji w aparatach szparkowych i jest elementem sygnalizacji ABA (Matsuoka i wsp., 2015; Mituła i wsp., 2015). Dlatego, by zbadać, czy MAPKKK18 reguluje funkcjonowanie szparek, przeanalizowano aperturę aparatów szparkowych (Metody 4.8.1) w warunkach kontrolnych i w odpowiedzi na ABA, H_2O_2 i CaCl_2 .

W celu przeprowadzenia eksperymentu liście 3-tygodniowych roślin linii *MAPKKK18oe* oraz dwóch niezależnych linii typu nokaut w genie *MAPKKK18* (*mapkkk18-1* i *mapkkk18-2*), umieszczano w roztworze otwierającym, jak opisano w rozdziale 4.8.1 (Metody 4.8.1). Pomiar apertury (długość/szerokość otworu szparkowego) prowadzono zgodnie z metodą opisaną w rozdziale 4.8.1 (Metody 4.8.1). Zaobserwowano, że w warunkach normalnych średnia apertura szparki u roślin dzikich wynosiła 0,52. Natomiast średnia apertura

szparki u nokautów w genie *MAPKKK18* była zbliżona i wynosiła 0,56 ($p < 0,005$) u *mapkkk18-1* oraz 0,54 u mutantu *mapkkk18-2* ($p < 0,05$). Wynik ten wskazuje, że w porównaniu z linią WT Col-0 aparaty szparkowe obu linii nokautów były bardziej otwarte, a apertura aparatu szparkowego u tych linii była wyższa: o 7,7% u *mapkkk18-1* i o 3,8% dla linii *mapkkk18-2*. Natomiast, w odniesieniu do linii dzikiej, u linii *MAPKKK18oe* aparaty szparkowe były bardziej zamknięte – średnia apertura szparki wynosiła 0,42 ($p < 0,005$). Tym samym, apertura aparatu szparkowego linii z nadekspresją *MAPKKK18* była znacząco niższa - o 19,2% (Rys. 11A).

By sprawdzić rolę *MAPKKK18* w odpowiedzi aparatów szparkowych na ABA, liście badanych linii roślinnych ponownie umieszczano w buforze otwierającym z dodatkiem 15 μM ABA. Po inkubacji mierzono średnią aperturę szparki (Metody 4.8.1). W tych warunkach średnia apertura szparki roślin WT Col-0 wynosiła 0,33, a apertura u mutantów *mapkkk18-1* i *mapkkk18-2* nieznacznie spadła i wynosiła kolejno 0,5 ($p < 0,005$) i 0,51 ($p < 0,005$). Wynik ten dokumentuje, że aparaty szparkowe obu linii nokautów były o 50% bardziej otwarte, niż aparaty roślin typu dzikiego. Jednocześnie zaobserwowano bardzo silną reakcję na ABA u linii *MAPKKK18oe* w postaci całkowitego zamknięcia aparatów szparkowych (Rys. 11B). Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że *MAPKKK18* funkcjonuje jako pozytywny regulator zamykania aparatów szparkowych pod wpływem ABA.

W kolejnym etapie doświadczenia analizowano wpływ nadtlenu wodoru (H_2O_2) na regulację ruchów aparatów szparkowych u mutantów w genie *MAPKKK18* oraz u roślin typu dzikiego. Po inkubacji liści w buforze otwierającym suplementowanym 1% H_2O_2 , średnia apertura aparatów linii WT Col-0 wynosiła 0,33. Obie linie mutantów typu nokaut prezentowały podobny poziom otwarcia i średnią aperturę na poziomie: 0,41 ($p < 0,005$) dla linii *mapkkk18-1* oraz 0,4 ($p < 0,005$) dla linii *mapkkk18-2*. W porównaniu z linią WT Col-0 aparaty szparkowe obu linii mutantów *mapkkk18* były otwarte szerzej - o 24% szerzej u *mapkkk18-1* oraz o 21% szerzej u *mapkkk18-2*. Jak oczekiwano, aparaty szparkowe linii *MAPKKK18oe* były znacząco bardziej zamknięte (o 76% bardziej niż u linii kontrolnej), a średnia apertura szparek wynosiła 0,08 ($p < 0,005$) (Rys. 11C).



Rysunek 11. MAPKKK18 reguluje proces zamykania aparatów szparkowych

Apertura aparatów szparkowych (szerokość otworu szparkowego/długość otworu szparkowego) u WT Col-0, *MAPKKK18oe*, *mapkkk18-1*, *mapkkk18-2* w warunkach normalnych (A) i po indukcji 1% H₂O₂ (B), 15 μM ABA (C), 1 mM CaCl₂ (D). Słupki błędów oznaczają odchylenie standardowe. Pomiarów długości i szerokości otworu szparkowego dokonywano z wykorzystaniem oprogramowania NIS Elements (Nikon).

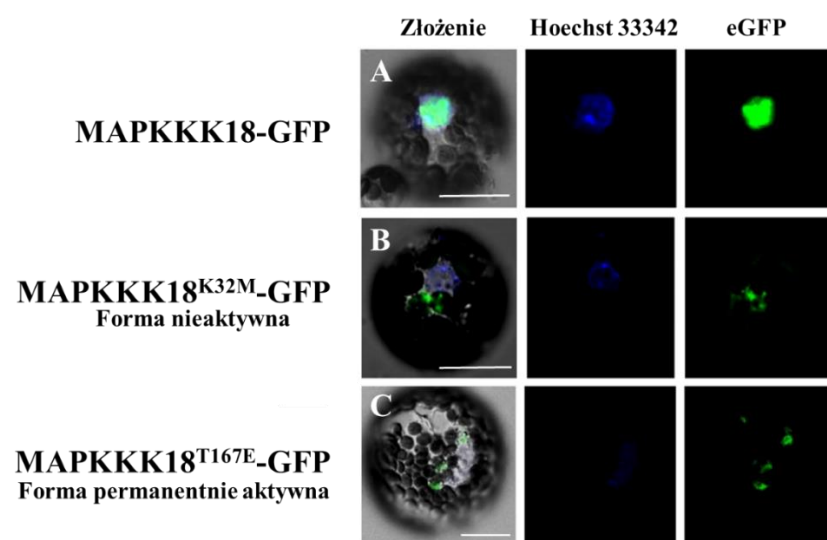
W ostatnim etapie eksperymentu liście roślin inkubowano w buforze otwierającym z 1 mM CaCl₂. Stwierdzono następujące średnie wartości apertury: 0,47 dla linii WT Col-0, 0,5 dla linii *mapkkk18-1* ($p < 0,005$), 0,6 u *mapkkk18-2* ($p < 0,005$) oraz jedyne 0,04 ($p < 0,005$) dla linii *MAPKKK18oe*. Zaobserwowano, że aparaty szparkowe obu linii mutantów pozostały otwarte szerzej, niż aparaty szparkowe roślin typu dzikiego (o 6% dla linii *mapkkk18-1* i aż o 27,5% ($p < 0,005$) dla linii *mapkkk18-2*), podczas gdy aparaty szparkowe roślin *MAPKKK18oe* były bardziej zamknięte, o ponad 90% ($p < 0,005$) (Rys. 11D).

Podsumowując, otrzymane wyniki potwierdzają udział MAPKKK18 w regulacji procesu zamykania aparatów szparkowych. MAPKKK18 działa powyżej H₂O₂ oraz Ca²⁺ w regulacji sygnalizacji w aparatach szparkowych.

5.4 Badanie lokalizacji subkomórkowej MAPKKK18

Kaskady kinaz MAP u *Arabidopsis* są elementami wielu ścieżek sygnalizacyjnych (Xu i Zhang, 2015). Kinazy MAP lokalizują się w wielu kompartmentach komórkowych, jak jądro, cytoplazma, czy mitochondria (Liang i wsp., 2013; Choi i wsp., 2017; Lampard i wsp., 2014) i zdolne są do translokacji pomiędzy nimi (Wood i wsp., 2009; Ovečka i wsp., 2014). Obecnie uważa się, że lokalizacja komórkowa kinaz MAP ma związek z ich aktywnością, a do ewentualnej translokacji kinaz MAP pomiędzy kompartmentami komórkowymi dochodzi w wyniku aktywacji białka (Adachi i wsp., 1999; Turjanski i wsp., 2007). Z tego powodu postanowiono sprawdzić, jak lokalizuje się w komórce kinaza MAPKKK18. Jednocześnie wygenerowano dwa mutanty białka MAPKKK18 o zmienionej aktywności katalitycznej (Metody 4.10.6) i zbadano ich lokalizację subkomórkową (Metody 4.11.4). W toku eksperymentu udokumentowano, że w warunkach normalnych dzika forma MAPKKK18 lokalizuje się na obszarze jądra komórkowego (Rys. 12A). Natomiast nieaktywna katalitycznie forma białka MAPKKK18^{K32M}, otrzymana w wyniku substytucji lizyny na metioninę w domenie wiążącej ATP, lokalizuje się jądrowo i cytoplazmatycznie (Rys. 12B). Nieoczekiwanie, podobną lokalizację obserwuje się również dla formy białka o stałej aktywności kinazowej (substytucja konserwatywnej treoniny 176 na kwas glutaminowy) MAPKKK18^{T167E} (Rys. 12C). Pozwala to przypuszczać, że MAPKKK18 może pełnić swoją funkcję w różnych kompartmentach komórkowych, a lokalizacja białka w danym kompartmentcie jest regulowana przez jego fosforylację i defosforylację. Postawiono więc pytanie: jakie czynniki wpływają na dystrybucję MAPKKK18 w komórce?

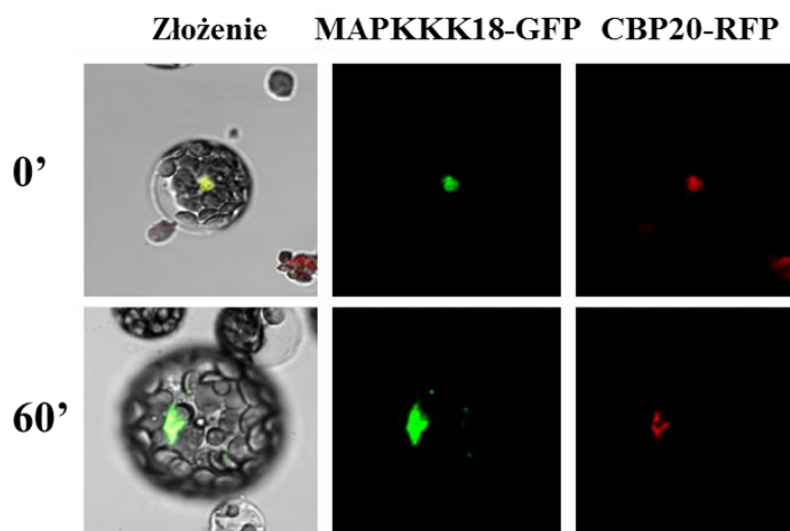
Jak opisano w rozdziale 5.1 (Wyniki 5.1) MAPKKK18 ulega aktywacji specyficznie pod wpływem ABA. Na tej podstawie postanowiono sprawdzić, czy egzogennie podany ABA wpłynie na lokalizację subkomórkową MAPKKK18. W tym celu protoplasty wyizolowane z mezofilu *Arabidopsis* transformowano wektorem niosącym białko fuzyjne MAPKKK18-GFP oraz wektorem z białkiem CBP20-RFP (Metody 4.11.1), stanowiącym marker lokalizacji jądrowej. Gen *CBP20* koduje jądrowe białko wchodzące w skład kompleksu CBC wiążącego czapeczkę (7-metyloguanozyną) obecną na końcu 5' transkryptów syntetyzowanych przez polimerazę RNA II (Izaurralde i wsp., 1995).



Rysunek 12. Lokalizacja subkomórkowa MAPKKK18

(A) Dziką formę MAPKKK18 lokalizuje się jądrowo w protoplastach *Arabidopsis*. (B) i (C). Mutacje punktowe zmieniające aktywność kinazową MAPKKK18 prowadzą do zmiany lokalizacji subkomórkowej MAPKKK18 i pojawienia się białka w cytoplazmie. Jako wyznacznik lokalizacji jądrowej wykorzystano barwienie Hoechst 33342. Pasek skali: 100 μ m. Opracowanie na podstawie Mituła i in. (2015).

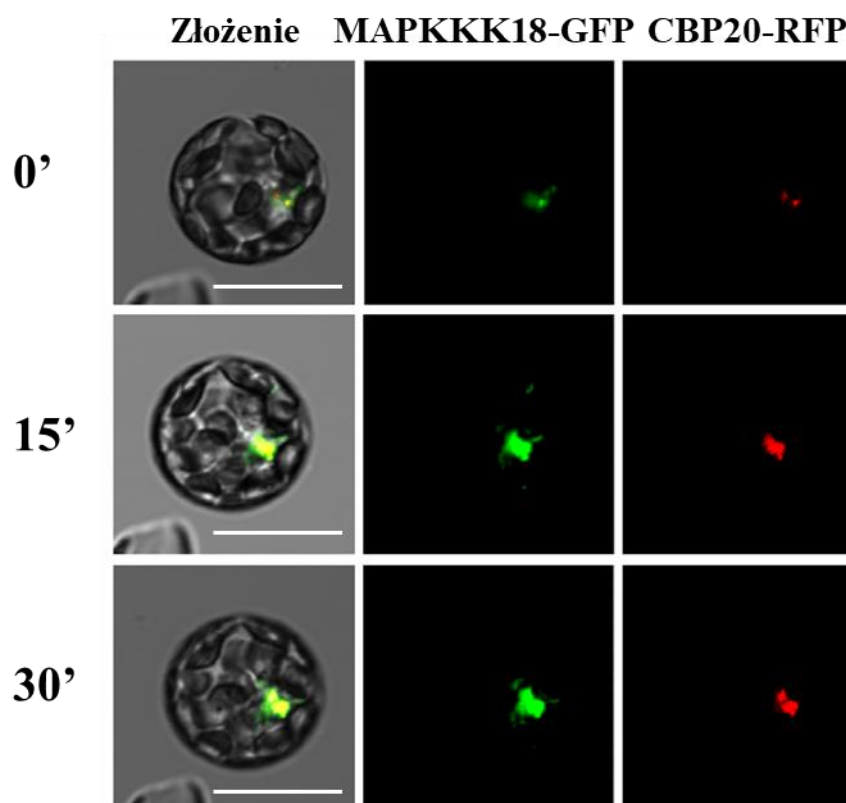
Następnego dnia, po uzyskaniu przynajmniej 60% wydajności transformacji w populacji protoplastów obserwowano lokalizację białka MAPKKK18 (Metody 4.11.4). Po potwierdzeniu lokalizacji jądrowej MAPKKK18, protoplasty traktowano 50 μ M ABA i obserwowano zmiany lokalizacji kinazy w czasie 60 minut od rozpoczęcia traktowania. Jednocześnie, jako kontrolę negatywną protoplasty traktowano 0.01% roztworem metanolu (substancją używaną do przygotowania 1M roztworu wyjściowego ABA). Jak pokazano na rysunku 13, sygnał zielonej fluorescencji pochodzący od białka fuzyjnego MAPKKK18-GFP zarejestrowano na obszarze jądra komórkowego, a także poza jego obszarem, w otaczającej jądro cytoplazmie. Nie udokumentowano zmiany lokalizacji MAPKKK18-GFP w próbach traktowanych metanolem.



Rysunek 13. MAPKKK18 zmienia lokalizację subkomórkową w wyniku traktowania egzogennym ABA

MAPKKK18 lokalizuje się jądrowo w warunkach kontrolnych (górny rząd, 0'). Po 60 minutach od traktowania protoplastów egzogennym 50 μ M ABA, sygnał zielonej fluorescencji obserwowano w jądrze komórkowym i cytoplazmie (dolny rząd, 60'). Czerwona fluorescencja obserwowana na terenie jądra komórkowego pochodzi od białka fuzyjnego CBP20-RFP będącego markerem lokalizacji jądrowej. W jednym powtórzeniu eksperymentu dokumentowano lokalizację dla przynajmniej 60 protoplastów. Eksperyment wykonano w trzech powtórzeniach biologicznych. Pasek skali: 100 μ m.

Ponieważ MAPKKK18-GFP zmieniło lokalizację subkomórkową pod wpływem egzogenego ABA, postanowiono zbadać, jak dynamicznie przebiega proces pojawiania się MAPKKK18 poza obszarem jądra komórkowego. W tym celu, protoplasty ponownie transformowano wektorami niosącymi sekwencje kodujące białko fuzyjne MAPKKK18-GFP i CBP20-RFP (Metody 4.11.1), sprawdzano lokalizację MAPKKK18 (Metody 4.11.4), a następnie próby traktowano 50 μ M ABA (Metody 4.11.1) bezpośrednio na szkiełku mikroskopowym. Lokalizację MAPKKK18 w komórce pojedynczego protoplastu dokumentowano w jednym preparacie w czasie 0, 15 i 30 minut od indukcji ABA, jak opisano powyżej.



Rysunek 14. Lokalizacja MAPKKK18 po traktowaniu protoplastów egzogennym ABA

Obserwacja pojedynczego protoplastu w czasie 35 minut od indukcji ABA. Protoplasty transformowano konstruktem 35S:MAPKKK18:GFP. (A) Zielony sygnał fluorescencyjny na obszarze jądra komórkowego 0 minut od indukcji ABA. (B) Zielony sygnał fluorescencyjny poza obszarem jądra komórkowego 15 minut od indukcji ABA. (C) Zielony sygnał fluorescencyjny na obszarze jądra i cytoplazmy 30 minut od indukcji ABA. Kontrolę lokalizacji jądrowej białka stanowi CBP20-RFP. Pasek skali: 100 μ m.

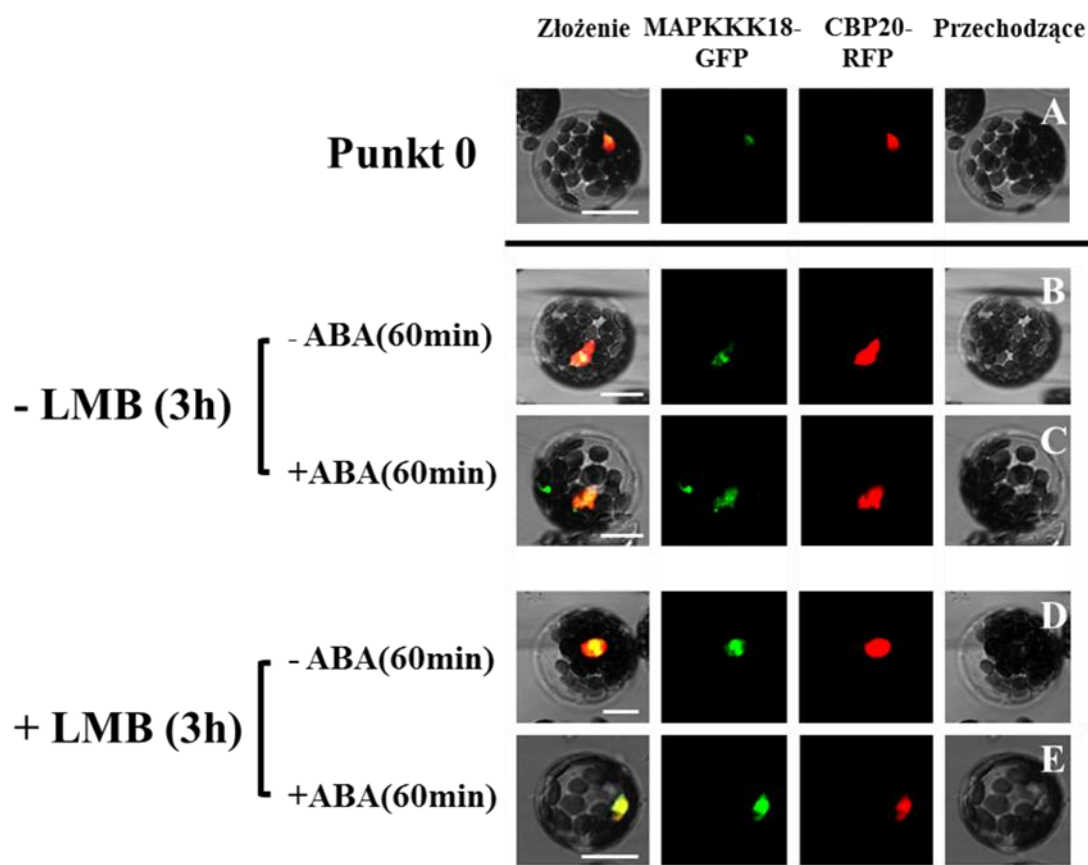
Zaobserwowano obecność MAPKKK18-GFP poza jądrem komórkowym już po 15 minutach od rozpoczęcia traktowania ABA (Rys. 14). Wynik ten pozwala wysnuć wniosek, że MAPKKK18 jest usuwana z jądra komórkowego pod wpływem ABA, a obserwowane obrazy nie są efektem syntezy *de novo* białka w cytoplazmie.

W oparciu o uzyskane wyniki, postanowiono sprawdzić, czy za transport MAPKKK18 z jądra komórkowego do cytoplazmy pod wpływem działania ABA odpowiada mechanizm związany z aktywnością poru jądrowego. Za eksport białek z jądra u *Arabidopsis* odpowiada białka homologiczne XPO1a i XPO1b, które rozpoznaje motyw eksportu z jądra komórkowego - NES (ang. *Nuclear Export Signal*) (Meier i Brkljadic, 2010). Do kompleksu białko-XPO1a/b dołączona zostaje GTPaza Ran i kompleks jest w takiej formie eksportowany z jądra do cytoplazmy. W cytoplazmie dochodzi do dysocjacji kompleksu w wyniku hydrolizy

cząsteczki Ran-GTP do Ran-GDP, co prowadzi do uwolnienia białka wewnątrz jądra (Krichevsky i wsp., 2006). Mając na uwadze, że translokacja MAPK pomiędzy kompartmentami komórkowymi odbywa się przez kompleks poru jądrowego (Adachi i wsp., 2000), postanowiono zbadać, czy również MAPKKK18 jest aktywnie eksportowana z jądra komórkowego. W tym celu w eksperymencie wykorzystano leptomycynę B (LMB), inhibitor eksportyn jądrowych (Kudo i wsp., 1998). Leptomycyna B przyłącza się kowalencyjnie do konserwatywnej cysteiny w sekwencji eksportyn jądrowych u *Arabidopsis*, uniemożliwiając im interakcję z sekwencjami NES białek i w efekcie blokuje ich eksport z jądra komórkowego (Meier i Brkljacic, 2010).

Analizy z użyciem LMB wykonano w systemie przejściowej ekspresji w protoplastach wyizolowanych z mezofilu *Arabidopsis* (Metody 4.11.1). Po transformacji protoplastów konstruktem MAPKKK18-GFP i potwierdzeniu lokalizacji jądrowej MAPKKK18-GFP metodą mikroskopową (Metody 4.11.4) (Rys. 15, rząd A) próbę podzielono na dwie równe części (ok. 4×10^4 protoplastów w próbie). Następnie jedną populację protoplastów traktowano LMB przez trzy godziny. Drugą populację protoplastów (stanowiącą kontrolę traktowania) poddano działaniu metanolu przez trzy godziny. Po inkubacji i potwierdzeniu lokalizacji jądrowej białka MAPKKK18-GFP próby traktowano 50 μ M ABA (rząd C, E) lub tą samą objętością metanolu przez jedną godzinę (Rys. 15, rząd B, D).

W wyniku przeprowadzonego eksperymentu w populacji protoplastów nietraktowanych LMB i traktowanych ABA (-LMB +ABA) sygnał zielonej fluorescencji obserwowano poza obszarem jądra komórkowego (Rys. 15, rząd C). Jednocześnie w populacji protoplastów traktowanych zarówno LMB, jak i ABA (+LMB +ABA) obserwowano sygnał zielonej fluorescencji jedynie na obszarze jądra komórkowego (Rys. 15, rząd E). Lokalizację jądrową obserwowano także dla pozostałych populacji kontrolnych, tj. nietraktowanych LMB i ABA (-LMB -ABA) (Rys.15, rząd B) oraz traktowanych LMB i nietraktowanych ABA (+LMB -ABA) (Rys. 15, rząd D).



Rysunek 15. Leptomycyna B hamuje eksport MAPKKK18 z jądra komórkowego do cytoplazmy

Protoplasty transformowano konstruktem MAPKKK18-GFP a następnie traktowano leptomycyną B o stężeniu 30 nM i 50 μ M ABA. (A) Przed traktowaniem obserwowano zieloną fluorescencję na obszarze jądra komórkowego. (B) Transformowane protoplasty traktowane kontrolnie metanolem. (C) Transformowane protoplasty traktowane egzogennym 50 μ M ABA. (D) Transformowane protoplasty traktowane 30 nM leptomycyną. (E) Transformowane protoplasty traktowane jednocześnie 30 nM leptomycyną i 50 μ M ABA. Marker lokalizacji jądrowej stanowi CBP20-RFP. Pasek skali: 100 μ m.

Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że ABA reguluje lokalizację komórkową MAPKKK18. Pod wpływem ABA MAPKKK18 jest aktywnie eksportowana z jądra komórkowego przez por jądrowy.

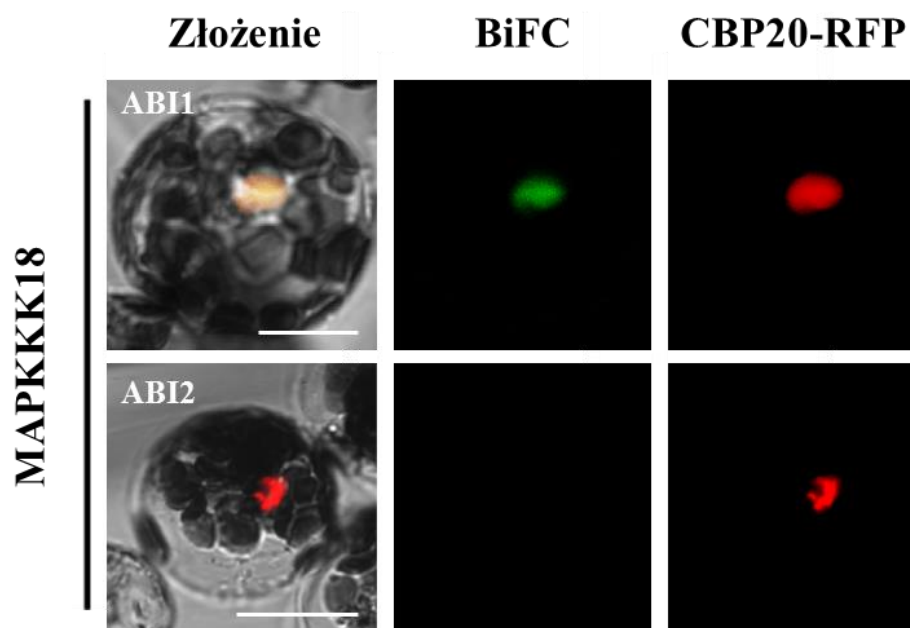
5.5 Analiza oddziaływań MAPKKK18 z białkami rdzeniowej sygnalizacji ABA

Wyniki badań prowadzonych w Zakładzie Biotechnologii wskazywały, że ekspresja MAPKKK18 jest regulowana przez fosfatyzację białkową ABI1 (Ludwików i wsp., 2009). ABI1 należy do grupy A fosfataz białkowych 2C i jest elementem kompleksu rdzeniowego

sygnalizacji ABA (Gosti i wsp., 1999; Weiner i wsp., 2010; Zhao i wsp., 2014; Kong i wsp., 2015; Tajdel i wsp., 2016). Fosfataza białkowa ABI1 jest uznawana za kluczowy negatywny regulator sygnalizacji ABA i uczestniczy w regulacji procesów rozwojowych i odpowiedzi na stresy środowiskowe (Arend i wsp., 2009; Lu i wsp., 2015). W komórce ABA wiąże się z receptorami ABA – białkami PYR/PYL/RCAR (Nishimura i wsp., 2009; Zhao i wsp., 2014). Dopiero w obecności podwyższonego poziomu ABA w komórce, receptory ABA w wyniku zmian konformacyjnych wiążą ABI1, co umożliwia autoaktywację ABA-zależnych kinaz SnRK2 (Cutler i wsp., 2010).

Ponieważ MAPKKK18 jest kinazą aktywowaną przez ABA postanowiono sprawdzić czy kaskada kinaz MAP, rozpoczynająca się od MAPKKK18, komunikuje się z kompleksem rdzeniowym sygnalizacji ABA. W pierwszym etapie eksperymentu analizowano, czy MAPKKK18 oddziałuje z fosfatazą białkową ABI1. Wcześniejsze badania wykazały, że ABI1 może regulować aktywność kinaz MAP (Leung i wsp. 2006). Analizowano także oddziaływanie pomiędzy MAPKKK18 a fosfatazą białkową ABI2, której podobieństwo sekwencji aminokwasowej do białka ABI1 wynosi 80%. Analizy prowadzono z użyciem techniki BiFC (Metody 4.11.3). W protoplastach wyizolowanych z mezofilu *Arabidopsis* (Metody 4.11.3) przeprowadzono koekspresję białka fuzyjnego MAPKKK18 z przyłączonym C-końcowym fragmentem białka fluorescencyjnego CFP (MAPKKK18-cCFP) oraz białek ABI1 lub ABI2 w fuzji z N-końcowym fragmentem białka fluorescencyjnego Venus (ABI1/ABI2-nVenus). Wszystkie analizy prowadzono w kolokalizacji z białkiem CBP20 (mniejsza podjednostka kompleksu jądrowego wiążącego kap) w N-końcowej fuzji z RFP, stanowiącym jednocześnie kontrolę transformacji i marker lokalizacji jądrowej.

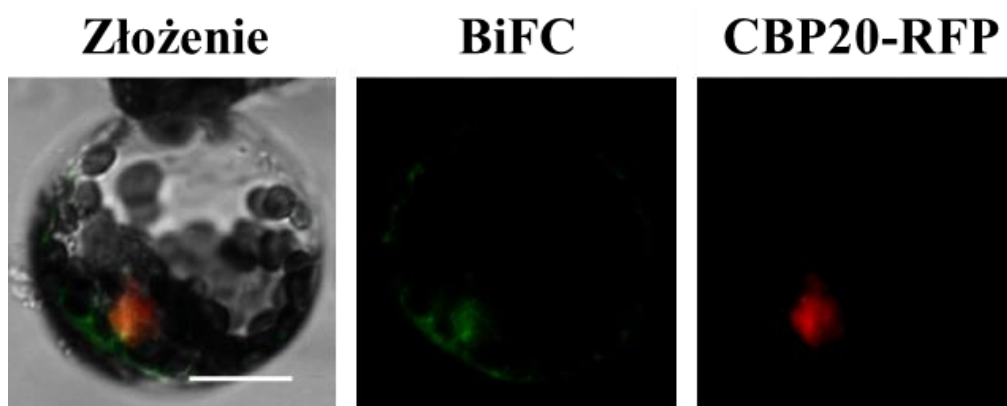
W protoplastach transformowanych parą wektorów kodujących MAPKKK18 i ABI1 (Metody 4.11.3) zarejestrowano odtworzenie struktury białka fluorescencyjnego w postaci sygnału o zielonej fluorescencji (Rys. 16, górny rząd). Sygnał obserwowano na terenie jądra komórkowego, co potwierdza kolokalizacja sygnału z czerwoną fluorescencją markera jądrowego, białka CBP20-RFP. Natomiast nie obserwowano zielonej fluorescencji dla pary MAPKKK18 i ABI2 (Rys. 16, dolny rząd). Otrzymane wyniki wskazują, że MAPKKK18 specyficznie oddziałuje z fosfatazą białkową ABI1.



Rysunek 16. MAPKKK18 oddziałuje specyficznie z fosfatazą białkową ABI1

Koekspresja białka MAPKKK18-cCFP z ABI1-nVenus (pierwszy rząd) i ABI2-nVenus (drugi rząd). W przypadku odtworzenia białka fluorescencyjnego obserwuje się fluorescencję koloru zielonego. Koekspresja pary białek fuzyjnych MAPKKK18-cCFP i ABI1-nVenus w systemie ekspresji przejściowej pozwoliła zaobserwować fluorescencję zlokalizowaną na obszarze jądra komórkowego. Kontrolę transformacji i lokalizacji jądrowej stanowiło CBP20-RFP (czerwona fluorescencja). W jednym powtórzeniu eksperymentu udokumentowano co najmniej 60 protoplastów. Eksperyment wykonano w 3 powtórzeniach biologicznych. Pasek skali: 100 μm .

W kolejnej części eksperymentu analizowano, czy MAPKKK18 oddziałuje z kinazą SnRK2 z podgrupy 3 regulowaną przez ABA, stanowiącą istotny element kompleksu rdzeniowej sygnalizacji ABA (Weiner i wsp., 2010; Gonzalez-Guzman i wsp., 2012; Kulik i wsp., 2012;). Jako potencjalnego partnera do oddziaływania z MAPKKK18 wytypowano kinazę SnRK2.6/OST1. Kinaza SnRK2.6/OST1 jest białkiem silnie zaangażowanym w proces zamykania aparatów szparkowych regulowany przez ABA. Wcześniejsze wyniki dokumentują wpływ SnRK2.6/OST1 na aktywność kinazy MAPKKK18 – u nokauta *snrk2.6* obserwuje się zniesienie aktywności kinazowej MAPKKK18 (Mitula i wsp., 2015). Badanie oddziaływań pomiędzy MAPKKK18 i SnRK2.6/OST1 przeprowadzono z wykorzystaniem techniki BiFC (Metody 4.11.3). Protoplasty przygotowane metodą opisaną w rozdziale 4.11.1 (Metody, 4.11.1) transformowano konstrukcjami zawierającymi sekwencję białek fuzyjnych MAPKKK18-cCFP i SnRK2.6-nVenus. Białko CBP20-RFP użyto jako kontrolę transformacji i lokalizacji jądrowej.



Rysunek 17. Analiza oddziaływań pomiędzy MAPKKK18 i SnRK2.6/OST1 z wykorzystaniem techniki BiFC

Koekspresja białka MAPKKK18-cCFP z SnRK2.6-nVenus. Zieloną fluorescencję obserwowano na obszarze jądra komórkowego, a także cytoplazmy w przypadku 10% transformowanych protoplastów. Kontrolę transformacji i lokalizacji jądrowej stanowiło CBP20-RFP (czerwona fluorescencja). W jednym powtórzeniu eksperymentu dokumentowano lokalizację dla przynajmniej 60 protoplastów. Eksperyment wykonano w trzech powtórzeniach biologicznych. Pasek skali: 100 μm .

W protoplastach koeksprymujących parę MAPKKK18 i SnRK2.6/OST1 udokumentowano zieloną fluorescencję na terenie jądra komórkowego. Sygnał oddziaływania MAPKKK18-SnRK2.6/OST1 pokrywał się z lokalizacją czerwonej fluorescencji białka CBP20-RFP. W przypadku 10% protoplastów obserwowano także sygnał zielonej fluorescencji poza obszarem jądra komórkowego (Rys. 17). Wyniki analizy potwierdzają, że MAPKKK18 oddziałuje bezpośrednio z przedstawicielem kinaz SnRK2 podgrupy 3 - SnRK2.6/OST. Tym samym, otrzymane w tej części pracy wyniki dowodzą, że MAPKKK18 oddziałuje bezpośrednio z ważnymi elementami rdzeniowej sygnalizacji ABA – fosfatazą białkową ABI1 i kinazą SnRK2.6/OST1.

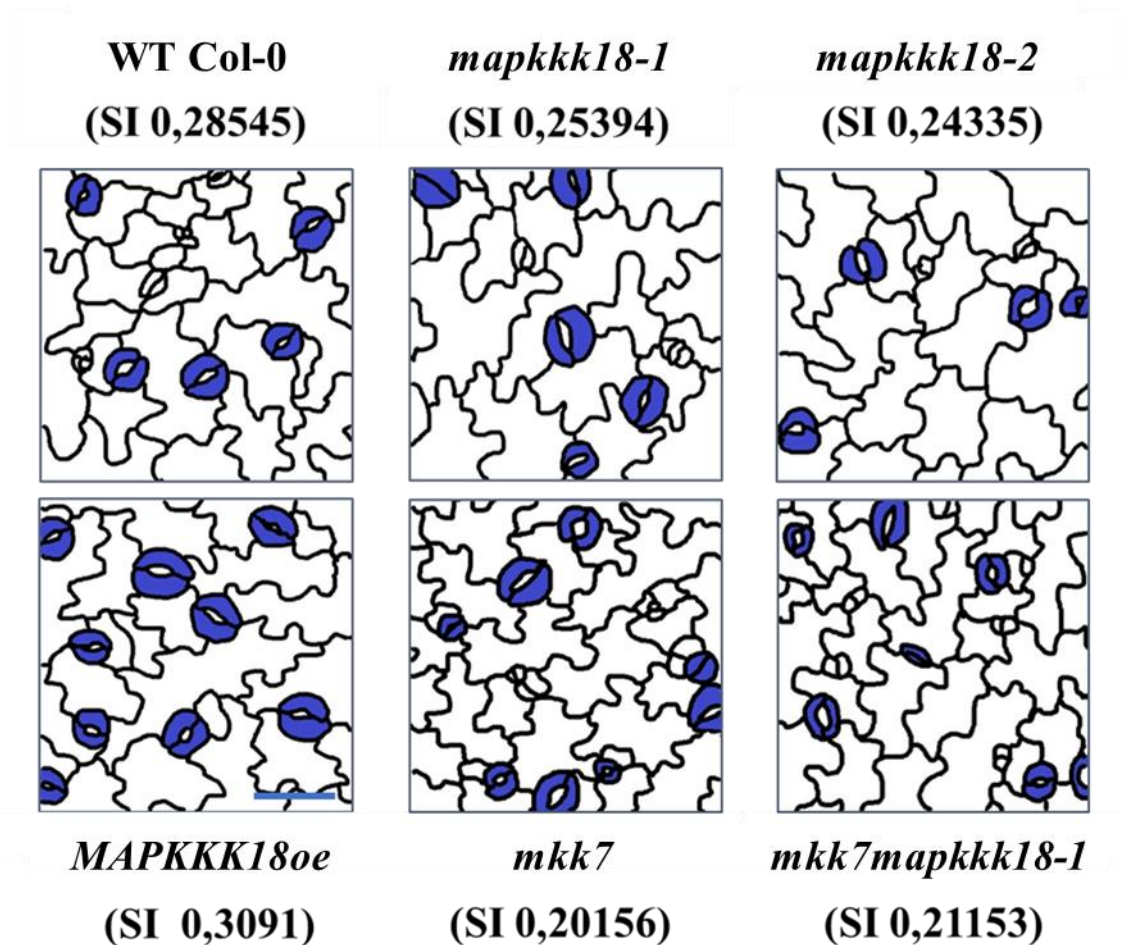
5.6 Rola MAPKKK18 w regulacji rozwoju aparatów szparkowych

Rozwój aparatów szparkowych jest bardzo złożonym procesem regulowanym przez czynniki genetyczne i środowiskowe, jak na przykład światło i stężenie CO_2 (Dow i wsp., 2014; Zhang i wsp., 2015). Spośród roślinnych hormonów niezwykle istotną rolę w rozwoju szparek odgrywa ABA. Wiadomo, że ABA funkcjonuje jako regulator rozwoju aparatów szparkowych i hamuje inicjację procesu różnicowania szparek (Lake i Woodward, 2008; Tanaka i wsp., 2013; Iida i wsp., 2016). W ostatniej dekadzie opisano udział kaskad kinaz MAP w regulacji

aktywności czynnika transkrypcyjnego SPCH (ang. *Speechless*) oraz w późniejszych etapach rozwoju aparatów szparkowych. Kluczową rolę w tym procesie odgrywa kaskada YODA-MKK4/MKK5-MPK4/MPK6 oraz MKK7 i MKK9 (Bergmann i wsp., 2004; Wstęp 1.2). Mając na uwadze wyniki dotychczasowych badań oraz fakt, iż *MAPKKK18* ulega silnej ekspresji w aparatach szparkowych (Matsuoka i wsp., 2015), w niniejszej pracy postanowiono zbadać, czy *MAPKKK18* jest istotnym czynnikiem wpływającym na rozwój aparatów szparkowych. W tym celu analizowano tzw. gęstość występowania szparek (ang. *Stomatal Index*, SI) (Haworth i wsp., 2010), wyrażoną poprzez stosunek liczby aparatów szparkowych do liczby wszystkich komórek epidermy badanego obszaru skórki. Parametr SI został wprowadzony w 1928 roku przez Salisburego (Salisbury, 1928), jako alternatywa dla parametru SD (ang. *Stomatal Density*), który również opisuje zagęszczenie aparatów szparkowych, ale wyrażone poprzez ilość aparatów szparkowych na mm² epidermy. Tym samym, na wartość SD ma wpływ zarówno ilość aparatów szparkowych, jak i wielkość komórek, która to jest zależna od wielu parametrów, takich jak stężenie CO₂, ilość światła, czy wilgotność (Royer, 2000; Haworth i wsp., 2010). Parametr SI opisuje natomiast stosunek ilościowy pomiędzy aparatami szparkowymi, a pozostałymi komórkami epidermalnymi. Z tego powodu wykorzystanie parametru SI do analizy dostarcza więcej informacji na temat podziałów komórek linii różnicowania szparek w rozwijającej się epidermie.

W celu uchwycenia zmian struktury epidermy na etapach zależnych od aktywności czynników SPCH/MUTE/FAMA (Wstęp 1.2) obserwowano i dokumentowano powierzchnię skórki na spodniej stronie liścieni *Arabidopsis* w szóstym i dziesiątym dniu od wyłożenia na światło. Obserwację prowadzono w pojedynczej ramce o wymiarach 450x330 µm, a następnie zliczano ilość aparatów szparkowych oraz pozostałych komórek epidermalnych. Za dojrzały aparat szparkowy uznawano twór epidermy składający się z dwóch komórek przyszparkowych otaczających por szparki. Wszystkie inne komórki, w tym niedojrzałe aparaty szparkowe (przed podziałem związanym z czynnikiem FAMA), uznawano za inne komórki epidermalne (Tanaka i wsp., 2013).

Mając na uwadze powyższe, w niniejszej pracy analizy SI przeprowadzono na liścieniach sześć- i dziesięciodniowych siewek *A. thaliana* linii typu dzikiego WT Col-0, linii roślinnej z nadekspresją białka *MAPKKK18* (*MAPKKK18oe*) oraz dwóch niezależnych linii typu nokaut w genie *MAPKKK18* (*mapkkk18-1*, *mapkkk18-2*), zgodnie z protokołem opisanym w rozdziale 4.8.2 (Metody 4.8.2).

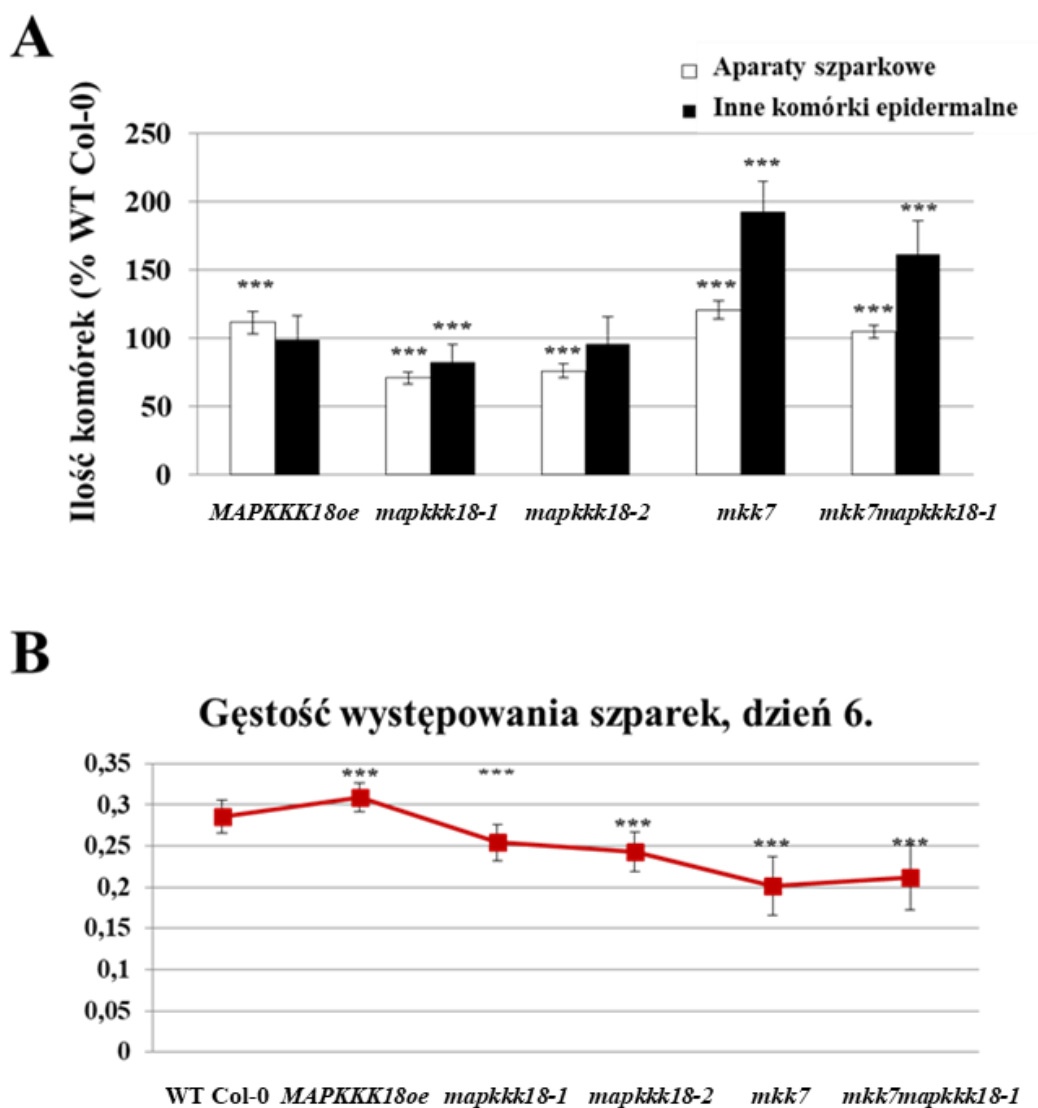


Rysunek 18. Aktywność genu MAPKKK18 wpływa na zagęszczenie aparatów szparkowych w epidermie 6-dniowych liści Arabidopsis

Poglądowe ryciny fragmentów epidermy 6-dniowych liści Arabidopsis linii typu dzikiego WT Col-0, linii z nadekspresją białka MAPKKK18 (*MAPKKK18oe*), dwóch niezależnych linii typu nokaut genu *MAPKKK18* (*mapkkk18-1*, *mapkkk18-2*) i mutantów *mkk7* oraz u mutantu podwójnego *mkk7mapkkk18-1*. Aparaty szparkowe oznaczono na niebiesko. Pasek skali: 50 μ m.

W szóstym dniu rozwoju liści Arabidopsis wartości parametru SI dla analizowanych linii przedstawiały się następująco: WT Col-0 0,2855, *MAPKKK18oe* 0,3091, *mapkkk18-1* 0,2543 i *mapkkk18-2* 0,2434 (Rys. 18). U linii *MAPKKK18oe* obserwowano podwyższenie liczby aparatów szparkowych o 8% ($p < 0,005$), przy podobnej liczbie pozostałych komórek epidermy (Rys. 19A), co przełożyło się na wartość SI wyższą o 8% ($p < 0,005$) (Rys. 19B). Zarówno u linii *mapkkk18-1*, jak i *mapkkk18-2* wykryto zmniejszenie zagęszczenia aparatów szparkowych i w obu przypadkach było ono spowodowane zmniejszoną częstością występowania szparek, a także obniżeniem ogólnej liczby pozostałych komórek epidermy. U linii *mapkkk18-1* obserwowano obniżenie wartości SI o 11% ($p < 0,005$) (Rys. 19B)

wynikające ze zmniejszenia liczby aparatów szparkowych o 31% ($p < 0,005$) i pozostałych komórek epidermalnych o 17% ($p < 0,005$) (Rys. 19A). Natomiast u linii *mapkkk18-2* udokumentowano obniżenie wartości SI o 15% ($p < 0,005$) (Rys. 19B), które można tłumaczyć zmniejszeniem liczby aparatów szparkowych o 20% i innych komórek epidermalnych jedynie o 3%, jednakże obserwowana wartość jest statystycznie istotna ($p < 0,05$) (Rys. 19A).



Rysunek 19. MAPKKK18 reguluje proces tworzenia aparatów szparkowych w epidermie 6-dniowych liści Arabidopsis

(A) Ilość komórek w epidermie 6-dniowych liści linii *mapkkk18-1*, *mapkkk18-2*, *MAPKKK18oe*, *mkk7* i *mkk7mapkkk18-1*. Wartości przedstawiono jako procent wartości udokumentowanej dla roślin typu dzikiego.

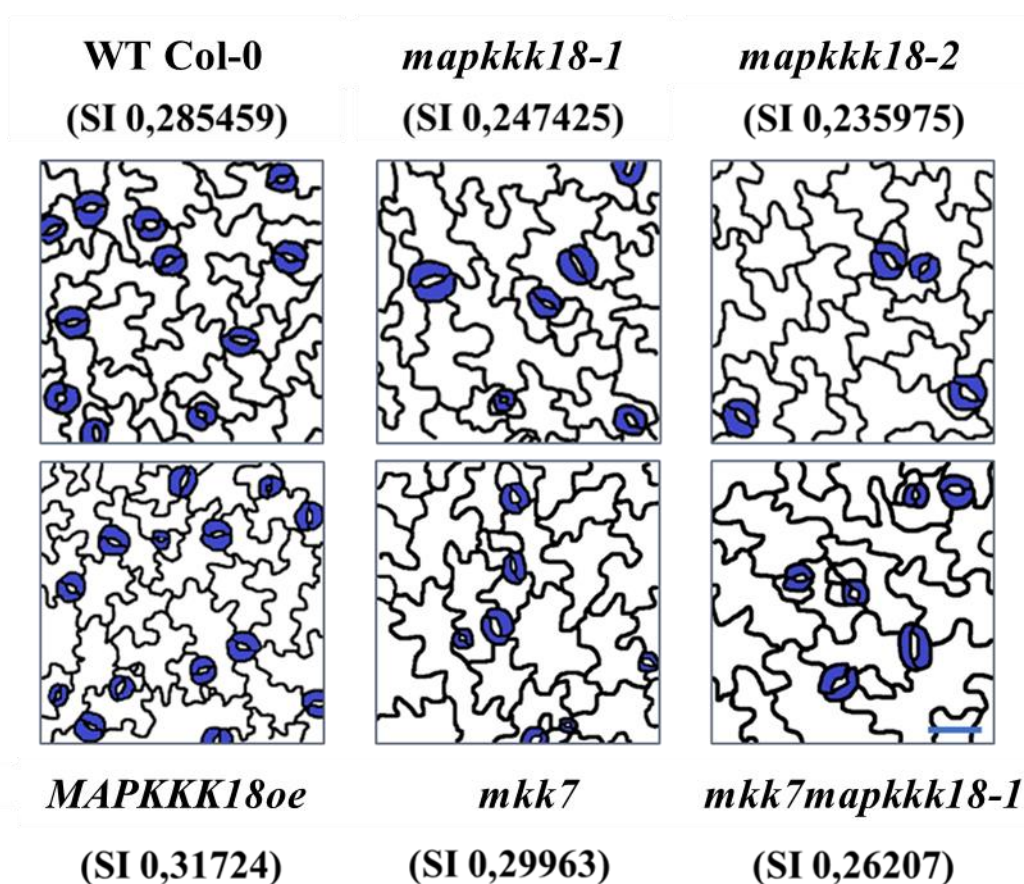
(B) Wartość SI u analizowanych linii.

Ponieważ powyższe analizy wykazały pozytywny wpływ MAPKKK18 na rozwój aparatów szparkowych, w kolejnych eksperymentach uwzględniono dodatkowe linie mutantów. Wiadomo, iż kaskada YODA-MKK7/MKK9-MPK3/MPK6 reguluje podziały komórek linii różnicowania szparek zarówno na wczesnych, jak i późniejszych etapach rozwoju epidermy (Lampard i wsp., 2009) - proces ten opisano szczegółowo w rozdziale 1.3 (Wstęp 1.3). Postanowiono więc sprawdzić, czy rola MAPKKK18 w rozwoju szparek jest powiązana z aktywnością kaskady YODA-MKK7/MKK9, która pełni podobną funkcję co kaskada YODA-MKK4/MKK5-MPK4/MPK6 (Lampard i wsp., 2009). W tym celu, w badaniach uwzględniono linię typu nokaut w genie *MKK7* (*mkk7*) i linię podwójnego nokauta w genach *MAPKKK18* i *MKK7* (*mkk7mapkkk18-1*).

Jak oczekiwano, w szóstym dniu rozwoju liścieni *Arabidopsis* zaobserwowano wyraźne zmiany w strukturze epidermy u mutantów *mkk7* i *mkk7mapkkk18-1*. Otrzymane wartości SI w badanych liniach były wyraźnie obniżone w porównaniu z linią typu dzikiego i wynosiły 0,202 dla linii *mkk7* i 0,212 dla linii *mkk7mapkkk18-1* (Rys. 18). Obniżenie zagęszczenia szparek o 30% ($p < 0,005$) dla linii *mkk7* (Rys. 19B) było spowodowane zwiększeniem o 93% liczby innych komórek epidermalnych ($p < 0,005$) oraz 20% zwiększeniem liczby aparatów szparkowych ($p < 0,005$) (Rys. 19A). W linii *mkk7mapkkk18-1* 26% zmniejszenie zagęszczenia szparek ($p < 0,005$) (Rys. 19B) było również efektem zwiększenia ogólnej liczby komórek skórki. W epidermie tej linii udokumentowano o 20% więcej komórek epidermalnych niebędących komórkami szparkowymi ($p < 0,005$) i o 5% więcej szparek ($p < 0,005$), w porównaniu z linią WT Col-0 (Rys. 19A). Podsumowując, zarówno MAPKKK18, jak i MKK7 uczestniczą w rozwoju szparek na wczesnym etapie. Zdają się jednak pełnić przeciwstawne role – aktywność MAPKKK18 promuje rozwój aparatów szparkowych, natomiast MKK7 ogranicza pierwsze podziały komórek linii różnicowania szparek.

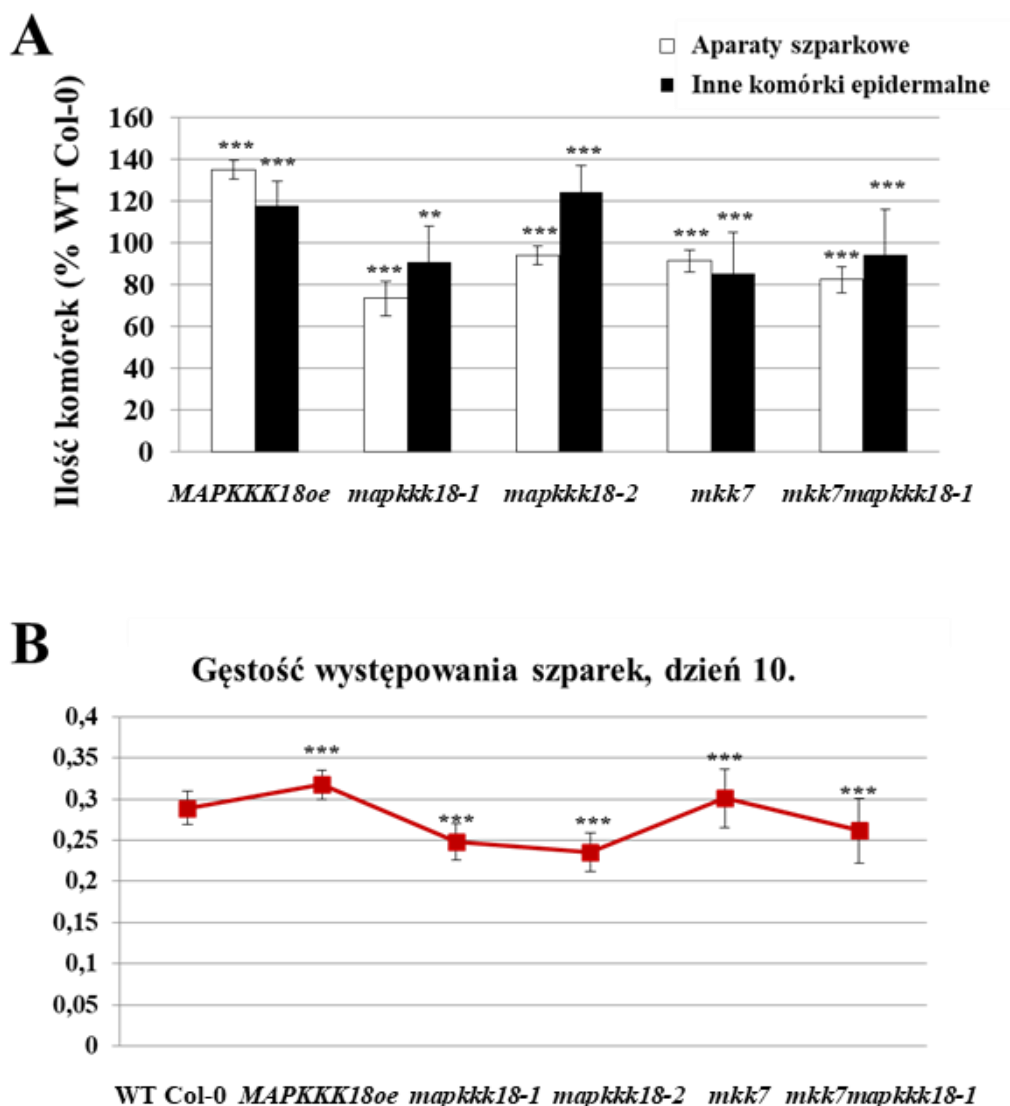
Obiektem drugiej części badań były 10-dniowe liścienie *Arabidopsis*. Dla analizowanych linii udokumentowano następujące wartości SI: 0,289 WT Col-0, 0,317 *MAPKKK18oe*, 0,248 *mapkkk18-1*, 0,2356 *mapkkk18-2*, 0,301 *mkk7* i 0,262 dla *mkk7mapkkk18-1* (Rys. 20). Ponownie u linii *MAPKKK18oe* obserwowano zwiększone, o 34%, zagęszczenie szparek ($p < 0,005$), jednak wykryto również podwyższoną liczbę pozostałych komórek epidermalnych, o 17% ($p < 0,005$) (Rys. 21A), co przełożyło się na wartość SI wyższą o 9% ($p < 0,005$) (Rys. 21B). U linii *mapkkk18-1* i *mapkkk18-2* zaobserwowano obniżenie wartości SI o 15% u linii *mapkkk18-1* ($p < 0,005$) i o 19% u linii *mapkkk18-2* ($p < 0,005$) w porównaniu z linią WT Col-0 (Rys. 21A-B). Obie linie nokaut

charakteryzowały się podobnym zagęszczeniem szparek w skórcie, jednak obniżenie parametru SI wynikało z innych przyczyn. U linii *mapkkk18-1* obserwowano (Rys. 21B) zarówno zmniejszenie liczby aparatów szparkowych o 23% ($p < 0,005$), jak i 5% zmniejszenie liczby pozostałych komórek epidermalnych ($p < 0,05$) (Rys. 21A). Natomiast u linii *mapkkk18-2* udokumentowano jedynie o 6% mniej aparatów szparkowych ($p < 0,005$), ale zaobserwowano 24% wzrost liczby pozostałych komórek epidermalnych ($p < 0,005$) (Rys. 21A). Analiza 10-dniowych siewek potwierdza wcześniejsze obserwacje i pozwala opisać pozytywną rolę MAPKKK18 w procesie tworzenia aparatów szparkowych.



Rysunek 20. Aktywność genu MAPKKK18 wpływa na zagęszczenie aparatów szparkowych w epidermie 10-dniowych liści Arabidopsis

Poglądowe ryciny fragmentów epidermy 10-dniowych liści Arabidopsis linii typu dzikiego WT Col-0, linii z nadekspresją białka MAPKKK18 (*MAPKKK18oe*), dwóch niezależnych linii typu nokaut genu *MAPKKK18* (*mapkkk18-1*, *mapkkk18-2*) i mutantów *mkk7* oraz podwójnego mutantu *mkk7mapkkk18-1*. Aparaty szparkowe oznaczono na niebiesko. Pasek skali: 50 μm .



Rysunek 21. MAPKKK18 reguluje proces tworzenia aparatów szparkowych w epidermie 10-dniowych liści Arabidopsis

(A) Ilość komórek w epidermie 10-dniowych liści linii *mapkkk18-1*, *mapkkk18-2*, *MAPKKK18oe*, *mkk7* i *mkk7mapkkk18-1*. Wartości przedstawiono jako procent liczby udokumentowanej dla roślin typu dzikiego.

(B) Wartość SI dla epidermy analizowanych linii.

Nieoczekiwanie, analiza linii *mkk7* w dziesiątym dniu rozwoju nie wykazała pogłębienia fenotypu obserwowanego w szóstym dniu wzrostu siewek. Przeciwnie, w porównaniu z linią WT Col-0, liczba aparatów szparkowych na liściu linii *mkk7* była o 9% niższa ($p < 0,005$) (Rys. 21A), podczas gdy liczba innych komórek epidermalnych obniżyła się o 15% ($p < 0,005$). W efekcie, wartość gęstości występowania szparek w skórcie linii *mkk7* była znacząco niższa, jedynie o 4% od linii WT Col-0 ($p < 0,005$) (Rys. 21B).

Porównując z WT-Col-0, u linii mutantu *mkk7mapkkk18-1* także obserwowano 9% spadek zagęszczenia szparek w epidermie ($p < 0,005$) (Rys. 21B). Przyczyną obserwowanego fenotypu dla tego mutantu była mniejsza ogólna liczba komórek w skórze – w tym o 18% ($p < 0,005$) mniejsza liczba aparatów szparkowych i jedynie o 6% ($p < 0,005$) mniejsza liczba pozostałych komórek epidermalnych (Rys. 21A). Wyraźne zbliżenie fenotypu linii *mkk7mapkkk18-1* pozwala wysnuć wniosek, że na późniejszych etapach rozwoju aparatów szparkowych ścieżki sygnalizacyjne związane z aktywnością MKK7 i MAPKKK18 nakładają się i promują tworzenie aparatów szparkowych.

Podsumowując, udokumentowane obserwacje wskazują na wyraźny udział MAPKKK18 w regulacji podziałów komórek linii różnicowania szparek w epidermie liścieni *Arabidopsis*. Wyniki uzyskane z analizy linii mutantów *mkk7* i *mkk7mapkkk18-1* pozwalają przypuszczać, że regulacja procesu tworzenia szparek przez MAPKKK18 jest niezależną ścieżką od kaskady YODA-MKK7.

5.7 Analiza oddziaływań MAPKKK18 w kaskadach kinaz MAP

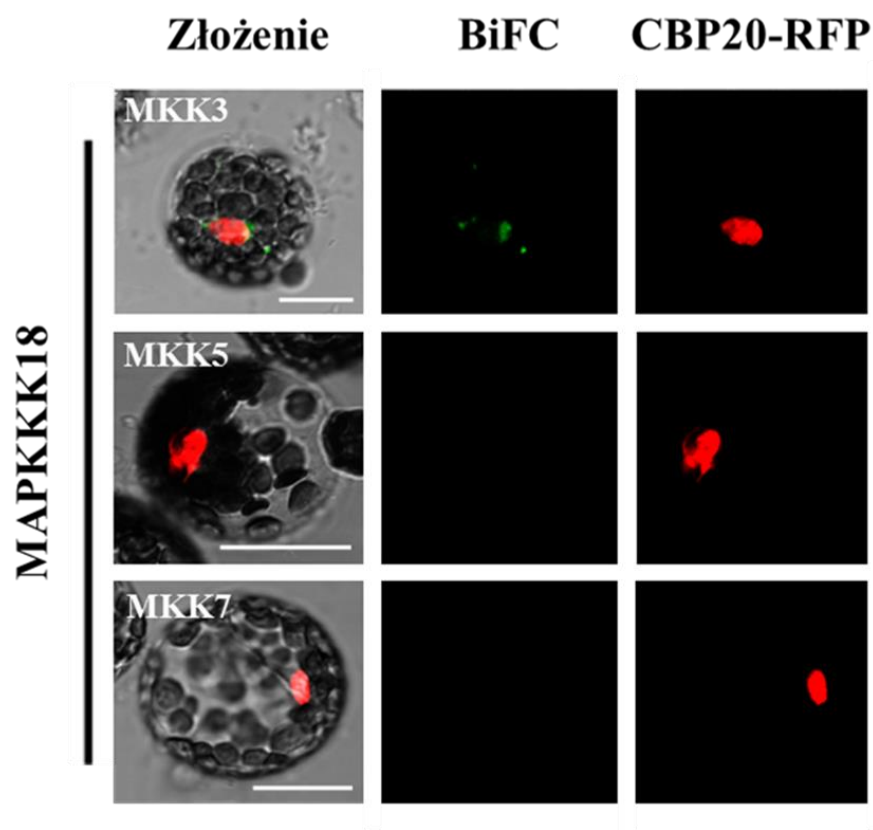
Na podstawie uzyskanych wcześniej wyników postanowiono sprawdzić czy zaburzenia podziałów komórek linii różnicowania szparek obserwowane w linii mutantu *mkk7mapkkk18-1* mogą być efektem oddziaływania pomiędzy MAPKKK18 i MKK7. Kinazy MAPKKK charakteryzują się małą specyficznością i potrafią fosforylować kilka MAPKK, rozpoczynając tym samym różne kaskady kinaz MAP (Rodriguez i wsp., 2010). Wcześniejsze analizy oddziaływań z wykorzystaniem dwuhybrydowego systemu drożdżowego wskazały MKK3 i MKK7 jako potencjalne substraty MAPKKK18 (Tajdel, nieopublikowane; Jagodzick, praca magisterska, 2011). Dwie wytypowane kinazy MAP - MKK3 i MKK7 - fosforylują kinazę MPK6, która jest silnie powiązana z rozwojem i aktywnością aparatów szparkowych (Dóczy i wsp., 2007; Takahashi i wsp., 2007; Wang. i wsp., 2007). Postawiono więc hipotezę, że obie MAPKK oddziałują z MAPKKK18. Ponadto, najnowsze dane literaturowe wskazują na udział MKK5 w regulacji procesu rozwoju aparatów szparkowych (Li i wsp., 2016). Dlatego, na dalszym etapie analiz uwzględniono również i tę kinazę MAP.

Analizy z wykorzystaniem narzędzi bioinformatycznych wykazały, że MAPKKK18, MKK5 i MKK7 mogą występować w różnych kompartmentach komórkowych. Dane zebrane w bazie SUBA4 (Hooper i wsp., 2017) wskazują, że MKK5 lokalizuje się wyłącznie w aparacie Golgiego, a MKK7 wyłącznie w mitochondriach (SUBA4, dane na dzień 30.11.2017).

Natomiast badania eksperymentalne wskazują, że białko MKK5 kolokalizuje się z białkiem EDR1 głównie na obszarze cytoplazmy, ale także na obszarze jądra komórkowego (Zhao i wsp., 2014). Lampard i wsp. również udokumentowali lokalizację cytoplazmatyczną i jądrową MKK5 o permanentnej aktywności (Lampard i wsp., 2014). Inne badania zespołu Lampard i wsp. (2014) wykazują, że MKK7 lokalizuje się w mitochondriach aparatów szparkowych Arabidopsis i ta lokalizacja jest niezbędna do regulacji rozwoju aparatów szparkowych przez MKK7 (Lampard i wsp., 2014). Dlatego, aby zbadać potencjalne oddziaływania pomiędzy MAPKKK18 i wybranymi MKK ponownie użyto metody BiFC (Metody 4.11.3). W tym celu przeprowadzono nadekspresję MAPKKK18 z C-końcowym fragmentem białka CFP przyłączonym na jego końcu aminowym (MAPKKK18-nCFP) w koekspresji z potencjalnymi partnerami białkowymi w fuzji z N-końcowym fragmentem białka fluorescencyjnego Venus. Do analiz wytypowano MKK3 (MKK3-nVenus), MKK5 (MKK5-nVenus) oraz MKK7 (MKK7-nVenus). Do przeprowadzenia nadekspresji białek fuzyjnych i obserwacji mikroskopowych wykorzystano, jak w poprzednich eksperymentach, protoplasty uzyskane z komórek miękiszu liści Arabidopsis. Wszystkie analizy prowadzono w kolokalizacji z białkiem fuzyjnym CBP20-RFP, stanowiącym jednocześnie kontrolę transformacji i marker lokalizacji jądrowej.

Po transfekcji protoplastów konstruktami MAPKKK18 i MKK3 z przyłączonymi komplementarnymi fragmentami białka fluorescencyjnego zaobserwowano zieloną fluorescencję potwierdzającą oddziaływanie między badanymi białkami na obszarze jądra komórkowego. Lokalizacja oddziaływania MAPKKK18-MKK3 pokrywała się z czerwoną fluorescencją białka CBP20. Jednakże oddziaływanie pomiędzy MAPKKK18 i MKK3 w postaci jednorodnego skupiska obserwowano także poza obszarem jądra komórkowego u 10% analizowanych protoplastów (Rys. 22, pierwszy rząd).

Analogiczne analizy mające na celu weryfikację oddziaływań między MAPKKK18, a MKK5 i MKK7 nie dały pozytywnych wyników - nie zaobserwowano odtworzenia kompleksu białka fluorescencyjnego. Analiza ta wskazuje, że zarówno MKK5 jak i MKK7, nie są partnerami MAPKKK18 w kaskadzie kinaz MAP rozpoczynającej się od MAPKKK18 (Rys. 22, drugi i trzeci rząd).



Rysunek 22. MAPKKK18 oddziałuje z MKK3 i nie oddziałuje z MKK5 i MKK7

Efekt koekspresji białka MAPKKK18-cCFP z MKK3-nVenus (pierwszy rząd), MKK5-nVenus (drugi rząd) i MKK7-nVenus (trzeci rząd). W przypadku odtworzenia białka fluorescencyjnego obserwuje się fluorescencję koloru zielonego. Przejściowa koekspresja pary MAPKKK18-cCFP i MKK3-nVenus pozwoliła na odtworzenie kompleksu białka reporterowego i obserwację fluorescencji zlokalizowanej na obszarze jądra komórkowego, ale również cytoplazmy dla 10% protoplastów. Kontrolę transformacji i lokalizacji jądrowej stanowiło CBP20-RFP (czerwona fluorescencja). W jednym powtórzeniu eksperymentu dokumentowano lokalizację dla przynajmniej 60 protoplastów. Eksperyment wykonano w trzech powtórzeniach biologicznych. Pasek skali: 100 μm .

6. Dyskusja

Nadrzędnym celem pracy było poznanie i opisanie ścieżki sygnalizacyjnej kwasu abscysynowego regulowanej przez MAPKKK18. W tym celu, w pierwszym etapie prac analizowałem mechanizmy regulujące aktywność MAPKKK18 (Rys. 9), identyfikowałem procesy biologiczne regulowane przez MAPKKK18 i powiązane z sygnalizacją ABA (Rys. 10, 11). W kolejnym etapie prac poszukiwano partnerów MAPKKK18 w kaskadach kinaz MAP oraz oddziaływania z białkami rdzeniowej sygnalizacji ABA (Rys. 16, 17, 22). W ostatnim etapie prac zbadano wpływ MAPKKK18 na rozwój aparatów szparkowych w epidermie liścieni *Arabidopsis* (Rys. 18, 20). Wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie wskazują na precyzyjną kontrolę transdukcji sygnału ABA poprzez kaskady kinaz MAP u *Arabidopsis*. Zaprezentowane wyniki ukazują również szerokie spektrum procesów regulowanych przez MAPKKK18 poprzez ścieżki sygnalizacyjne ABA.

6.1 Specyficzność indukcji aktywności kinazowej MAPKKK18

W przedstawionej pracy, aby określić mechanizmy aktywacji MAPKKK18, postanowiono zbadać jakie fitohormony indukują aktywność kinazową MAPKKK18. W tym celu przeprowadzono testy aktywności kinazowej MAPKKK18 po indukcji kwasem jasmonowym, kwasem salicylowym i etefonem (Rys. 9). W wyniku przeprowadzonych badań nie zaobserwowano aktywności kinazowej MAPKKK18 w wyniku traktowania wymienionymi czynnikami w czasie 120 minut od indukcji. Ponieważ wcześniejsze doniesienia wykazały aktywację MAPKKK18 przez ABA (Matsuoka i wsp., 2015; Mituła i wsp., 2015), oznacza to, że aktywność MAPKKK18 jest specyficznie indukowana przez ABA.

Obserwuje się jednak indukcję ekspresji *MAPKKK18* przez warunki stresu suszy, stres osmotyczny oraz w trakcie patogenezы (Menges i wsp., 2008; EFP browser). Brak indukcji aktywności MAPKKK18 przez SA, JA i ET nie wyklucza, że MAPKKK18 jest zaangażowana w różne ścieżki odpowiedzi na stres. Otrzymane wyniki pozwalają przypuszczać, że aktywność MAPKKK18 w odpowiedzi na stres odbywa się poprzez ścieżki sygnalizacyjne regulowane przez ABA. Hipotezę tę zdają się potwierdzać wyniki opublikowane przez Li i wsp. (2017), które wskazują, że funkcje jakie MAPKKK18 pełni w odpowiedzi na stres osmotyczny są regulowane przez ścieżkę sygnalizacyjną zależną od ABA (Li i wsp., 2017).

6.1.1 Rola ABA w regulacji lokalizacji subkomórkowej MAPKKK18

Kinazy MAP po aktywacji są zdolne do translokacji pomiędzy kompartmentami komórkowymi (Adachi i wsp., 1999). Ponieważ aktywność MAPKKK18 jest specyficznie indukowana przez ABA, postanowiono sprawdzić, czy ABA reguluje lokalizację subkomórkową MAPKKK18. W tym celu zbadano lokalizację wariantów białka MAPKKK18 o zmienionej aktywności katalitycznej oraz lokalizację niezmutowanego białka MAPKKK18 pod wpływem ABA. Zarówno wariant nieaktywny białka MAPKKK18 (wariant niosący mutację K32M), jak i wariant o stałej aktywności (MAPKKK18^{T167E}) lokalizuje się nie tylko na obszarze jądra komórkowego, ale także na terenie cytoplazmy (Rys. 12). Dzika forma białka MAPKKK18 występuje jedynie w jądrze komórkowym (Rys. 12). Jednak w wyniku traktowania egzogennym ABA udokumentowano pojawienie się białka poza obszarem jądra komórkowego (Rys. 13). Wynik ten wskazuje, że ABA wpływa zarówno na aktywność kinazową MAPKKK18, jak i reguluje funkcjonowanie MAPKKK18 w różnych kompartmentach komórkowych.

Aby uzyskać więcej informacji na temat translokacji MAPKKK18 pomiędzy kompartmentami komórkowymi, przeprowadzono dodatkowe analizy. Jednoczesne traktowanie transformowanych protoplastów ABA i inhibitorem eksportyn jądrowych wykazało, że MAPKKK18 jest z jądra komórkowego aktywnie usuwana przez por jądrowy (Rys. 15). Natomiast obserwacje pojedynczych protoplastów w wąskim oknie czasowym (30 minut) pozwoliły określić, że proces eksportu MAPKKK18 z jądra jest dynamiczny – MAPKKK18 obserwowano na obszarze cytoplazmy już w 20 minut od rozpoczęcia traktowania ABA (Rys. 14).

Wyniki dotychczas opublikowanych badań wykazują, że kinazy MAP mają zdolność do dynamicznych zmian lokalizacji pomiędzy jądrem i cytoplazmą (Adachi i wsp., 2000), a ich lokalizacja komórkowa może zmieniać się wraz z aktywacją danej kinazy (Ben-Levy i wsp., 1998; Adachi i wsp., 1999; Turjanski i wsp., 2007; Wood i wsp., 2009). MAPKKK18 w wyniku aktywacji przemieszcza się jednak w przeciwnym kierunku - z jądra do cytoplazmy. W literaturze opisano wcześniej podobny mechanizm translokacji kinaz MAP w wyniku indukcji. W 2014 roku Ovečka i wsp. opisali transport dwóch kinaz MAP aktywowanych stresem solnym, SIMK i SIMKK, z jądra do cytoplazmy po indukcji 250 mM NaCl. SIMKK fosforyluje i aktywuje SIMK, tworząc kaskadę zdolną do aktywacji kinaz MPK6 i MPK3 u *Arabidopsis* (Ovečka i wsp., 2014). Najnowsze badania wskazują jednocześnie na

podobieństwo funkcjonalne pomiędzy silnie zaangażowaną w odpowiedź na NaCl kinazą MAPKKK16, a innymi kinazami MAPKKK podgrupy MEKK – MAPKKK14/15 i MAPKKK17/18 u *Arabidopsis* (Choi i wsp., 2017). Może to oznaczać, że eksport kinaz MEKK z jądra do cytoplazmy jest charakterystyczny dla kinaz MAPKKK tej podgrupy, jednak dla potwierdzenia tej hipotezy w obecnej chwili brak jest szczegółowych badań dotyczących lokalizacji kinaz MEKK.

Eksport białek z jądra komórkowego odbywa się u *Arabidopsis* poprzez dwie eksportyny, XPO1a i XPO1b (Haasen i wsp., 1999). Obie eksportyny posiadają w swej sekwencji konserwatywną resztę cysteiny modyfikowaną przez leptomycynę B (Kudo i wsp. 1999). Zablokowanie przez leptomycynę eksportu MAPKKK18 z jądra komórkowego (Rys. 15) może oznaczać, że to właśnie eksportyny XPO1a/b odpowiadają za eksport MAPKKK18 z jądra do cytoplazmy. Eksportyny XPO1a/b rozpoznają w sekwencjach białek bogatą w lizynę sekwencję NES. Analiza bioinformatyczna sekwencji białkowej MAPKKK18 nie wykazuje jednak jednoznacznie występowania w niej motywu NES. Serwer NetNES (Cour i wsp., 2004) przewiduje z niskim prawdopodobieństwem występowanie motywu NES w pozycji 114-123 sekwencji. Serwer ValidNES szacuje prawdopodobieństwo występowania motywu NES na wartość 0,2 w skali od 0 do 1 (Cour i wsp., 2004). Również serwer LocNES (Xu i wsp., 2015) wyszukuje motyw NES w sekwencji MAPKKK18 z niskim prawdopodobieństwem. Brak wykrywania motywu NES w sekwencji MAPKKK18 przez programy bioinformatyczne nie wyklucza oddziaływania MAPKKK18 z eksportynami jądrowymi. Na dostępność i rozpoznawalność motywu NES wpływa wiele czynników, w tym ukrywanie i odkrywanie motywu NES (Li i wsp., 1998; Stommel i wsp., 1999; Seimiya i wsp., 2000; Heerklotz i wsp., 2001; Kobayashi i wsp., 2001; Craig i wsp., 2002), tworzenie mostków disiarczkowych (Yan i wsp., 1998; Kudo i wsp., 1999; Kuge i wsp., 2001) oraz, co niezwykle istotne, poziom ufosforylowania białka (Engel i wsp., 1998; Ohno i wsp., 2000; McKinsey i wsp., 2001; Zhang i Xiong, 2001; Brunet i wsp., 2002). Na tym etapie badań można przypuszczać, że w wyniku aktywacji i fosforylacji MAPKKK18 dochodzi do odsłonięcia lub utworzenia przestrzennego motywu NES umożliwiającego oddziaływanie z eksportynami. Jak pokazano na rysunku 14 proces translokacji MAPKKK18 z jądra do cytoplazmy przebiega dynamicznie. MAPKKK18 pojawia się poza jądrem komórkowym już 20 minut od rozpoczęcia traktowania (Rys. 14). W literaturze udokumentowano, że procesy importu i eksportu jądrowego przebiegają bardzo szybko. Ssacza kinaza MAP ERK2 indukcji antygenem importowana do jądra, a następnie eksportowana do cytoplazmy i usuwana z jądra w czasie do 20 minut od indukcji (Furuno

i wsp., 2001). ERK2, podobnie jak MAPKKK18, nie posiada w swej sekwencji motywu NLS, ani motywu NES (Jaaro i wsp., 1997).

Powyższe wyniki pozwalają przypuszczać, że translokacja MAPKKK18 może stanowić mechanizm regulacji ścieżki sygnalizacyjnej. Na ten moment nie można jednoznacznie określić znaczenia funkcjonalnego translokacji MAPKKK18 z jądra do cytoplazmy, ale mechanizm ten jest z pewnością istotny dla aktywności i funkcjonowania MAPKKK18 w ścieżce sygnalizacyjnej. W niniejszej pracy przeprowadzono także badania wskazujące, że do oddziaływań MAPKKK18 z SnRK2.6/OST i MKK3 dochodzi na obszarze jądra i cytoplazmy komórkowej (Rys. 17, Rys. 22). Można więc postawić hipotezę, że translokacja MAPKKK18 stanowi mechanizm regulacji ścieżki sygnalizacyjnej ABA, a MAPKKK18 oddziałując z substratami pełni specyficzne funkcje na obszarze różnych kompartmentów komórkowych.

6.1.2 MAPKKK18 jest zaangażowana w procesy regulowane przez sygnalizację ABA

Ponieważ dostępne dane literaturowe wskazują, że transkrypcja genu *MAPKKK18*, w odpowiedzi na ABA, jest uruchamiana na w organach kwiatowych, aparatach szparkowych i merystemach wierzchołkowych korzeni (Mitula i wsp., 2015) sprawdzano czy MAPKKK18 kieruje procesem kiełkowania nasion i uczestniczy w regulacji apertury aparatów szparkowych. Oba procesy fizjologiczne regulowane są głównie przez ABA (Kang i wsp., 2015). W toku badań wykazano, że nadekspresja genu *MAPKKK18* prowadzi do zmniejszonej wrażliwości nasion na ABA (Rys. 10), natomiast wyłączenie aktywności genu *MAPKKK18* prowadzi do nieznacznie zwiększonej wrażliwości na ABA i osłabienia siły kiełkowania nasion (Rys. 10). Z kolei analiza ruchów szparek wykazała, że wyłączenie aktywności genu *MAPKKK18* prowadzi do osłabienia zamykania aparatów szparkowych pod wpływem ABA (Rys. 11), natomiast szparki linii *Arabidopsis* z nadekspresją genu *MAPKKK18* są bardziej wrażliwe na ABA (Rys. 11).

Aktywność genu *MAPKKK18* wpływa więc na dwa procesy fizjologiczne silnie powiązane z sygnalizacją ABA, co pozwala ustanowić MAPKKK18 jako efektor i element funkcjonalny sygnalizacji ABA u *Arabidopsis*. Dotychczas w literaturze nie opisano wpływu MAPKKK18 na proces kiełkowania nasion, jednak obserwuje się zwiększenie ekspresji genu *MAPKKK18* na późniejszych etapach rozwoju nasion, w fazach końcowego dojrzewania (EFP browser, dane na dzień 28.11.2017). Wyniki badań Matsuoka i wsp. (2015) wskazują,

że MAPKKK18 bierze udział w procesach związanych ze starzeniem tkanek. Natomiast Li i wsp. w 2016 roku udokumentowali udział MAPKKK18 w odpowiedzi na stres suszy. Nadekspresja genu *MAPKKK18* prowadzi do zwiększonej odporności, a wyłączenie genu do większej wrażliwości na stres suszy. Zespół zaobserwował także zwiększoną aperturę aparatów szparkowych u roślin typu nokaut w genie *MAPKKK18*, co jest zgodne z wynikami prezentowanymi w niniejszej pracy (Li i wsp., 2016).

Na obecną chwilę brak jest jednak informacji, które z kinaz MAPK będących elementami kaskady rozpoczynającej się od MAPKKK18 mogą być zaangażowane w regulację procesów kiełkowania i zamykania aparatów szparkowych. Udokumentowano udział MPK1, MPK2, MPK7 i MPK14 w sygnalizacji ABA – kinazy te ulegają aktywacji w wyniku indukcji ABA i oddziałują z MKK3 w kaskadzie kinaz MAP aktywowanej przez ABA (Menges i wsp., 2008; Ortiz-Masia i wsp., 2007; Umezawa i wsp., 2013; Matsuoka i wsp., 2015; Danquah i wsp., 2015). Jednak do tej pory nie powiązano żadnej z tych kinaz z procesami kiełkowania nasion i zamykania aparatów szparkowych. Analizy ruchów aparatów szparkowych i zbadanie siły kiełkowania nasion linii nokautów w genach kinaz MAPK1/2/7/14 pozwolą wskazać, która konkretna MAPK bierze udział w regulacji zamykania aparatów szparkowych pod wpływem ABA w kaskadzie rozpoczynającej się od MAPKKK18.

6.2 MAPKKK18 oddziałuje z elementami rdzeniowej sygnalizacji ABA

W celu identyfikacji mechanizmów odpowiadających za regulację aktywności MAPKKK18 w niniejszej pracy postanowiono sprawdzić czy elementy rdzeniowej sygnalizacji ABA (PYR/PYL/RCAR-PP2C-SnRK2) regulują funkcjonowanie MAPKKK18. ABI1 jest głównym negatywnym regulatorem sygnalizacji ABA i nadzoruje szereg procesów rozwojowych i elementów odpowiedzi na stresy biotyczne i abiotyczne (Schweighofer i wsp., 2007, Ludwików i wsp., 2009). Kinazy SnRK2 stanowią natomiast pozytywne regulatory sygnalizacji ABA. Jako przedstawiciela kinaz SnRK2 do analiz oddziaływań z MAPKKK18 wybrano SnRK2.6/OST1.

Przeprowadzone analizy wykazały, że MAPKKK18 oddziałuje specyficznie z fosfatazą ABI1, a do interakcji pomiędzy białkami dochodzi na obszarze na obszarze jądra komórkowego (Rys. 16). Pomimo dużego podobieństwa sekwencji pomiędzy ABI1 i ABI2 - fosfatazy te zazwyczaj pełnią podobne funkcje i są zaangażowane w regulację tych samych procesów komórkowych (Rodriguez i wsp., 1999; Pantin i wsp., 2013; Kim i wsp., 2016) nie

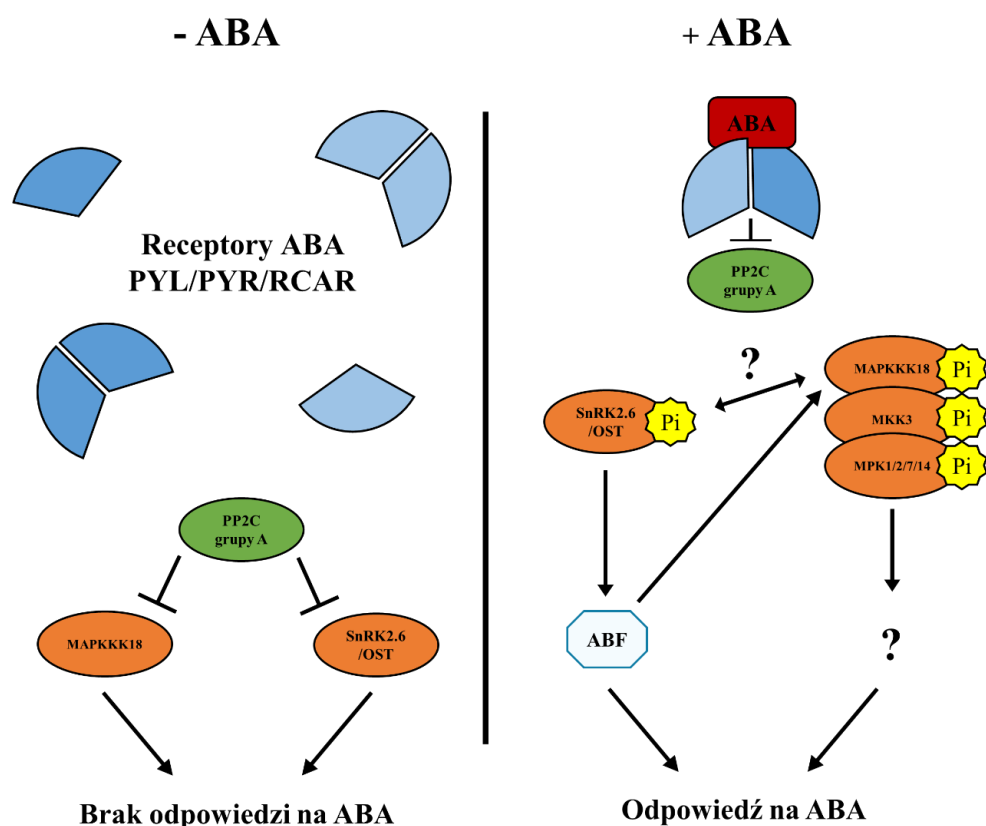
zaobserwowano oddziaływanie między MAPKKK18, a ABI2 PP2C (Rys. 16). Stwierdzono natomiast, że MAPKKK18 oddziałuje także z kinazą SnRK2.6/OST1. Do oddziaływania pomiędzy MAPKKK18 i SnRK2.6/OST1 dochodzi na obszarze jądra komórkowego i cytoplazmy (Rys. 17). Na podstawie tych wyników można określić, że MAPKKK18 oddziałuje z elementami rdzeniowej sygnalizacji ABA, zarówno z negatywnymi i pozytywnymi regulatorami sygnalizacji ABA.

Znaczenie oddziaływania między MAPKKK18 i ABI1 wydaje się być sprecyzowane. Wcześniejsze doniesienia wskazują, że ABI1 pełni istotną funkcję w regulacji aktywności MAPKKK18. Stwierdzono, że ABI1 defosforyluje MAPKKK18, co skutkuje obniżeniem jej aktywności kinazowej. Ponadto, ABI1 reguluje stabilność MAPKKK18 i kieruje kinazę do degradacji przez proteasom 26S (Mitula i wsp., 2015a). Niemniej jednak znaczenie oddziaływania pomiędzy MAPKKK18 a SnRK2.6/OST1 jest aktualnie nieznane. Stwierdzono, że kinaza SnRK2.6/OST1 nie aktywuje aktywności MAPKKK18 (Mitula i wsp., 2015a). Z kolei z uwagi na fakt, że rekombinowana MAPKKK18 nie ulega autoaktywacji (Mitula i wsp., 2015a), analiza potencjalnej regulacji aktywności SnRK2.6/OST1 przez MAPKKK18 jest obecnie utrudniona. Należy dodać, że w zespole badawczym, którego jestem członkiem nie udało się uzyskać rekombinowanej stale aktywnej formy kinazy MAPKKK18 (forma białka niosąca mutację T167E w domenie kinazowej). Ponadto, Danquah i wsp. (2015) w swej pracy stawiają hipotezę, że za aktywację transkrypcji genu *MAPKKK18* mogą odpowiadać kinazy SnRK2. Autorzy przypuszczają, że SnRK2.6/OST1 fosforyluje nieznany czynnik transkrypcyjny, który reguluje aktywność genu *MAPKKK18*. Fakt ten może tłumaczyć brak aktywności kinazowej MAPKKK18 u mutantu *snrk2.6* (Mitula i wsp., 2015a).

Pozostaje zatem pytanie o funkcję biologiczną kompleksów MAPKKK18/ABI1/SnRK2.6. Zarówno MAPKKK18 jak i ABI1 oraz SnRK2.6/OST1 uczestniczą w regulacji zamykania aparatów szparkowych, a także w kiełkowaniu (Assmann i wsp., 2000; Fujita i wsp., 2009; Brandt i wsp., 2012). Aktywność kinazowa MAPKKK18 i SnRK2.6 jest hamowana przez fosfatazę ABI1 (Mitula i wsp., 2015a, Tajdel i wsp., 2016). Można zatem wnioskować, że udokumentowane oddziaływania pomiędzy MAPKKK18/SnRK2.6 oraz ABI1 stanowią istotny element mechanizmu regulującego kiełkowanie jak i proces zamykania aparatów szparkowych pod wpływem ABA.

Przedstawione wyżej wyniki świadczą o silnym powiązaniu MAPKKK18 z sygnalizacją ABA. Oznacza to, że aktywność MAPKKK18 jest regulowana przez elementy

rdzeniowej sygnalizacji ABA nie tylko na poziomie transkrypcyjnym (Ludwików i wsp., 2009; Danquah i wsp., 2015), ale również na poziomie białka. Wskazuje to na niezwykle skomplikowany i precyzyjny system regulacji aktywności MAPKKK18 w regulacji sygnalizacji ABA.



Rysunek 23. Schemat działania rdzeniowej sygnalizacji ABA, uwzględniający istnienie kaskady MAPKKK18-MKK3-MPK1/2/7/14

A) Przy niskim stężeniu ABA w komórce receptory PYL/PYR/RCAR nie są aktywne, a fosfatazy białkowe 2C grupy A hamują aktywność kinazową SnRK2 i MAPKKK18. (B) Związanie cząsteczki ABA przez receptory PYL/PYR/RCAR prowadzi do inhibicji PP2C z grupy A i transdukcji sygnału ABA, z udziałem kinaz SnRK2. Jednocześnie uruchomiona zostaje kaskada MAPKKK18-MKK3-MPK1/2/7/14. SnRK2 fosforyluje szereg białek, w tym czynniki transkrypcyjne ABF, które rozpoznają elementy ABRE w sekwencji promotorów i mogą regulować transkrypcję MAPKKK18. Czynniki transkrypcyjne kaskady zależnej od MAPKKK18 są nieznane. Opracowanie własne.

6.3 MAPKKK18 oddziałuje z MKK3 wewnątrz kaskady kinaz MAP

Transdukcja sygnału poprzez kaskady kinaz opiera się na aktywacji kolejnych kinaz MAP, rozpoczynając od MAPKKK, przez MAPKK i kończąc na MAPK. Podstawowa kaskada MAP rozpoczyna się od aktywacji MAPKKK, które następnie fosforylują reszty seryny i treoniny kinaz MAPKK. Aby określić potencjalnych partnerów dla MAPKKK18 wewnątrz kaskady kinaz MAP, przeprowadzono analizę oddziaływań MAPKKK18 z wybranymi kinazami MAPKK. Aby zidentyfikować substraty MAPKKK18 wśród kinaz MAPKK użyto technikę BiFC. Wcześniejsze analizy oddziaływań z wykorzystaniem drożdżowego systemu dwuhybrydowego przeprowadzone w Zakładzie Biotechnologii UAM wskazały MKK3 jako potencjalny substrat MAPKKK18 (Tajdel, nieopublikowane; Jagodzick, praca magisterska, 2011). Ponieważ w literaturze znajdują się doniesienia wskazujące na udział kinaz MKK5 i MKK7 w regulacji funkcji i rozwoju aparatów szparkowych (Lampard i wsp., 2009; Li i wsp., 2016), w niniejszej pracy analizowano również możliwość oddziaływania pomiędzy MAPKKK18 a MKK5 i MKK7.

Z użyciem metody BiFC stwierdzono, że nie dochodzi do oddziaływania pomiędzy MAPKKK18, a MKK5 i MKK7. Udokumentowano natomiast oddziaływanie MAPKKK18 z MKK3. Do oddziaływania pomiędzy badanymi białkami dochodzi na obszarze jądra komórkowego i cytoplazmy (Rys. 22). Udokumentowanie oddziaływania poza obszarem jądra komórkowego zdaje się mieć znaczenie biologiczne i nie być artefaktem obrazowania. MAPKKK18 jest zdolna do translokacji z jądra do cytoplazmy komórkowej, a MKK3 oddziałuje z białkami na obszarze obu tych kompartmentów komórkowych (Jalmi i Sinha, 2016; Choi i wsp., 2017). Doniesienia literaturowe potwierdzają również, że MAPKKK18 oddziałuje z MKK3 wewnątrz kaskady kinaz MAP odpowiedzialnej za transdukcję sygnału ABA (Matsuoka i wsp., 2015; Danquah i wsp., 2015). Doniesienia Matsuoka i wsp. (2015) potwierdzają jednocześnie brak oddziaływania pomiędzy MAPKKK18 i MKK5. Zebrane wyniki wskazują, że w kaskadach kinaz MAP jedynym partnerem oddziaływań dla MAPKKK18 jest kinaza MKK3. Obserwacja ta jest istotna ze względu na fakt, że aktywność MKK3, podobnie jak MAPKKK18, wiąże się nie tylko z odpowiedzią na ABA (Matsuoka i wsp., 2015; Danquah i wsp., 2015), ale również z odpowiedzią na kwas jasmonowy (Takahashi i wsp., 2007). MAPKKK18 funkcjonuje także w ścieżkach sygnałowych zależnych od RFT (Hummel i wsp., 2003). Opisanie modułu MAPKKK18-MKK3 ma więc istotne znaczenie dla zrozumienia mechanizmów komunikacji różnych ścieżek

sygnalizacyjnych i tego, w jaki sposób współdziałają one w adaptacji roślin do warunków stresu.

6.4 MAPKKK18 zaangażowana jest w regulację podziałów komórek linii rozwojowej aparatów szparkowych

MAPKKK18 jest silnie zaangażowana w transdukcję sygnału ABA - gen *MAPKKK18* ulega ekspresji w aparatach szparkowych nawet na wczesnych etapach rozwoju, a MAPKKK18 jest zaangażowane w przełamywanie spoczynku nasion (Rys. 10) i zamykanie aparatów szparkowych (Rys. 11). Aktywność MAPKKK18 zdaje się być silnie powiązana z komórkami szparkowymi, a ABA od wielu lat jest uznawany za kluczowy hormon regulujący proces zamykania aparatów szparkowych (Wstęp 1.3). Współcześnie wskazuje się na coraz większą rolę ABA również w regulacji procesu tworzenia szparek. Na tej podstawie postanowiono zbadać potencjalną rolę MAPKKK18 w regulacji rozwoju aparatów szparkowych. Przeprowadzona analiza wykazała, że wyłączenie genu *MAPKKK18* prowadzi do obniżenia ogólnej liczby komórek w epidermie, zarówno liczby aparatów szparkowych, jak i pozostałych komórek epidermalnych (Rys. 19, 21). Natomiast nadekspresja *MAPKKK18* prowadzi do fenotypu odwrotnego, czyli zwiększenia liczby aparatów szparkowych, przy podobnej liczbie innych komórek epidermalnych (Rys 19, 21). Jednocześnie nadekspresja genu *MAPKKK18* nie prowadzi do znaczącego zwiększenia ilości komórek epidermalnych niebędących aparatami szparkowymi (Rys. 19, 21).

Danquah i wsp. (2015) wskazują, że MAPKKK17 jest blisko spokrewniona z MAPKKK18 i również oddziałuje z MKK3 w kaskadzie kinaz MAP, a ekspresja tego białka jest aktywowana przez ABA (Danquah i wsp., 2015). Nie określono jednak wpływu MAPKKK17 na proces tworzenia aparatów szparkowych. Analiza przebiegu rozwoju aparatów szparkowych u nokauta w genie *MAPKKK17* oraz podwójnego nokauta w genach *MAPKKK18* i *MAPKKK17* pozwoli jednoznacznie wykazać wpływ MAPKKK17 na proces regulacji tworzenia aparatów szparkowych.

Współcześnie przypisuje się coraz większą rolę ABA w procesie rozwoju struktury epidermy i tworzenia szparek. Od lat opisuje się wpływ warunków stresu suszy oraz ABA na regulację rozwoju aparatów szparkowych w epidermie, gdzie wskazuje się negatywny wpływ ABA na tworzenie szparek w skórze (Lake i Woodward, 2008; Pantin i wsp., 2013). Badania zespołu Tanaka i wsp. w 2013 r. umocniły znaczenie ABA jako regulatora rozwoju aparatów szparkowych. W swej pracy zespół wskazuje, że ABA blokuje inicjację tworzenia

aparatów szparkowych i na podstawie wyników z analiz qPCR sugeruje, że aktywność ABA reguluje ten proces powyżej aktywności czynników MUTE i FAMA. Najprawdopodobniej ABA bezpośrednio reguluje aktywność czynnika transkrypcyjnego SPCH. Można więc postawić hipotezę, że ABA reguluje proces rozwoju aparatów szparkowych poprzez kaskadę zależną od MAPKKK18, a efektem tej kaskady jest czynnik transkrypcyjny SPCH. Proponowaną hipotezę potwierdzają wyniki Tanaka i wsp. (2013). W swojej pracy zespół opisuje fenotyp podwójnego mutantu *mute abi2-2*, u którego obserwuje się występowanie merystemoidów nawet na dalszych etapach rozwoju liścieni. Podobną obserwację udokumentowano w obrazie epidermy linii *MAPKKK18oe* (Rys. 20).

Przedstawione powyżej wyniki pozwalają określić, że MAPKKK18 jest aktywna na wczesnych etapach rozwoju aparatów szparkowych. Można w tym miejscu postawić hipotezę, że MAPKKK18 pozytywnie reguluje aktywność czynnika SPCH. Czynnik SPCH jest uruchamiany na wczesnych etapach różnicowania komórek linii tworzenia szparek i swoją aktywnością prowadzi do tworzenia merystemoidów z komórek macierzystych merystemoidów (MMC) (Lau i wsp., 2014; Wstęp 1.2). MAPKKK18 może stanowić istotny efektor sygnalizacji ABA w regulacji tworzenia szparek w epidermie *Arabidopsis*.

6.4.1 MAPKKK18 reguluje rozwój aparatów szparkowych niezależnie od kaskady YODA-(MKK4/5)/(MKK7/9)-MPK4/MPK6

Ponieważ udowodniono rolę MAPKKK18 w regulacji procesu tworzenia szparek, postanowiono także zbadać, czy kaskada kinaz MAP rozpoczynająca się od MAPKKK18 może komunikować z inną kaskadą kinaz MAP regulującą ten proces – YODA-(MKK4/5)/(MKK7/9)-MPK4/MPK6. W tym celu przeprowadzono analizę struktury epidermy liścieni *Arabidopsis* i zbadano liczbę aparatów szparkowych oraz pozostałych komórek epidermalnych u mutantów *Arabidopsis mkk7* oraz *mkk7mapkkk18*.

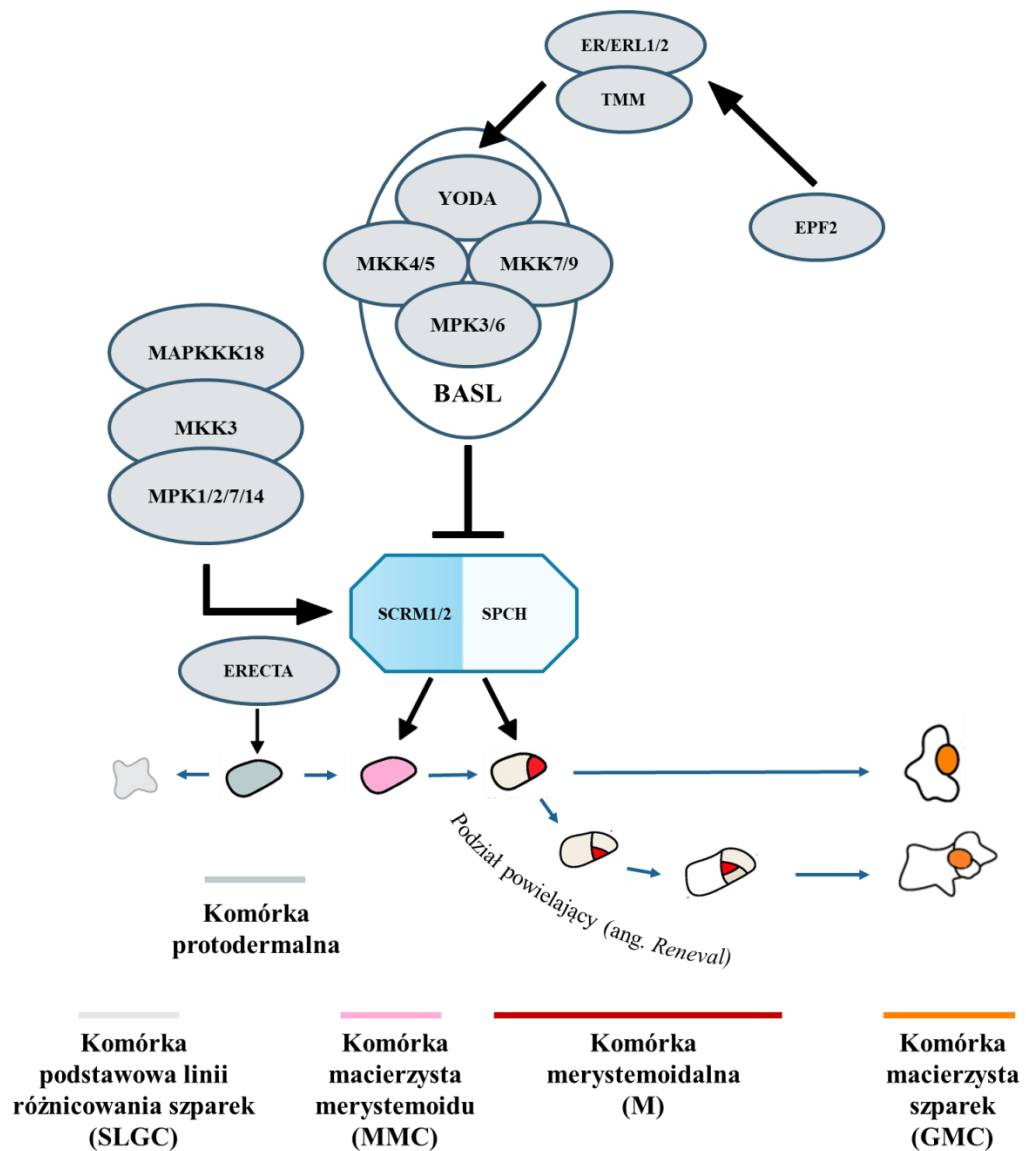
W toku prac zaobserwowano bardzo wyraźne zmiany struktury epidermy linii *mkk7*. Na wczesnych etapach rozwoju epidermy wyłączenie aktywności genu *MKK7* prowadzi do podwyższenia ogólnej liczby komórek epidermalnych, a w szczególności komórek niebędących aparatami szparkowymi (Rys. 18, 19). Jednocześnie na wczesnych etapach rozwoju, w porównaniu z linią WT, u mutantów *mkk7mapkkk18-1* obserwuje się zwiększenie liczby innych komórek epidermy, jednak aż o 30% mniejsze niż dla linii *mkk7*. Również liczba aparatów szparkowych w epidermie linii *mkk7mapkkk18-1* jest większa niż w przypadku linii

WT, jednak jedynie o 4%. Na dalszych etapach rozwoju obserwuje się natomiast więcej komórek epidermy i aparatów szparkowych, niż w linii pojedynczego mutantu *mkk7* i wartość SI niższą niż dla linii *mkk7*. Otrzymane wyniki wskazują, że MAPKKK18 jest pozytywnym regulatorem rozwoju aparatów szparkowych działającym na wczesnym etapie rozwoju szparek, działającym niezależnie od kaskady YODA-(MKK4/5)/(MKK7/9)-MPK4/MPK6. Zebrane wyniki potwierdzają bardzo ważną rolę MKK7 w regulacji rozwoju aparatów szparkowych i wskazują, że MAPKKK18 działa przeciwnie do MKK7 na wczesnych etapach rozwoju szparek.

Wiadomo, że MKK7 jest negatywnym regulatorem rozwoju szparek na wczesnym etapie rozwoju (aktywność czynnika SPCH) i pozytywnym regulatorem na późnych etapach (aktywność czynnika FAMA) (Lampard i wsp, 2009). Zgodnie z tymi danymi, na wczesnych etapach rozwoju epidermy wyłączenie aktywności genu *MKK7* prowadzi do podwyższenia ogólnej liczby komórek epidermalnych, a w szczególności komórek niebędących aparatami szparkowymi. Obserwowane zbliżenie struktury epidermy *mkk7* do linii WT na późniejszych etapach rozwoju może być efektem ograniczenia aktywności czynnika FAMA, co prowadzi do dojrzewania powstałych komórek macierzystych szparek (GMC) i maksymalizacji liczby aparatów szparkowych w epidermie. Wyłączenie aktywności drugiego genu, *MAPKKK18*, prowadzi u *Arabidopsis* do osłabienia opisanego dla *mkk7* fenotypu. Wyłączenie aktywności genu *MAPKKK18* prowadzi do obniżenia liczby aparatów szparkowych, niezależnej od braku aktywności *mkk7*. Wy tłumaczenie tego zjawiska może być następujące. Mutant *mkk7mapkkk18-1* na wczesnych etapach rozwoju w wyniku braku aktywności genu *MAPKKK18* charakteryzuje się mniejszą liczbą komórek macierzystych merystemoidów (MMC). Na późniejszych etapach brak aktywności *MKK7* prowadzi jednak do zwiększenia ostatecznej liczby szparek w epidermie (Rys. 20, 21). Efekt ten jest słabszy w linii podwójnego mutantu *mkk7mapkkk18-1* niż u pojedynczego mutantu *mkk7*. Jednocześnie ogólna liczba komórek epidermalnych jest mniejsza u mutantu podwójnego *mkk7mapkkk18-1*, w porównaniu z linią *mkk7*, co może być efektem mniejszej liczby asymetrycznych podziałów komórek merystemoidalnych niż w przypadku pojedynczego mutantu *mkk7*. Podsumowując, na wczesnym etapie rozwoju wyłączenie aktywności genu *MKK7* prowadzi do zwiększenia ogólnej liczby komórek w epidermie liścieni, a wyłączenie genu *MAPKKK18* do ograniczenia podziałów komórek linii rozwojowej szparek. Obserwowany fenotyp linii *mkk7mapkkk18-1* jest fenotypem pośrednim pomiędzy fenotypami pojedynczych mutantów, tzn. brak aktywności

genu *mapkkk18* hamuje w pewnym stopniu efekty braku aktywności genu *MKK7* w postaci zwiększenia liczby komórek epidermalnych.

MKK7 nie jest jedyną MAPKK będącą elementem kaskady MAP rozpoczynającej się od YODA. Lampard i wsp. w pracy z 2014 r. wskazują, że pary kinaz MKK4-MKK5 oraz MKK7-MKK9 pełnią zamienne funkcje w procesie tworzenia aparatów szparkowych (Lampard i wsp., 2014). Ponieważ w niniejszej pracy nie udokumentowano oddziaływania pomiędzy MAPKKK18 i MKK5/MKK7, pozwala to postawić hipotezę, że MAPKKK18 nie oddziałuje również z kinazami MKK4 i MKK9. Oznaczałoby to, że MAPKKK18 nie oddziałuje z elementami kaskady YODA, która to jest jednym z głównych regulatorów procesu tworzenia aparatów szparkowych. Postawioną hipotezę potwierdza analiza fenotypowa linii podwójnego mutantu *mkk7mapkkk18-1* - obraz epidermy badanej linii wskazuje na przeciwstawne działanie dwóch opisywanych wcześniej kaskad kinaz MAP, rozpoczynających się od MAPKKK18 i YODA. Zebrane dane wskazują, że kinazy MAPKKK18 i MKK7 zdają się mieć przeciwstawną rolę w regulacji podziałów komórek linii różnicowania szparek, gdzie na wczesnym etapie rozwoju MAPKKK18 pełni rolę pozytywnego regulatora, a MKK7 negatywnego regulatora tego procesu. Najprawdopodobniej aktywność MAPKKK18 skupia się na regulacji aktywności czynnika SPCH, odpowiadającego za inicjację przejścia komórek protodermalnych w komórki matczyne merystemoidów. Schemat regulacji aktywności czynnika SPCH przez kaskady MAP przedstawiono na rysunku 24.



Rysunek 24. Schemat procesu powstawania aparatów szparkowych w epidermie z uwzględnieniem MAPKKK18

Kaskada kinaz MAP MAPKKK18-MKK3-MPK1/2/7/14 pozytywnie reguluje proces powstawania aparatów szparkowych prawdopodobnie na etapie aktywności czynnika SPCH, niezależnie od kaskady YODA-MKK4/5/7/9-MPK3/6. Opracowanie własne na podstawie Liu i wsp., 2010.

7. Podsumowanie

Kaskady kinaz MAP tworzą skomplikowane sieci interakcji pomiędzy wieloma ścieżkami sygnalizacyjnymi. Kwas abscysynowy jest głównym fitohormonem związanym z odpowiedzią na stres suszy i do tej pory spośród kinaz MAP zidentyfikowano wiele efektorów sygnalizacji ABA. MAPKKK18 stanowi jednak pierwszą spośród kinaz MAP rozpoczynających kaskadę, którą powiązano z odpowiedzią na ABA. Celem niniejszej pracy było nie tylko opisanie MAPKKK18 jako efektora sygnalizacji ABA, ale również określenie mechanizmów regulacji MAPKKK18.

Aktywność MAPKKK18 reguluje procesy komórkowe powiązane z adaptacją do warunków stresu suszy – znoszenie spoczynku nasion oraz ruchy aparatów szparkowych. Od MAPKKK18 zależy również odpowiednie zagęszczenie aparatów szparkowych w epidermie, co ma istotne znaczenie dla regulacji procesów transpiracji. MAPKKK18 jest aktywowana przez ABA, a MAPKKK18 oddziałuje bezpośrednio z elementami sygnalizacji ABA. Wyniki przedstawione w niniejszej pracy ukazują jak istotny mechanizm regulacji transdukcji sygnału u *Arabidopsis* stanowią zjawiska fosforylacji i defosforylacji. Kaskada kinaz MAP MAPKKK18 rozpoczynająca się od MAPKKK18, w skład której wchodzi również MKK3, może stanowić nie tylko jedną z głównych ścieżek transdukcji sygnału ABA w komórkach roślinnych, ale również moduł w którym krzyżują się różne ścieżki odpowiedzi na warunki stresu. Podsumowując dane zebrane w niniejszej rozprawie, można stwierdzić, że kinaza MAPKKK18 jest zaangażowana w szybką odpowiedź na ABA, jak i w regulację procesów rozwojowych kontrolowanych przez ścieżki sygnalizacyjne ABA.

Wyniki przedstawione w tej pracy stanowią wkład w poszerzenie wiedzy na temat funkcjonowania kaskad kinaz MAP w transdukcji sygnału ABA. Szczegółowe poznanie ścieżek sygnalizacji ABA, wzajemnych wewnątrz nich oraz mechanizmów ich interakcji pozwoli w przyszłości na lepsze poznanie molekularnych podstaw odpowiedzi na stres u roślin.

Wykaz rycin

Rysunek 1. Schemat działania rdzeniowej sygnalizacji ABA

Rysunek 2. Wpływ braku aktywności czynników transkrypcyjnych SPCH, MUTE, FAMA na proces tworzenia aparatów szparkowych

Rysunek 3. Proces tworzenia aparatów szparkowych

Rysunek 4. Uproszczony schemat zamykania aparatów szparkowych indukowanego przez ABA

Rysunek 5. Oddziaływania pomiędzy kinazami MKK i MAPK u Arabidopsis

Rysunek 6. Wektor pENTR/SD/D-TOPO

Rysunek 7. Wektory serii pSAT

Rysunek 8. Wektor pEarleyGate103

Rysunek 9. Aktywność kinazowa MAPKKK18 jest indukowana specyficznie przez ABA

Rysunek 10. MAPKKK18 reguluje proces kiełkowania nasion

Rysunek 11. MAPKKK18 reguluje proces zamykania aparatów szparkowych

Rysunek 12. Lokalizacja subkomórkowa MAPKKK18

Rysunek 13. MAPKKK18 zmienia lokalizację subkomórkową w wyniku traktowania egzogennym ABA

Rysunek 14. Lokalizacja MAPKKK18 po traktowaniu protoplastów egzogennym ABA

Rysunek 15. Leptomycyna B hamuje eksport MAPKKK18 z jądra komórkowego do cytoplazmy

Rysunek 16. MAPKKK18 oddziałuje specyficznie z fosfatazą białkową ABI1

Rysunek 17. Analiza oddziaływań pomiędzy MAPKKK18 i SnRK2.6/OST1 z wykorzystaniem techniki BiFC

Rysunek 18. Aktywność genu *MAPKKK18* wpływa na zagęszczenie aparatów szparkowych w epidermie 6-dniowych liści Arabidopsis

Rysunek 19. MAPKKK18 reguluje proces tworzenia aparatów szparkowych w epidermie 6-dniowych liścieni Arabidopsis

Rysunek 20. Aktywność genu *MAPKKK18* wpływa na zagęszczenie aparatów szparkowych w epidermie 10-dniowych liścieni Arabidopsis

Rysunek 21. MAPKKK18 reguluje proces tworzenia aparatów szparkowych w epidermie 10-dniowych liścieni Arabidopsis

Rysunek 22. MAPKKK18 oddziałuje z MKK3 i nie oddziałuje z MKK5 i MKK7

Rysunek 23. Schemat działania rdzeniowej sygnalizacji ABA, uwzględniający istnienie kaskady MAPKKK18-MKK3-MPK1/2/7/14

Rysunek 24. Schemat procesu powstawania aparatów szparkowych w epidermie z uwzględnieniem MAPKKK18

Literatura

- Abrash, E.B., Bergmann, D.C., 2010. Regional specification of stomatal production by the putative ligand CHALLAH. *Development* 137, 447–55
- Adachi, M., Fukuda, M., Nishida, E., 1999. Two co-existing mechanisms for nuclear import of MAP kinase: passive diffusion of a monomer and active transport of a dimer. *The EMBO Journal* 18, 5347–58
- Adachi, M., Fukuda, M., Nishida, E., 2000. Nuclear export of MAP kinase (ERK) involves a MAP kinase kinase (MEK)-dependent active transport mechanism. *The Journal of Cell Biology* 148, 849–56
- Albert, R., Acharya, B.R., Jeon, B.W., Zanudo, J.G.T., Zhu, M., Osman, K., Assmann, S.M., 2017. A new discrete dynamic model of ABA-induced stomatal closure predicts key feedback loops. *PLOS Biology* 15, e2003451
- Anderson, J.P., Badruzsaufari, E., Schenk, P.M., Manners, J.M., Desmond, O.J., Ehlert, C., Maclean, D.J., Ebert, P.R., Kazan, K., 2004. Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in Arabidopsis. *The Plant Cell* 16, 3460–79
- Andreasson, E., Ellis, B., 2010. Convergence and specificity in the Arabidopsis MAPK nexus. *Trends In Plant Science*, 15(2), 106-113
- Andreasson, E., Jenkins, T., Brodersen, P., Thorgrimsen, S., Petersen, N. H. T., Zhu, S., Qiu, J., Micheelsen, P., Rocher, A., Petersen, M., Newman, M., Bjørn Nielsen, H., Hirt, H., Somssich, I., Mattsson, O. and Mundy, J., 2005. The MAP kinase substrate MKS1 is a regulator of plant defense responses. *The EMBO Journal*, 24(14), 2579-2589
- Antoni, R., Gonzalez-Guzman, M., Rodriguez, L., Rodrigues, A., Pizzio, G.A., Rodriguez, P.L., 2012. Selective inhibition of clade A phosphatases type 2C by PYR/PYL/RCAR abscisic acid receptors. *Plant Physiology* 158, 970–80
- Arend, M., Schnitzler, J.-P., Ehlting, B., Hansch, R., Lange, T., Rennenberg, H., Himmelbach, A., Grill, E., Fromm, J., 2009. Expression of the Arabidopsis mutant ABI1 gene alters abscisic acid sensitivity, stomatal development, and growth morphology in gray poplars. *Plant Physiology* 151, 2110–9
- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willman, M.R., Chiu, W.L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Asubel, F.M., and Sheen, J., 2002. MAP kinase signaling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature* 415 977–983

- Assmann, S.M., Jegla, T., 2016. Guard cell sensory systems: recent insights on stomatal responses to light, abscisic acid, and CO₂. *Current Opinion in Plant Biology* 33, 157–167
- Beguerisse-Diaz, M., Desikan, R., Barahona, M., 2016. Linear models of activation cascades: analytical solutions and coarse-graining of delayed signal transduction. *Journal of the Royal Society Interface* 13
- Ben-Levy, R., Hooper, S., Wilson, R., Paterson, H.F., Marshall, C.J., 1998. Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2. *Current Biology* 8, 1049–57
- Benhamman, R., Bai, F., Drory, S. B., Loubert-Hudon, A., Ellis, B. and Matton, D. P., 2017. The Arabidopsis Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 20 (MKKK20) Acts Upstream of MKK3 and MPK18 in Two Separate Signaling Pathways Involved in Root Microtubule Functions. *Frontiers In Plant Science*, 8
- Bergmann, D.C., Lukowitz, W., Somerville, C.R., 2004. Stomatal development and pattern controlled by a MAPKK kinase. *Science* 304, 1494–7
- Berriri, S., Garcia, A.V., Frey, N. Frei dit, Rozhon, W., Pateyron, S., Leonhardt, N., Montillet, J.-L., Leung, J., Hirt, H., Colcombet, J., 2012. Constitutively active mitogen-activated protein kinase versions reveal functions of Arabidopsis MPK4 in pathogen defense signaling. *The Plant Cell* 24, 4281–93
- Bhaskara, G., Nguyen, T., & Verslues, P. 2012. Unique Drought Resistance Functions of the Highly ABA-Induced Clade A Protein Phosphatase 2Cs. *Plant Physiology*, 160(1), 379-395
- Boudolf, V., Lammens, T., Boruc, J., Van Leene, J., Van Den Daele, H., Maes, S., Van Isterdael, G., Russinova, E., Kondorosi, E., Witters, E., De Jaeger, G., Inze, D., De Veylder, L., 2009. CDKB1;1 forms a functional complex with CYCA2;3 to suppress endocycle onset. *Plant Physiology* 150, 1482–93
- Brandt, B., Munemasa, S., Wang, C., Nguyen, D., Yong, T., Yang, P.G., Poretsky, E., Belknap, T.F., Waadt, R., Aleman, F., Schroeder, J.I., 2015. Calcium specificity signaling mechanisms in abscisic acid signal transduction in Arabidopsis guard cells. *eLife* 4:e03599
- Brandt, B., Brodsky, D. E., Xue, S., Negi, J., Iba, K., Kangasjarvi, J., Ghassemian, M., Stephan, A. B., Hu, H. and Schroeder, J. I., 2012. Reconstitution of abscisic acid activation of SLAC1 anion channel by CPK6 and OST1 kinases and branched ABI1 PP2C

- phosphatase action. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 109(26), 10593-10598
- Brock, A.K., Willmann, R., Kolb, D., Grefen, L., Lajunen, H.M., Bethke, G., Lee, J., Nurnberger, T., Gust, A.A., 2010. The Arabidopsis mitogen-activated protein kinase phosphatase PP2C5 affects seed germination, stomatal aperture, and abscisic acid-inducible gene expression. *Plant Physiology* 153, 1098–111
- Brunet, A., Kanai, F., Stehn, J., Xu, J., Sarbassova, D., Frangioni, J.V., Dalal, S.N., DeCaprio, J.A., Greenberg, M.E., Yaffe, M.B., 2002. 14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport. *The Journal of Cell Biology* 156, 817–28
- Cao, F., Yoshioka, K., & Desveaux, D., 2011. The roles of ABA in plant–pathogen interactions. *Journal Of Plant Research*, 124(4), 489-499
- Çakır, B., Kılıçkaya, O., 2015. Mitogen-activated protein kinase cascades in *Vitis vinifera*. *Frontiers In Plant Science*, 6, 566
- Cargnello, M., Roux, P., 2011. Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, 75(1), 50-83
- Champion A., Picaud A., Henry Y., 2004. Reassessing the MAP3K and MAP4K relationships. *Trends in Plant Science*. 9, 123–129
- Chico, J.-M., Fernandez-Barbero, G., Chini, A., Fernandez-Calvo, P., Diez-Diaz, M., Solano, R., 2014. Repression of Jasmonate-Dependent Defenses by Shade Involves Differential Regulation of Protein Stability of MYC Transcription Factors and Their JAZ Repressors in Arabidopsis. *The Plant Cell* 26, 1967–1980
- Choi, S.-W., Lee, S.-B., Na, Y.-J., Jeung, S.-G., Kim, S.Y., 2017. Arabidopsis MAP3K16 and Other Salt-Inducible MAP3Ks Regulate ABA Response Redundantly. *Molecules and Cells* 40, 230–242
- Cieśla, A., *Rozprawa doktorska*. Charakterystyka funkcjonalna kompleksów białkowych fosfataz ABI1 i ABI2 u *Arabidopsis thaliana*, Poznań 2014.
- Colcombet, J., Hirt, H., 2008. Arabidopsis MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *The Biochemical Journal* 413, 217–26
- Cour, T. la, Kierner, L., Molgaard, A., Gupta, R., Skriver, K., Brunak, S., 2004. Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Engineering, Design & Selection* 17, 527–36

- Craig, E., Zhang, Z.-K., Davies, K.P., Kalpana, G.V., 2002. A masked NES in INI1/hSNF5 mediates hCRM1-dependent nuclear export: implications for tumorigenesis. *The EMBO Journal* 21, 31–42
- Cutler, S.R., Rodriguez, P.L., Finkelstein, R.R., Abrams, S.R., 2010. Absciscic acid: emergence of a core signaling network. *Annual Review of Plant Biology* 61, 651–79
- Danquah, A., Zelicourt, A. de, Boudsocq, M., Neubauer, J., Frei Dit Frey, N., Leonhardt, N., Pateyron, S., Gwinner, F., Tamby, J.-P., Ortiz-Masia, D., Marcote, M.J., Hirt, H., Colcombet, J., 2015. Identification and characterization of an ABA-activated MAP kinase cascade in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 82, 232–44
- Des Marais, D.L., Auchincloss, L.C., Sukamtoh, E., McKay, J.K., Logan, T., Richards, J.H., Juenger, T.E., 2014. Variation in MPK12 affects water use efficiency in *Arabidopsis* and reveals a pleiotropic link between guard cell size and ABA response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 2836–41
- Dóczi, R., Brader, G., Pettko-Szandtner, A., Rajh, I., Djamei, A., Pitzschke, A., Teige, M., Hirt, H., 2007. The *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinase MKK3 is upstream of group C mitogen-activated protein kinases and participates in pathogen signaling. *The Plant Cell* 19, 3266–79
- Does, D. Van der, Leon-Reyes, A., Koornneef, A., Van Verk, M.C., Rodenburg, N., Pauwels, L., Goossens, A., Korbes, A.P., Memelink, J., Ritsema, T., Van Wees, S.C.M., Pieterse, C.M.J., 2013. Salicylic acid suppresses jasmonic acid signaling downstream of SCFCOI1-JAZ by targeting GCC promoter motifs via transcription factor ORA59. *The Plant Cell* 25, 744–61
- Domagalska, M.A., Sarnowska, E., Nagy, F., Davis, S.J., 2010. Genetic analyses of interactions among gibberellin, abscisic acid, and brassinosteroids in the control of flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *PLOS One* 5, e14012
- Dong, J., MacAlister, C.A., Bergmann, D.C., 2009. BASL controls asymmetric cell division in *Arabidopsis*. *Cell* 137, 1320–30
- Dow, G.J., Berry, J.A., Bergmann, D.C., 2014. The physiological importance of developmental mechanisms that enforce proper stomatal spacing in *Arabidopsis thaliana*. *The New Phytologist* 201, 1205–17
- Earley, K.W., Haag, J.R., Pontes, O., Opper, K., Juehne, T., Song, K., Pikaard, C.S., 2006. Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *The Plant Journal* 45, 616–29

- Engel, K., Kotlyarov, A., Gaestel, M., 1998. Leptomycin B-sensitive nuclear export of MAPKAP kinase 2 is regulated by phosphorylation. *The EMBO Journal* 17, 3363–71
- Fan, J., Hill, L., Crooks, C., Doerner, P., Lamb, C., 2009. Absciscic acid has a key role in modulating diverse plant-pathogen interactions. *Plant Physiology* 150, 1750–61
- Feilner, T., Hultschig, C., Lee, J., Meyer, S., Immink, R. G. H., Koenig, A., Possling, A., Seitz, H., Beveridge, A., Scheel, D., Cahill, D. J., Lehrach, H., Kreutzberger, J., Kersten, B., 2005. High Throughput Identification of Potential Arabidopsis Mitogen-activated Protein Kinases Substrates. *Molecular & Cellular Proteomics*, 4(10), 1558-1568
- Fierro, A.C., Leroux, O., De Coninck, B., Cammue, B.P.A., Marchal, K., Prinsen, E., Van Der Straeten, D., Vandenbussche, F., 2015. Ultraviolet-B radiation stimulates downward leaf curling in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiology and Biochemistry* 93, 9–17
- Finkelstein, R., Gampala, S., Rock, C., 2002. Absciscic Acid Signaling in Seeds and Seedlings. *The Plant Cell*, 14(suppl 1), S15-S45
- Finkelstein, R., 2013. Absciscic Acid synthesis and response. *The Arabidopsis Book* 11, e0166
- Franks, P.J., Farquhar, G.D., 2001. The effect of exogenous absciscic acid on stomatal development, stomatal mechanics, and leaf gas exchange in Tradescantia virginiana. *Plant Physiology* 125, 935–42
- Fuchs, S., Grill, E., Meskiene, I., Schweighofer, A., 2012. Type 2C protein phosphatases in plants. *FEBS Journal*, 280(2), 681-693
- Fujii, H., Chinnusamy, V., Rodrigues, A., Rubio, S., Antoni, R., Park, S., Cutler, S. R., Sheen, J., Rodriguez, P. L. and Zhu, J., 2009. In vitro reconstitution of an absciscic acid signalling pathway. *Nature* 462, 660-664
- Fujita, Y., Nakashima, K., Yoshida, T., Katagiri, T., Kidokoro, S., Kanamori, N., Umezawa, T., Fujita, M., Maruyama, K., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Nakasone, S., Yamada, K., Ito, T., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., 2009. Three SnRK2 protein kinases are the main positive regulators of absciscic acid signaling in response to water stress in Arabidopsis. *Plant & Cell Physiology* 50, 2123–32
- Furuno, T., Hirashima, N., Onizawa, S., Sagiya, N., Nakanishi, M., 2001. Nuclear shuttling of mitogen-activated protein (MAP) kinase (extracellular signal-regulated kinase (ERK) 2) was dynamically controlled by MAP/ERK kinase after antigen stimulation in RBL-2H3 cells. *Journal of Immunology* 166, 4416–21
- Geiger, D., Maierhofer, T., Al-Rasheid, K.A.S., Scherzer, S., Mumm, P., Liese, A., Ache, P., Wellmann, C., Marten, I., Grill, E., Romeis, T., Hedrich, R., 2011. Stomatal closure

- by fast abscisic acid signaling is mediated by the guard cell anion channel SLAH3 and the receptor RCAR1. *Science Signaling* 4:ra32
- Geiger, D., Scherzer, S., Mumm, P., Stange, A., Marten, I., Bauer, H., Ache, P., Matschi, S., Liese, A., Al-Rasheid, K. A. S., Romeis, T. and Hedrich, R., 2009. Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 106(50), 21425-21430
- Gonzalez-Guzman, M., Pizzio, G.A., Antoni, R., Vera-Sirera, F., Merilo, E., Bassel, G.W., Fernandez, M.A., Holdsworth, M.J., Perez-Amador, M.A., Kollist, H., Rodriguez, P.L., 2012. Arabidopsis PYR/PYL/RCAR receptors play a major role in quantitative regulation of stomatal aperture and transcriptional response to abscisic acid. *The Plant Cell* 24, 2483–96
- Gosti, F., Beaudoin, N., Serizet, C., Webb, A.A., Vartanian, N., Giraudat, J., 1999. ABI1 protein phosphatase 2C is a negative regulator of abscisic acid signaling. *Plant Cell* 11, 1897-910
- Grondin, A., Rodrigues, O., Verdoucq, L., Merlot, S., Leonhardt, N., Maurel, C., 2015. Aquaporins Contribute to ABA-Triggered Stomatal Closure through OST1-Mediated Phosphorylation. *The Plant Cell* 27, 1945–54
- Groszmann, M., Osborn, H.L., Evans, J.R., 2017. Carbon dioxide and water transport through plant aquaporins. *Plant, Cell & Environment* 40, 938–961
- Guan, Y., Lu, J., Xu, J., McClure, B., & Zhang, S., 2014. Two Mitogen-Activated Protein Kinases, MPK3 and MPK6, Are Required for Funicular Guidance of Pollen Tubes in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 165(2), 528-533
- Gudesblat, G.E., Iusem, N.D., Morris, P.C., 2007. Arabidopsis MPK3, a Key Signalling Intermediate in Stomatal Function. *Plant Signaling & Behavior* 2, 271–2
- Hachez, C., Ohashi-Ito, K., Dong, J., Bergmann, D.C., 2011a. Differentiation of Arabidopsis guard cells: analysis of the networks incorporating the basic helix-loop-helix transcription factor, FAMA. *Plant Physiology* 155, 1458–72
- Hahn, A., Harter, K., 2009. Mitogen-Activated Protein Kinase Cascades and Ethylene: Signaling, Biosynthesis, or Both?. *Plant Physiology*, 149(3), 1207-1210
- Hamel, L., Nicole, M., Duplessis, S., & Ellis, B., 2012. Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling in Plant-Interacting Fungi: Distinct Messages from Conserved Messengers. *The Plant Cell*, 24(4), 1327-1351
- Hamel, L., Nicole, M., Sritubtim, S., Morency, M., Ellis, M., Ehltting, J., Beaudoin, N., Barbazuk, B., Klessig, D., Lee, J., Martin, G., Mundy, J., Ohashi, Y., Scheel, D., Sheen,

- J., Xing, T., Zhang, S., Seguin, A., Ellis, B. E., 2006. Ancient signals: comparative genomics of plant MAPK and MAPKK gene families. *Trends In Plant Science*, 11(4), 192-198
- Hara, K., Kajita, R., Torii, K.U., Bergmann, D.C., Kakimoto, T., 2007. The secretory peptide gene EPF1 enforces the stomatal one-cell-spacing rule. *Genes & Development* 21, 1720–5
- Haworth, M., Gallagher, A., Elliott-Kingston, C., Raschi, A., Marandola, D., McElwain, J.C., 2010. Stomatal index responses of *Agrostis canina* to CO₂ and sulphur dioxide: implications for palaeo-[CO₂] using the stomatal proxy. *The New Phytologist* 188, 845–55
- Heerklotz, D., Doring, P., Bonzelius, F., Winkelhaus, S., Nover, L., 2001. The balance of nuclear import and export determines the intracellular distribution and function of tomato heat stress transcription factor HsfA2. *Molecular and Cellular Biology* 21, 1759–68
- Hetherington, A.M., Brownlee, C., 2004. The generation of Ca(2+) signals in plants. *Annual Review of Plant Biology* 55, 401–27
- Hooper, C.M., Castleden, I.R., Tanz, S.K., Aryamanesh, N., Millar, A.H., 2017. SUBA4: the interactive data analysis centre for Arabidopsis subcellular protein locations. *Nucleic Acids Research* 45, D1064–D1074
- Hord, C.L.H., Sun, Y.-J., Pillitteri, L.J., Torii, K.U., Wang, H., Zhang, S., Ma, H., 2008. Regulation of Arabidopsis early anther development by the mitogen-activated protein kinases, MPK3 and MPK6, and the ERECTA and related receptor-like kinases. *Molecular Plant* 1, 645–58
- Hosy, E., Vavasseur, A., Mouline, K., Dreyer, I., Gaymard, F., Poree, F., Boucherez, J., Lebaudy, A., Bouchez, D., Very, A.-A., Simonneau, T., Thibaud, J.-B., Sentenac, H., 2003. The Arabidopsis outward K⁺ channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 5549–54
- Hoth, S., Morgante, M., Sanchez, J.-P., Hanafey, M.K., Tingey, S.V., Chua, N.-H., 2002. Genome-wide gene expression profiling in Arabidopsis thaliana reveals new targets of abscisic acid and largely impaired gene regulation in the abi1-1 mutant. *Journal of Cell Science* 115, 4891–900
- Hunt, L., Gray, J.E., 2009. The signaling peptide EPF2 controls asymmetric cell divisions during stomatal development. *Current Biology* 19, 864–9

- Ichimura, K., Shinozaki, K., Tena, G., Sheen, J., Henry, Y., Champion, A., Kreis, M., Zhang, S., Hirt, H., Wilson, C., Heberle-Bors, E., Ellis, B. E., Morris, P. C., Innes, R. W., Ecker, J. R., Scheel, D., Klessig, D. F., Machida, Y., Mundy, J., Ohashi, Y. and Walker, J. C. Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature., 2002. *Trends in Plant Science* 7, 301–8
- Ichimura, K., Mizoguchi, T., Yoshida, R., Yuasa, T., Shinozaki, K., 2000. Various abiotic stresses rapidly activate Arabidopsis MAP kinases ATMPK4 and ATMPK6. *The Plant Journal*, 24(5), 655-665
- Iida, S., Ikeda, M., Amano, M., Sakayama, H., Kadono, Y., Kosuge, K., 2016. Loss of heterophylly in aquatic plants: not ABA-mediated stress but exogenous ABA treatment induces stomatal leaves in *Potamogeton perfoliatus*. *Journal of Plant Research* 129, 853–862
- Izaurrealde, E., Lewis, J., Gamberi, C., Jarmolowski, A., McGuigan, C., & Mattaj, I., 1995. A cap-binding protein complex mediating U snRNA export. *Nature*, 376(6542), 709-712
- Jaaro, H., Rubinfeld, H., Hanoch, T., Seger, R., 1997. Nuclear translocation of mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1) in response to mitogenic stimulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 3742–7
- Jagodzík, P., *Praca magisterska*. Identyfikacja potencjalnych elementów kaskady sygnałowej z udziałem kinazy MAPKKK18 *Arabidopsis thaliana* przy użyciu systemu dwuhybrydowego., Poznań 2011
- Jalmi, S.K., Sinha, A.K., 2015. ROS mediated MAPK signaling in abiotic and biotic stress-striking similarities and differences. *Frontiers in Plant Science* 6, 769
- Jammes, F., Song, C., Shin, D., Munemasa, S., Takeda, K., Gu, D., Cho, D., Lee, S., Giordo, R., Sritubtim, S., Leonhardt, N., Ellis, B.E., Murata, Y., Kwak, J.M., 2009. MAP kinases MPK9 and MPK12 are preferentially expressed in guard cells and positively regulate ROS-mediated ABA signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 20520–5
- Jia, W., Li, B., Li, S., Liang, Y., Wu, X., Ma, M., Wang, J., Gao, J., Cai, Y., Zhang, Y., Wang, Y., Li, J. and Wang, Y., 2016. Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade MKK7-MPK6 Plays Important Roles in Plant Development and Regulates Shoot Branching by Phosphorylating PIN1 in *Arabidopsis*. *PLOS Biology*, 14(9), e1002550

- Jin, H., Axtell, M., Dahlbeck, D., Ekwenna, O., Zhang, S., Staskawicz, B., & Baker, B., 2002. NPK1, an MEKK1-like Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase, Regulates Innate Immunity and Development in Plants. *Developmental Cell*, 3(2), 291-297
- Joshi-Saha, A., Valon, C., Leung, J., 2011. Absciscic acid signal off the STARting block. *Molecular Plant* 4, 562–80
- Kanaoka, M.M., Pillitteri, L.J., Fujii, H., Yoshida, Y., Bogenschutz, N.L., Takabayashi, J., Zhu, J.-K., Torii, K.U., 2008. SCREAM/ICE1 and SCREAM2 specify three cell-state transitional steps leading to arabidopsis stomatal differentiation. *The Plant Cell* 20, 1775–85
- Kang, J., Yim, S., Choi, H., Kim, A., Lee, K.P., Lopez-Molina, L., Martinoia, E., Lee, Y., 2015. Absciscic acid transporters cooperate to control seed germination. *Nature Communications* 6, 8113
- Keshet, Y., Seger, R., 2010. The MAP Kinase Signaling Cascades: A System of Hundreds of Components Regulates a Diverse Array of Physiological Functions. *MAP Kinase Signaling Protocols*, 3-38
- Kim, D., Ntui, V., Xiong, L., 2016. Arabidopsis YAK1 regulates absciscic acid response and drought resistance. *FEBS Letters*, 590(14), 2201-2209
- Kline, K.G., Barrett-Wilt, G.A., Sussman, M.R., 2010. In planta changes in protein phosphorylation induced by the plant hormone absciscic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 15986–91
- Kobayashi, T., Kamitani, W., Zhang, G., Watanabe, M., Tomonaga, K., Ikuta, K., 2001. Borna disease virus nucleoprotein requires both nuclear localization and export activities for viral nucleocytoplasmic shuttling. *Journal of Virology* 75, 3404–12
- Kollist, H., Nuhkat, M., Roelfsema, M.R.G., 2014. Closing gaps: linking elements that control stomatal movement. *The New Phytologist* 203, 44–62
- Kondo, T., Kajita, R., Miyazaki, A., Hokoyama, M., Nakamura-Miura, T., Mizuno, S., Masuda, Y., Irie, K., Tanaka, Y., Takada, S., Kakimoto, T., Sakagami, Y., 2010. Stomatal density is controlled by a mesophyll-derived signaling molecule. *Plant & Cell Physiology* 51, 1–8
- Kong, L., Cheng, J., Zhu, Y., Ding, Y., Meng, J., Chen, Z., Xie, Q., Guo, Y., Li, J., Yang, S., Gong, Z., 2015. Degradation of the ABA co-receptor ABI1 by PUB12/13 U-box E3 ligases. *Nature Communications* 6, 8630
- Kong, Q., Qu, N., Gao, M., Zhang, Z., Ding, X., Yang, F., Li, Y., Dong, O. X., Chen, S., Li, X., Zhang, Y., 2012. The MEKK1-MKK1/MKK2-MPK4 Kinase Cascade Negatively

- Regulates Immunity Mediated by a Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 24(5)
- Koornneef, A., Pieterse, C. 2008. Cross Talk in Defense Signaling. *Plant Physiology* 146(3), 839-844
- Krichevsky, A., Kozlovsky, S.V., Gafni, Y., Citovsky, V., 2006. Nuclear import and export of plant virus proteins and genomes. *Molecular Plant Pathology* 7, 131–46
- Kudo, N., Wolff, B., Sekimoto, T., Schreiner, E.P., Yoneda, Y., Yanagida, M., Horinouchi, S., Yoshida, M., 1998. Leptomycin B inhibition of signal-mediated nuclear export by direct binding to CRM1. *Experimental Cell Research* 242, 540–7
- Kuge, S., Arita, M., Murayama, A., Maeta, K., Izawa, S., Inoue, Y., Nomoto, A., 2001. Regulation of the yeast Yap1p nuclear export signal is mediated by redox signal-induced reversible disulfide bond formation. *Molecular and Cellular Biology* 21, 6139–50
- Kuhn, J., Boisson-Dernier A., Dizon M.B., Maktabi M.H., Schroeder J.I., 2005. The Protein Phosphatase AtPP2CA Negatively Regulates Absciscic Acid Signal Transduction in Arabidopsis, and Effects of abh1 on AtPP2CA mRNA. *Plant Physiology*, 140(1), 127-139
- Kulik, A., Wawer, I., Krzywinska, E., Bucholc, M., Dobrowolska, G., 2011. SnRK2 protein kinases–key regulators of plant response to abiotic stresses. *Omics : a Journal of Integrative Biology* 15, 859–72
- Kumar, K., Sinha A.K, 2014. Genome-wide transcriptome modulation in rice transgenic lines expressing engineered mitogen activated protein kinase kinase 6. *Plant Signaling and Behavior* 9: e28502
- Lai, L.B., Nadeau, J.A., Lucas, J., Lee, E.-K., Nakagawa, T., Zhao, L., Geisler, M., Sack, F.D., 2005. The Arabidopsis R2R3 MYB proteins FOUR LIPS and MYB88 restrict divisions late in the stomatal cell lineage. *The Plant Cell* 17, 2754–67
- Lake, J.A., Woodward, F.I., Quick, W.P., 2002. Long-distance CO(2) signalling in plants. *Journal of Experimental Botany* 53, 183–93
- Lampard, G.R., Lukowitz, W., Ellis, B.E., Bergmann, D.C., 2009. Novel and expanded roles for MAPK signaling in Arabidopsis stomatal cell fate revealed by cell type-specific manipulations. *The Plant Cell* 21, 3506–17
- Lampard, G.R., Wengier, D.L., Bergmann, D.C., 2014. Manipulation of mitogen-activated protein kinase kinase signaling in the Arabidopsis stomatal lineage reveals motifs that contribute to protein localization and signaling specificity. *The Plant Cell* 26, 3358–71

- Lau, O.S., Davies, K.A., Chang, J., Adrian, J., Rowe, M.H., Ballenger, C.E., Bergmann, D.C., 2014. Direct roles of SPEECHLESS in the specification of stomatal self-renewing cells. *Science* 345, 1605–9
- Lee, J.S., Kuroha, T., Hnilova, M., Khatayevich, D., Kanaoka, M.M., McAbee, J.M., Sarikaya, M., Tamerler, C., Torii, K.U., 2012a. Direct interaction of ligand-receptor pairs specifying stomatal patterning. *Genes & Development* 26, 126–36
- Lee J.S., Huh K.W., Bhargava A., Ellis B.E, 2008. Comprehensive analysis of protein-protein interactions between Arabidopsis MAPKs and MAPK kinases helps define potential MAPK signalling modules. *Plant Signaling and Behavior* 3: 1037–1041
- Lee, S., Seo, P.J., Lee, H.-J., Park, C.-M., 2012b. A NAC transcription factor NTL4 promotes reactive oxygen species production during drought-induced leaf senescence in Arabidopsis. *The Plant Journal* 70, 831–44
- Leissing, F., Nomoto, M., Bocola, M., Schwaneberg, U., Tada, Y., Conrath, U., Beckers, G., 2016. Substrate thiophosphorylation by Arabidopsis mitogen-activated protein kinases. *BMC Plant Biology*, 16(1)
- Leonhardt, N., Kwak, J.M., Robert, N., Waner, D., Leonhardt, G., Schroeder, J.I., 2004. Microarray expression analyses of Arabidopsis guard cells and isolation of a recessive abscisic acid hypersensitive protein phosphatase 2C mutant. *The Plant Cell* 16, 596–615
- Leung, J., Orfanidi, S., Cheddor, F., Mészáros, T., Bolte, S., Mizoguchi, T., Shinozaki, K., Giraudat, J., Bögre, L., 2006. Antagonistic interaction between MAP kinase and protein phosphatase 2C in stress recovery. *Plant Science* 171, 596–606
- Li, K., Yang, F., Miao, Y., Song, C.-P., 2017. Absciscic acid signaling is involved in regulating the mitogen-activated protein kinase cascade module, AIK1-MKK5-MPK6. *Plant Signaling & Behavior* 12:e1321188
- Li, Y., Cai, H., Liu, P., Wang, C., Gao, H., Wu, C., Yan, K., Zhang, S., Huang, J., Zheng, C., 2017. Arabidopsis MAPKKK18 positively regulates drought stress resistance via downstream MAPKK3. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 484(2), 292-297
- Li, Y., Yamakita, Y., Krug, R.M., 1998. Regulation of a nuclear export signal by an adjacent inhibitory sequence: the effector domain of the influenza virus NS1 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 4864–9

- Liang, L., Li, F., Bao, A., Zhang, M., Chung, K.F., Zhou, X., 2013. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in ovalbumin and ozone-induced mouse model of asthma. *Respirology* 18 Suppl 3, 20–9
- Lim, C.W., Baek, W., Jung, J., Kim, J.-H., Lee, S.C., 2015. Function of ABA in Stomatal Defense against Biotic and Drought Stresses. *International Journal of Molecular Sciences* 16, 15251–70
- Lim, P.O., Kim, H.J., Nam, H.G., 2007. Leaf senescence. *Annual Review of Plant Biology* 58, 115–36
- Liu, Y., Bergervoet, J. H. W., De Vos, C. H. R., Hilhorst, H. W. M., Kraak, H. L., Karssen, C. M. and Bino, R. J., 1994. Nuclear Replication Activities During Imbibition Of Absciscic Acid- And Gibberellin-Deficient Tomato (*Lycopersicon Esculentum* Mill.) Seeds. *Planta* 194 (3): 368-373
- Liu, S.-J., Xu, H.-H., Wang, W.-Q., Li, N., Wang, W.-P., Moller, I.M., Song, S.-Q., 2015. A proteomic analysis of rice seed germination as affected by high temperature and ABA treatment. *Physiologia Plantarum* 154, 142–61
- Lu, Y., Sasaki, Y., Li, X., Mori, I.C., Matsuura, T., Hirayama, T., Sato, T., Yamaguchi, J., 2015. ABI1 regulates carbon/nitrogen-nutrient signal transduction independent of ABA biosynthesis and canonical ABA signalling pathways in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* 66, 2763–71
- Ludwików, A., 2015. Targeting proteins for proteasomal degradation - a new function of Arabidopsis ABI1 protein phosphatase 2C. *Frontiers in Plant Science* 6, 310
- Ludwików, A., Kierzek, D., Gallois, P., Zeef, L., Sadowski, J., 2009. Gene expression profiling of ozone-treated Arabidopsis abi1td insertional mutant: protein phosphatase 2C ABI1 modulates biosynthesis ratio of ABA and ethylene. *Planta* 230, 1003–17
- Lumba, S., Toh, S., Handfield, L.-F., Swan, M., Liu, R., Youn, J.-Y., Cutler, S.R., Subramaniam, R., Provart, N., Moses, A., Desveaux, D., McCourt, P., 2014. A mesoscale abscisic acid hormone interactome reveals a dynamic signaling landscape in Arabidopsis. *Developmental Cell* 29, 360–72
- Ma, Y., Szostkiewicz, I., Korte, A., Moes, D., Yang, Y., Christmann, A., & Grill, E., 2009. Regulators of PP2C Phosphatase Activity Function as Absciscic Acid Sensors. *Science* 324, 1064-1068
- Maierhofer, T., Diekmann, M., Offenborn, J. N., Lind, C., Bauer, H., Hashimoto, K., S. Al-Rasheid, K. A., Luan, S., Kudla, J., Geiger, D. and Hedrich, R., 2014. Site- and kinase-

- specific phosphorylation-mediated activation of SLAC1, a guard cell anion channel stimulated by abscisic acid. *Science Signaling*, 7(342), ra86-ra86
- Matsuoka, D., Yasufuku, T., Furuya, T., Nanmori, T., 2015. An abscisic acid inducible Arabidopsis MAPKKK, MAPKKK18 regulates leaf senescence via its kinase activity. *Plant Molecular Biology* 87, 565–75
- McKinsey, T.A., Zhang, C.L., Olson, E.N., 2001. Identification of a signal-responsive nuclear export sequence in class II histone deacetylases. *Molecular and Cellular Biology* 21, 6312–21
- Meier, I., Brkljacic, J., 2010. The Arabidopsis nuclear pore and nuclear envelope. *The Arabidopsis Book* 8:e0139
- Melcher, K., Ng, L., Zhou, X. E., Soon, F., Xu, Y., Suino-Powell, K. M., Park, S., Weiner, J. J., Fujii, H., Chinnusamy, V., Kovach, A., Li, J., Wang, Y., Li, J., Peterson, F. C., Jensen, D. R., Yong, E., Volkman, B. F., Cutler, S. R., Zhu, J., Xu, H. E., 2009. A gate–latch–lock mechanism for hormone signalling by abscisic acid receptors. *Nature*, 462, 602–608
- 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 Regulates Arabidopsis Inflorescence Architecture by Promoting Localized Cell Proliferation. *The Plant Cell* 24, 4948–4960
- Menges, M., Doczi, R., Okresz, L., Morandini, P., Mizzi, L., Soloviev, M., Murray, J.A.H., Bogre, L., 2008. Comprehensive gene expression atlas for the Arabidopsis MAP kinase signalling pathways. *The New Phytologist* 179, 643–62
- Meyer, S., Mumm, P., Imes, D., Endler, A., Weder, B., Al-Rasheid, K.A.S., Geiger, D., Marten, I., Martinoia, E., Hedrich, R., 2010. AtALMT12 represents an R-type anion channel required for stomatal movement in Arabidopsis guard cells. *The Plant Journal* 63, 1054–62
- Mitula, F., Tajdel, M., Ciesla, A., Kasprowicz-Maluski, A., Kulik, A., Babula-Skowronska, D., Michalak, M., Dobrowolska, G., Sadowski, J., Ludwikow, A., 2015a. Arabidopsis ABA-Activated Kinase MAPKKK18 is Regulated by Protein Phosphatase 2C ABI1 and the Ubiquitin-Proteasome Pathway. *Plant & Cell Physiology* 56, 2351–67
- Mitula, F., Kasprowicz-Maluski, A., Michalak, M., Marczak, M., Kuczynski, K., Ludwikow, A., 2015b. Protein Degradation Assays in Arabidopsis Protoplasts. *Bio-protocol* 5

- Mohanta, T., Arora, P., Mohanta, N., Parida, P., & Bae, H., 2015. Identification of new members of the MAPK gene family in plants shows diverse conserved domains and novel activation loop variants. *BMC Genomics*, 16(1), 58
- Montillet, J.-L., Leonhardt, N., Mondy, S., Tranchimand, S., Rumeau, D., Boudsocq, M., Garcia, A.V., Douki, T., Bigeard, J., Lauriere, C., Chevalier, A., Castresana, C., Hirt, H., 2013. An abscisic acid-independent oxylipin pathway controls stomatal closure and immune defense in Arabidopsis. *PLOS Biology* 11:e1001513
- Mustilli, A.-C., Merlot, S., Vavasseur, A., Fenzi, F., Giraudat, J., 2002. Arabidopsis OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. *The Plant Cell* 14, 3089–99
- Nadeau, J.A., Sack, F.D., 2002. Control of stomatal distribution on the Arabidopsis leaf surface. *Science* 296, 1697–700
- Naor D., Nedvetzki S., Golan I., Melnik L., Faitelson Y., 2002. CD44 in cancer. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 39
- Negi, J., Moriwaki, K., Konishi, M., Yokoyama, R., Nakano, T., Kusumi, K., Hashimoto-Sugimoto, M., Schroeder, J.I., Nishitani, K., Yanagisawa, S., Iba, K., 2013. A Dof transcription factor, SCAP1, is essential for the development of functional stomata in Arabidopsis. *Current Biology* 479–84
- Nishimura, N., Yoshida, T., Kitahata, N., Asami, T., Shinozaki, K., Hirayama, T., 2007. ABA-Hypersensitive Germination1 encodes a protein phosphatase 2C, an essential component of abscisic acid signaling in Arabidopsis seed. *The Plant Journal* 50(6), 935–949
- Nishimura, N., Hitomi, K., Arvai, A.S., Rambo, R.P., Hitomi, C., Cutler, S.R., Schroeder, J.I., Getzoff, E.D., 2009. Structural mechanism of abscisic acid binding and signaling by dimeric PYR1. *Science* 326, 1373–9
- Nonogaki, M., Sall, K., Nambara, E., Nonogaki, H., 2014. Amplification of ABA biosynthesis and signaling through a positive feedback mechanism in seeds. *The Plant Journal* 78, 527–39
- Oh, I.S., Park, A.R., Bae, M.S., Kwon, S.J., Kim, Y.S., Lee, J.E., Kang, N.Y., Lee, S., Cheong, H., Park, O.K., 2005. Secretome analysis reveals an Arabidopsis lipase involved in defense against *Alternaria brassicicola*. *The Plant Cell* 17, 2832–47
- Ohashi-Ito, K., Bergmann, D.C., 2006. Arabidopsis FAMA controls the final proliferation/differentiation switch during stomatal development. *The Plant Cell* 18, 2493–505

- Ohno, M., Segref, A., Bachi, A., Wilm, M., Mattaj, I.W., 2000. PHAX, a mediator of U snRNA nuclear export whose activity is regulated by phosphorylation. *Cell* 101, 187–98
- Okamoto, M., Kuwahara, A., Seo, M., Kushiro, T., Asami, T., Hirai, N., Kamiya, Y., Koshiba, T., Nambara, E., 2006. CYP707A1 and CYP707A2, which encode abscisic acid 8'-hydroxylases, are indispensable for proper control of seed dormancy and germination in Arabidopsis. *Plant Physiology* 141, 97–107
- Okamoto, M., Peterson, F.C., Defries, A., Park, S.-Y., Endo, A., Nambara, E., Volkman, B.F., Cutler, S.R., 2013. Activation of dimeric ABA receptors elicits guard cell closure, ABA-regulated gene expression, and drought tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 12132–7
- Ortiz-Masia, D., Perez-Amador, M.A., Carbonell, J., Marcote, M.J., 2007. Diverse stress signals activate the C1 subgroup MAP kinases of Arabidopsis. *FEBS Letters* 581, 1834–40
- Osakabe, Y., Arinaga, N., Umezawa, T., Katsura, S., Nagamachi, K., Tanaka, H., Ohiraki, H., Yamada, K., Seo, S.-U., Abo, M., Yoshimura, E., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., 2013. Osmotic stress responses and plant growth controlled by potassium transporters in Arabidopsis. *The Plant Cell* 25, 609–24
- Ovecka, M., Takac, T., Komis, G., Vadovic, P., Bekesova, S., Doskocilova, A., Samajova, V., Luptovciak, I., Samajova, O., Schweighofer, A., Meskiene, I., Jonak, C., Krenek, P., Lichtscheidl, I., Skultety, L., Hirt, H., Samaj, J., 2014. Salt-induced subcellular kinase relocation and seedling susceptibility caused by overexpression of Medicago SIMKK in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* 65, 2335–50
- Pantin, F., Renaud, J., Barbier, F., Vavasseur, A., Le Thiec, D., Rose, C., Bariac, T., Casson, S., McLachlan, D., Hetherington, A., Muller, B. and Simonneau, T., 2013. Developmental Priming of Stomatal Sensitivity to Absciscic Acid by Leaf Microclimate. *Current Biology*, 23(18), 1805-1811
- Park, S., Fung, P., Nishimura, N., Jensen, D. R., Fujii, H., Zhao, Y., Lumba, S., Santiago, J., Rodrigues, A., Chow, T. F., Alfred, S. E., Bonetta, D., Finkelstein, R., Provart, N. J., Desveaux, D., Rodriguez, P. L., McCourt, P., Zhu, J., Schroeder, J. I., Volkman, B. F. and Cutler, S. R., 2009. Absciscic Acid Inhibits Type 2C Protein Phosphatases via the PYR/PYL Family of START Proteins. *Science* 324, 1068-1071
- Peterson, K., Rychel, A., Torii, K., 2010. Out of the Mouths of Plants: The Molecular Basis of the Evolution and Diversity of Stomatal Development. *The Plant Cell*, 22(2), 296-306

- Pillitteri, L.J., Sloan, D.B., Bogenschutz, N.L., Torii, K.U., 2007. Termination of asymmetric cell division and differentiation of stomata. *Nature* 445, 501–5
- Pitzke, A., Djamei, A., Bitton, F., Hirt, H., 2009. A major role of the MFKK1-MKK1/2-MPK4 pathway in ROS signalling. *Molecular Plant* 2:120–137
- Popescu, S.C., Popescu, G.V., Bachan, S., Zhang, Z., Gerstein, M., Snyder, M., Dinesh-Kumar, S.P., 2009. MAPK target networks in *Arabidopsis thaliana* revealed using functional protein microarrays. *Genes & Development* 23, 80–92
- Radauer, C., Lackner, P., & Breiteneder, H., 2008. The Bet v 1 fold: an ancient, versatile scaffold for binding of large, hydrophobic ligands. *BMC Evolutionary Biology*, 8(1), 286
- Rodriguez, P., 1998. Protein phosphatase 2C (PP2C) function in higher plants. *Plant Molecular Biology*, 38(6), 919-927
- Rodriguez, M.C.S., Petersen, M., Mundy, J., 2010. Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* 61, 621–49
- Rodriguez-Gacio, M. del C., Matilla-Vazquez, M.A., Matilla, A.J., 2009. Seed dormancy and ABA signaling: the breakthrough goes on. *Plant signaling & Behavior* 4, 1035–49
- Roelfsema, M.R.G., Hedrich, R., 2010. Making sense out of Ca(2+) signals: their role in regulating stomatal movements. *Plant, Cell & Environment* 33, 305–21
- Roelfsema, M.R.G., Levchenko, V., Hedrich, R., 2004. ABA depolarizes guard cells in intact plants, through a transient activation of R- and S-type anion channels. *The Plant Journal* 37, 578–88
- Royer, D.L., 2001. Stomatal density and stomatal index as indicators of paleoatmospheric CO(2) concentration. *Review of Palaeobotany and Palynology* 114, 1–28
- Saez, A., Robert, N., Maktabi, M., Schroeder, J., Serrano, R., Rodriguez, P., 2006. Enhancement of Absciscic Acid Sensitivity and Reduction of Water Consumption in *Arabidopsis* by Combined Inactivation of the Protein Phosphatases Type 2C ABI1 and HAB1. *Plant Physiology*, 141(4), 1389-1399
- Salisbury, E.J., 1928. On the Causes and Ecological Significance of Stomatal Frequency, with Special Reference to the Woodland Flora. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 216, 1–65
- Samajova, O., Plihal, O., Al-Yousif, M., Hirt, H., Samaj, J., 2013. Improvement of stress tolerance in plants by genetic manipulation of mitogen-activated protein kinases. *Biotechnology Advances* 31, 118–28

- Santiago, J., Dupeux, F., Betz, K., Antoni, R., Gonzalez-Guzman, M., Rodriguez, L., Marquez, J.A., Rodriguez, P.L., 2012. Structural insights into PYR/PYL/RCAR ABA receptors and PP2Cs. *Plant Science* 182, 3–11
- Sato, A., Sato, Y., Fukao, Y., Fujiwara, M., Umezawa, T., Shinozaki, K., Hibi, T., Taniguchi, M., Miyake, H., Goto, D.B., Uozumi, N., 2009. Threonine at position 306 of the KAT1 potassium channel is essential for channel activity and is a target site for ABA-activated SnRK2/OST1/SnRK2.6 protein kinase. *The Biochemical Journal* 424, 439–48
- Schmidt, C., Schroeder, J.I., 1994. Anion Selectivity of Slow Anion Channels in the Plasma Membrane of Guard Cells (Large Nitrate Permeability). *Plant Physiology* 106, 383–391
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 9, 671–5
- Schweighofer, A., Kazanaviciute, V., Scheikl, E., Teige, M., Doczi, R., Hirt, H., Schwanninger, M., Kant, M., Schuurink, R., Mauch, F., Buchala, A., Cardinale, F. and Meskiene, I., 2007. The PP2C-Type Phosphatase AP2C1, Which Negatively Regulates MPK4 and MPK6, Modulates Innate Immunity, Jasmonic Acid, and Ethylene Levels in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 19(7), 2213-2224
- Seimiya, H., Sawada, H., Muramatsu, Y., Shimizu, M., Ohko, K., Yamane, K., Tsuruo, T., 2000. Involvement of 14-3-3 proteins in nuclear localization of telomerase. *The EMBO Journal* 19, 2652–61
- Sethi, V., Raghuram, B., Sinha, A., & Chattopadhyay, S., 2014. A Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade Module, MKK3-MPK6 and MYC2, Is Involved in Blue Light-Mediated Seedling Development in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 26(8), 3343-3357
- Sharp, R.E., LeNoble, M.E., 2002. ABA, ethylene and the control of shoot and root growth under water stress. *Journal of Experimental Botany* 53, 33–7
- Shen, L., Du, X., Su, Q., Li, M., Zhou, Z., 2013. Cloning, expression, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of the kinase domain of AtMAP4Kalpha2 from Arabidopsis thaliana. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology And Crystallization Communications*, 69(7), 788-791
- Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Seki, M., 2003. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Current Opinion In Plant Biology*, 6(5), 410-417
- Shpak, E.D., McAbee, J.M., Pillitteri, L.J., Torii, K.U., 2005. Stomatal patterning and differentiation by synergistic interactions of receptor kinases. *Science* 309, 290–3

- Siegel, R.S., Xue, S., Murata, Y., Yang, Y., Nishimura, N., Wang, A., Schroeder, J.I., 2009. Calcium elevation-dependent and attenuated resting calcium-dependent abscisic acid induction of stomatal closure and abscisic acid-induced enhancement of calcium sensitivities of S-type anion and inward-rectifying K channels in Arabidopsis guard cells. *The Plant Journal* 59, 207–220
- Signora, L., De Smet, I., Foyer, C.H., Zhang, H., 2001. ABA plays a central role in mediating the regulatory effects of nitrate on root branching in Arabidopsis. *The Plant Journal* 28, 655–662
- Simmons, A.R., Bergmann, D.C., 2016. Transcriptional control of cell fate in the stomatal lineage. *Current Opinion in Plant Biology* 29, 1–8
- Sinha, B., Koster, D., Ruez, R., Gonnord, P., Bastiani, M., Abankwa, D., Stan, R.V., Butler-Browne, G., Védie, B., Johannes, L., Morone, N., Parton, R.G., Raposo, G., Sens, P., Lamaze, C., Nassoy, P., 2011. Cells respond to mechanical stress by rapid disassembly of caveolae. *Cell* 144, 402–413
- Soon, F., Ng, L., Zhou, X. E., West, G. M., Kovach, A., Tan, M. H. E., Suino-Powell, K. M., He, Y., Xu, Y., Chalmers, M. J., Brunzelle, J. S., Zhang, H., Yang, H., Jiang, H., Li, J., Yong, E., Cutler, S., Zhu, J., Griffin, P. R., Melcher, K. and Xu, H. E., 2011. Molecular Mimicry Regulates ABA Signaling by SnRK2 Kinases and PP2C Phosphatases. *Science* 335, 85-88
- Smith, A.B., Lopez-Villarejo, J., Diago-Navarro, E., Mitchenall, L.A., Barendregt, A., Heck, A.J., Lemonnier, M., Maxwell, A., Diaz-Orejas, R., 2012. A common origin for the bacterial toxin-antitoxin systems parD and ccd, suggested by analyses of toxin/target and toxin/antitoxin interactions. *PLOS One* 7:e46499
- Stanko, V., Giuliani, C., Retzer, K., Djamei, A., Wahl, V., Wurzinger, B., Wilson, C., Heberle-Bors, E., Teige, M. and Kragler, F., 2014. Timing Is Everything: Highly Specific and Transient Expression of a MAP Kinase Determines Auxin-Induced Leaf Venation Patterns in Arabidopsis. *Molecular Plant*, 7(11), 1637-1652
- Stommel, J.M., Marchenko, N.D., Jimenez, G.S., Moll, U.M., Hope, T.J., Wahl, G.M., 1999. A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *The EMBO Journal* 18, 1660–72
- Sugano, S.S., Shimada, T., Imai, Y., Okawa, K., Tamai, A., Mori, M., Hara-Nishimura, I., 2010. Stomagen positively regulates stomatal density in Arabidopsis. *Nature* 463, 241–4

- Sun, Y., Sriramajayam, K., Luo, D., Liao, D.J., 2012. A quick, cost-free method of purification of DNA fragments from agarose gel. *Journal of Cancer* 3, 93–5
- Taj G., Agarwal P., Grant M., Kumar A., 2010. Recognition and response to different stresses through multiple signal transduction pathways. *Plant Signaling and Behaviour* 5, 1370–1378
- Tajdel, M., Mituła, F., Ludwików, A., 2016. Regulation of Arabidopsis MAPKKK18 by ABI1 and SnRK2, components of the ABA signaling pathway. *Plant Signaling & Behavior* 11:e1139277
- Takahashi, F., Mizoguchi, T., Yoshida, R., Ichimura, K., & Shinozaki, K., 2011. Calmodulin-Dependent Activation of MAP Kinase for ROS Homeostasis in Arabidopsis. *Molecular Cell* 41(6), 649-660
- 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. *The Plant Cell* 19, 805–18
- Takahashi, Y., Soyano, T., Kosetsu, K., Sasabe, M., Machida, Y., 2010. HINKEL kinesin, ANP MAPKKs and MKK6/ANQ MAPKK, which phosphorylates and activates MPK4 MAPK, constitute a pathway that is required for cytokinesis in Arabidopsis thaliana. *Plant and Cell Physiology* 51:1766–76
- Tanaka, Y., Nose, T., Jikumaru, Y., & Kamiya, Y., 2013. ABA inhibits entry into stomatal-lineage development in Arabidopsis leaves. *The Plant Journal*, 74(3), 448-457
- Tanaka, Y., Sano, T., Tamaoki, M., Nakajima, N., Kondo, N., Hasezawa, S., 2006. Cytokinin and auxin inhibit abscisic acid-induced stomatal closure by enhancing ethylene production in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* 57, 2259–66
- Tanoue, T., Nishida, E., 2003. Molecular recognitions in the MAP kinase cascades. *Cellular Signalling*, 15(5), 455-462
- Teige, M., Scheikl, E., Eulgem, T., Dóczi, R., Ichimura, K., Shinozaki, K., Dangl, J. L. and Hirt, H., 2004. The MKK2 Pathway Mediates Cold and Salt Stress Signaling in Arabidopsis. *Molecular Cell*, 15(1), 141-152
- Turjanski, A.G., Vaque, J.P., Gutkind, J.S., 2007. MAP kinases and the control of nuclear events. *Oncogene* 26, 3240–53
- Tzfira, T., Tian, G.-W., Lacroix, B., Vyas, S., Li, J., Leitner-Dagan, Y., Krichevsky, A., Taylor, T., Vainstein, A., Citovsky, V., 2005. pSAT vectors: a modular series of plasmids

- for autofluorescent protein tagging and expression of multiple genes in plants. *Plant Molecular Biology* 57, 503–16
- Umezawa, T., Sugiyama, N., Mizoguchi, M., Hayashi, S., Myouga, F., Yamaguchi-Shinozaki, K., Ishihama, Y., Hirayama, T. and Shinozaki, K., 2009. Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in Arabidopsis. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences* 106(41), 17588-17593.
- Umezawa, T., Sugiyama, N., Takahashi, F., Anderson, J.C., Ishihama, Y., Peck, S.C., Shinozaki, K., 2013. Genetics and phosphoproteomics reveal a protein phosphorylation network in the abscisic acid signaling pathway in Arabidopsis thaliana. *Science Signaling* 6:rs8
- Vahisalu, T., Kollist, H., Wang, Y.-F., Nishimura, N., Chan, W.-Y., Valerio, G., Lamminmaki, A., Brosche, M., Moldau, H., Desikan, R., Schroeder, J.I., Kangasjarvi, J., 2008. SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. *Nature* 452, 487–91
- Vaidya, A.S., Peterson, F.C., Yarmolinsky, D., Merilo, E., Verstraeten, I., Park, S.-Y., Elzinga, D., Kaundal, A., Helander, J., Lozano-Juste, J., Otani, M., Wu, K., Jensen, D.R., Kollist, H., Volkman, B.F., Cutler, S.R., 2017. A Rationally Designed Agonist Defines Subfamily IIIA Absciscic Acid Receptors As Critical Targets for Manipulating Transpiration. *ACS Chemical Biology*
- Vanneste, S., Coppens, F., Lee, E., Donner, T.J., Xie, Z., Van Isterdael, G., Dhondt, S., De Winter, F., De Rybel, B., Vuylsteke, M., De Veylder, L., Friml, J., Inze, D., Grotewold, E., Scarpella, E., Sack, F., Beemster, G.T.S., Beeckman, T., 2011. Developmental regulation of CYCA2s contributes to tissue-specific proliferation in Arabidopsis. *The EMBO Journal* 30, 3430–41
- Verslues, P., & Bray, E., 2005. Role of abscisic acid (ABA) and Arabidopsis thaliana ABA-insensitive loci in low water potential-induced ABA and proline accumulation. *Journal Of Experimental Botany*, 57(1), 201-212
- Villarreal, N.M., Marina, M., Nardi, C.F., Civello, P.M., Martinez, G.A., 2016. Novel insights of ethylene role in strawberry cell wall metabolism. *Plant Science* 252, 1–11
- Wang, H., Yang, L., Li, Y., Hou, J., Huang, J., Liang, W., 2016. Involvement of ABA- and H₂O₂-dependent cytosolic glucose-6-phosphate dehydrogenase in maintaining redox homeostasis in soybean roots under drought stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 107, 126–136

- Wang, H., Ngwenyama, N., Liu, Y., Walker, J.C., Zhang, S., 2007. Stomatal development and patterning are regulated by environmentally responsive mitogen-activated protein kinases in Arabidopsis. *The Plant Cell* 19, 63–73
- Weiner J. J., Peterson F. C., Volkman B. F., Cutler S. R., 2010. Structural and functional insights into core ABA signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 13 495–502
- Weiss, D., Ori, N., 2007. Mechanisms of cross talk between gibberellin and other hormones. 144, 1240–6
- Wood, C.D., Thornton, T.M., Sabio, G., Davis, R.A., Rincon, M., 2009. Nuclear localization of p38 MAPK in response to DNA damage. *International Journal of Biological Sciences* 5, 428–37
- Xie, Z., Lee, E., Lucas, J.R., Morohashi, K., Li, D., Murray, J.A.H., Sack, F.D., Grotewold, E., 2010. Regulation of cell proliferation in the stomatal lineage by the Arabidopsis MYB FOUR LIPS via direct targeting of core cell cycle genes. *The Plant Cell* 22, 2306–21
- Xing, Y., Cao, Q., Zhang, Q., Qin, L., Jia, W. and Zhang, J., 2013. MKK5 Regulates High Light-Induced Gene Expression of Cu/Zn Superoxide Dismutase 1 and 2 in Arabidopsis. *Plant And Cell Physiology*, 54(7), 1217-1227
- Xu, D., Marquis, K., Pei, J., Fu, S.-C., Cagatay, T., Grishin, N.V., Chook, Y.M., 2015. LocNES: a computational tool for locating classical NESs in CRM1 cargo proteins. *Bioinformatics* 31, 1357–65
- Xu, J., Zhang, S., 2014. Mitogen-activated protein kinase cascades in signaling plant growth and development. *Trends in Plant Science* 20, 56–64
- Xu, J., Xie, J., Yan, C., Zou, X., Ren, D., & Zhang, S., 2013. A chemical genetic approach demonstrates that MPK3/MPK6 activation and NADPH oxidase-mediated oxidative burst are two independent signaling events in plant immunity. *The Plant Journal*, 77(2), 222-234
- Xue, T., Wang, D., Zhang, S., Ehrling, J., Ni, F., Jakab, S., Zheng, C. and Zhong, Y., 2008. Genome-wide and expression analysis of protein phosphatase 2C in rice and Arabidopsis. *BMC Genomics*, 9(1), 550
- Yamburenko, M.V., Zubo, Y.O., Vankova, R., Kusnetsov, V.V., Kulaeva, O.N., Borner, T., 2013. Absciscic acid represses the transcription of chloroplast genes. *Journal of Experimental Botany* 64, 4491–502
- Yan, C., Lee, L.H., Davis, L.I., 1998. Crm1p mediates regulated nuclear export of a yeast AP-1-like transcription factor. *The EMBO Journal* 17, 7416–29

- Yin, P., Fan, H., Hao, Q., Yuan, X., Wu, D., Pang, Y., Yan, C., Li, W., Wang, J. and Yan, N., 2009. Structural insights into the mechanism of abscisic acid signaling by PYL proteins. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16, 1230-1236
- Yoo, S., Cho, Y., Tena, G., Xiong, Y., & Sheen, J., 2008. Dual control of nuclear EIN3 by bifurcate MAPK cascades in C2H4 signalling. *Nature*, 451(7180), 789-795
- Yoshida, R., Umezawa, T., Mizoguchi, T., Takahashi, S., Takahashi, F., Shinozaki, K., 2006. The regulatory domain of SRK2E/OST1/SnRK2.6 interacts with ABI1 and integrates abscisic acid (ABA) and osmotic stress signals controlling stomatal closure in Arabidopsis. *The Journal of Biological Chemistry* 281, 5310–8
- Zhang, H., Han, W., De Smet, I., Talboys, P., Loya, R., Hassan, A., Rong, H., Jurgens, G., Paul Knox, J., Wang, M.-H., 2010. ABA promotes quiescence of the quiescent centre and suppresses stem cell differentiation in the Arabidopsis primary root meristem. *The Plant Journal* 64, 764–74
- Zhang, Y., Fu, L., Qi, X., Zhang, Z., Xia, Y., Jia, J., Jiang, J., Zhao, Y., Wu, G., 2013. Structural insight into the mutual recognition and regulation between Suppressor of Fused and Gli/Ci. *Nature Communications* 4, 2608
- Zhang, Y., Wang, P., Shao, W., Zhu, J.-K., Dong, J., 2015. The BASL polarity protein controls a MAPK signaling feedback loop in asymmetric cell division. *Developmental Cell* 33, 136–49
- Zhang, Y., Xiong, Y., 2001. A p53 amino-terminal nuclear export signal inhibited by DNA damage-induced phosphorylation. *Science* 292, 1910–5
- Zhang, Y., Zhu, H., Zhang, Q., Li, M., Yan, M., Wang, R., Wang, L., Welti, R., Zhang, W., Wang, X., 2009. Phospholipase $\alpha 1$ and phosphatidic acid regulate NADPH oxidase activity and production of reactive oxygen species in ABA-mediated stomatal closure in Arabidopsis. *The Plant Cell* 21, 2357–77
- Zhao, C., Nie, H., Shen, Q., Zhang, S., Lukowitz, W., Tang, D., 2014. EDR1 physically interacts with MKK4/MKK5 and negatively regulates a MAP kinase cascade to modulate plant innate immunity. *PLOS Genetics* 10:e1004389
- Zhao, Y., Xing, L., Wang, X., Hou, Y.-J., Gao, J., Wang, P., Duan, C.-G., Zhu, X., Zhu, J.-K., 2014. The ABA receptor PYL8 promotes lateral root growth by enhancing MYB77-dependent transcription of auxin-responsive genes. *Science Signaling* 7:ra53
- Zheng, Z., Mosher, S., Fan, B., Klessig, D., & Chen, Z., 2007. Functional analysis of Arabidopsis WRKY25 transcription factor in plant defense against *Pseudomonas syringae*. *BMC Plant Biology*, 7(1), 2

- Zheng, Z., Qamar, S., Chen, Z., & Mengiste, T., 2006. Arabidopsis WRKY33 transcription factor is required for resistance to necrotrophic fungal pathogens. *The Plant Journal*, 48(4), 592-605
- Zhou, C., Cai, Z., Guo, Y., & Gan, S., 2009. An Arabidopsis Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade, MKK9-MPK6, Plays a Role in Leaf Senescence. *Plant Physiology*, 150(1), 167-177