

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 liściach *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 do 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. *MAPKKK18^{oe}* 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.