

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Bakalářská práce

Olomouc 2024

Adam Masopust

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



**Příprava konstruktů YFP-OMTK1 a jeho testování metodou
transientní transformace listů *Nicotiana benthamiana***

Bakalářská práce

Adam Masopust

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2024

Vedoucí práce: Mgr. Ivan Luptovčíak, Ph.D

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Adam MASOPUST
Osobní číslo: R21750
Studijní program: B0511A030011 Molekulární a buněčná biologie
Téma práce: Příprava konstruktů YFP-OMTK1 a jeho testování metodou transienční transformace listů *Nicotiana benthamiana*
Zadávající katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

Zásady pro vypracování

Cílem bakalářské práce je zvládnutí práce s odbornou (anglickou) literaturou a její následné zpracování do rešerše na danou problematiku. Dalším cílem je také klonování fúzního genu OMTK1. Dále se bakalářská práce bude zabývat experimenty zaměřenými na transienční transformaci, mikroskopické ověření signálu, nativní PAGE a Western blot.

V rámci teoretické části bude vypracována rešerše zaměřená na problematiku:

1. Přehled publikací o mitogen aktivovaných protein kinázách (MAPK) v *M. sativa* (hlavně OMTK1 a dalších MAPKs) a jejich ortolozích v *M. truncatula*, *Arabidopsis thaliana* a také jiných rostlinných druzích, podle dostupné literatury.
2. Přehled signálních drah MAPK se zaměřením na OMTK1 a další MAPKs (a jejich ortolozích) při vývinu a odpovědi na stres a také v souvislosti s regulací cytoskeletu a interakce rostliny s mikroorganismy.

Praktická část bakalářské práce bude zaměřena na:

1. Klonování konstruktů pro fúzní protein YFP-OMTK1 metodou MultiSite Gateway.
2. Transienční transformace listů *Nicotiana benthamiana* konstruktům YFP-OMTK1
3. Metody detekce exprese fúzních proteinů-mikroskopické ověření signálu YFP-OMTK1, a také PAGE a Western blot (detekce fúzních proteinů).

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

1. Cardinale F, Meskiene I, Ouaked F, Hirt H (2002) Convergence and divergence of stress-induced mitogen-activated protein kinase signaling pathways at the level of two distinct mitogen-activated protein kinase kinases. *The Plant Cell* 14, 703-711.
2. Hrbáčková M, Luptovčíak I, Hlaváčková K, Dvořák P, Tichá M, Šamajová O, Novák D, Bednarz H, Niehaus K, Ovečka M, and Šamaj J (2021) Overexpression of alfalfa SIMK promotes root hair growth, nodule clustering and shoot biomass production. *Plant Biotechnology Journal* 19, 767-784.
3. Ichimura K, Shinozaki K, Tena G, Sheen J, Henry Y, Champion A, et al. (2002) Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends Plant Science* 7, 301-308.
4. Jonak C, Okresz L, Bögre L, Hirt H (2002) Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling. *Current Opinion in Plant Biology* 5, 415-424.
5. Kiegerl S, Cardinale F, Siligan C, Gross A, Baudouin E, Liwosz A, Eklöf S, Till S, Bögre L, Hirt H, Meskiene I. (2000) SIMKK, a mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase, is a specific activator of the salt stress-induced MAPK, SIMK. *The Plant Cell* 12, 2247-2258.
6. Komis G, Šamajová O, Ovečka M, Šamaj J (2018) Cell and developmental biology of plant mitogen-activated protein kinases. *Annual Review of Plant Biology* 69, 237-265.

7. Křenek P, Šamajová O, Luptovčíak I, Doskočilová A, Komis G, Šamaj J (2015) Transient plant transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*: Principles, methods and applications, *Biotechnology Advances* 33, 1024-1042.
8. Mališková A. (2021) Charakterizace SIMKK a PRKK proteinů u vojtěšky *Medicago sativa*. Bakalářská práce, Oddělení buněčné biologie, CRH, PfF, Univerzita Palackého v Olomouci.
9. Nakagami H, Kiegerl S, Hirt H. (2004) OMTK1, a novel MAPKKK, channels oxidative stress signaling through direct MAPK interaction. *Journal of Biological Chemistry* 279, 26959-26966.
10. Ovečka M, Takáč T, Komis G, Vadovič P, Bekešová S, Doskočilová A, Smékalová V, Luptovčíak I, Šamajová O, Schweighofer A, Meskiene I, Jonak C, Křenek P, Lichtscheidl I, Skultety L, Hirt H, Šamaj J (2014) Salt-induced subcellular kinase relocation and seedling susceptibility caused by overexpression of *Medicago* SIMKK in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 65, 2335-2350.
11. Pavlíková M. (2022) Úlohy vybraných MAPK proteinů u vojtěšky *Medicago sativa*. Bakalářská práce, Katedra biotechnologií, PfF, Univerzita Palackého v Olomouci.
12. Smékalová V, Doskočilová A, Komis G, Šamaj J (2014) Crosstalk between secondary messengers, hormones and MAPK modules during abiotic stress signalling in plants. *Biotechnology Advances* 32, 2-11.
13. Smékalová V, Luptovčíak I, Komis G, Šamajová O, Ovečka M, Doskočilová A, Takáč T, Vadovič P, Novák O, Pechan T, Ziemann A, Košútová P, Šamaj J (2014) Involvement of YODA and mitogen activated protein kinase 6 in *Arabidopsis* post-embryonic root development through auxin up-regulation and cell division plane orientation. *New Phytologist* 203, 1175-1193
14. Suarez-Rodriguez MC, Petersen M, Mundy J (2010) Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling in Plants. *Annual Review of Plant Biology* 61, 621-49.
15. Šamaj J, Ovečka M, Hlavacka A, Lecourieux F, Meskiene I, Lichtscheidl I, Lenart P, Salaj J, Volkmann D, Bögre L, Baluška F, Hirt H (2002) Involvement of the mitogen-activated protein kinase SIMK in regulation of root hair tip-growth. *EMBO Journal* 21, 3296-3306.
16. Šamajová O, Komis G, Šamaj J (2013) Emerging topics in the cell biology of mitogen-activated protein kinases. *Trends in Plant Science* 18, 140-148.
17. Tena G, Asai T, Chiu WL, Sheen J (2001) Plant mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Curren Opinion in Plant Biology* 4, 392-400.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Ivan Luptovčíak, Ph.D.**
Katedra biotechnologií

Datum zadání bakalářské práce: **27. února 2023**
Termín odevzdání bakalářské práce: **30. dubna 2024**

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 15. března 2024

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora: Adam Masopust

Název práce: Příprava konstruktů YFP-OMTK1 a jeho testování metodou transienční transformace listů *Nicotiana benthamiana*

Typ práce: bakalářská

Pracoviště: Katedra buněčné biologie a genetiky, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci

Vedoucí práce: Mgr. Ivan Luptovčíak, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2024

Klíčová slova: *Medicago sativa*, MAPK, OMTK1, MultiSite Gateway klonování

Počet stran: 67

Počet příloh: 5

Jazyk: český

Souhrn:

Tato bakalářská práce je zaměřena na přípravu konstruktů exprimujícího fúzního proteinu YFP-OMTK1 pod kontrolou konstitutivního promotoru. Gen *OMTK1* byl objeven v tolici vojtěšce (*Medicago sativa*), která je využívána jako krmivo pro hospodářská zvířata. Tento gen patří mezi MAPKKK a je spojen s reakcí na stres vyvolanou peroxidem vodíku. Literární rešerše je zaměřena na obecnou charakterizaci mitogenem aktivovaných protein kináz (MAPK), na komplexní signalizační kaskády v rostlinách v reakci na patogeny, abiotický stres, růst a vývin rostlin, v nichž jsou MAPK zapojeny. Následně je práce zaměřena na vybrané MAPK z *M. sativa* a princip Gateway klonování, který byl využit při klonování konstruktů pro expresi fúzního proteinu.

V rámci experimentální části bakalářské práce byla nejdříve získána sekvence genu *OMTK1*, dle které byly navrženy specifické primery. Technikou MultiSite Gateway klonování byl následně připraven konstrukt *AtUBQ10::YFP:cOMTK1*. Metodou transienční transformace listů rostliny *N. benthamiana* bylo zjištěno, že protein OMTK1 je lokalizován v cytoplazmatické membráně. Následně byla metodou nativní PAGE a Western blot ověřena exprese fúzního proteinu.

Taktéž bylo potvrzeno možné zapojení genu *OMTK1* v programované buněčné smrti pozorováním fenotypu listů rostliny *N. benthamiana*, ve výše zmíněném experimentu.

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Adam Masopust

Title: Preparation of the YFP-OMTK1 construct and its testing by the method of transient transformation of *Nicotiana benthamiana* leaves

Type of thesis: bachelor

Department: Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science Palacký University Olomouc

Supervisor: Mgr. Ivan Luptovčiak, Ph.D.

The year of presentation: 2024

Keywords: *Medicago sativa*, MAPK, OMTK1, MultiSite Gateway cloning

Number of pages: 67

Number of appendices: 5

Language: czech

Summary:

This bachelor thesis focuses on the preparation of a construct expressing the YFP-OMTK1 fusion protein under the control of a constitutive promoter. The *OMTK1* gene was discovered in alfalfa (*Medicago sativa*), which is used as a livestock feed. The *OMTK1* gene belongs to the MAPKKK family and is associated with the response to hydrogen peroxide-induced stress. The literary research is focused on the general characterization of mitogen-activated protein kinases (MAPKs), on the complex signaling cascades in plants in response to pathogens, abiotic stress, and plant growth and development in which MAPKs are involved. The theoretical overview is also focused on MAPKs from *M. sativa* and the principle of Gateway cloning that was used to clone a construct for fusion protein expression.

In the experimental part of the bachelor thesis, the sequence of the *OMTK1* gene was first obtained, according to which the specific primers were designed. Then, the construct *AtUBQ10::YFP:cOMTK1* was prepared by the MultiSite Gateway cloning technique. The OMTK1 protein was found to be localized in the cytoplasmic membrane by transient transformation of the *N. benthamiana* leaves. Subsequently, the expression of the fusion protein was verified by native PAGE and Western blot.

The possible involvement of the *OMTK1* gene in programmed cell death was confirmed by observing the phenotype of *N. benthamiana* in the aforementioned experiment.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně na katedře biotechnologií pod vedením Mgr. Ivana Luptovčiaka, Ph.D. a s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne 3. 5. 2024

.....

Adam Masopust

Poděkování:

Rád bych poděkoval především mému vedoucímu bakalářské práce panu Mgr. Ivanu Luptovčiakovi, Ph.D za odborné vedení, poskytnutí materiálů, ale také podporu a rady při psaní práce. Taktéž bych chtěl poděkovat paní Mgr. Petře Chytilové za vypěstování tabáků, které byly použity v mé bakalářské práci a kolektivu katedry biotechnologií za jejich přívětivý přístup a ochotu.

Tato práce vznikla za podpory projektu „Rostliny jako prostředek udržitelného globálního rozvoje“, reg. č.: CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000827 financovaného z EFRR.

Obsah

1	ÚVOD	1
2	CÍLE PRÁCE	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1	Tolice vojtěška (<i>Medicago sativa</i> L.)	3
3.2	Obecná charakteristika mitogenem aktivované protein kinázy	3
3.3	Signalizace vybraných MAPK při útoku patogenů	6
3.4	Kaskády MAPK zapojené v růstu a vývinu	8
3.5	Kaskády MAPK zapojené v abiotickém stresu	11
3.6	MAPK u <i>Medicago sativa</i>	13
3.6.1	OMTK1	13
3.6.2	MMK3	14
3.6.3	SIMK	15
3.7	Gateway klonování	15
3.7.1	Místně-specifická rekombinace bakteriofágu λ	16
3.7.2	Charakteristika metody Gateway klonování	16
3.7.3	MultiSite Gateway klonování	18
4	MATERIÁL A METODY	21
4.1	Biologický materiál	21
4.2	Použité chemikálie, soupravy a roztoky	22
4.3	Seznam použitých přístrojů a zařízení	26
4.4	Seznam použitých programů	27
4.5	Metody	27
4.5.1	Navržení primerů	27
4.5.2	PCR pro získání ampliconů	28
4.5.3	Přečištění PCR produktů	29
4.5.4	Izolace donorových plazmidů isopropanolem	30

4.5.5	Přečištění plazmidové DNA QIAprep Spin Miniprep Kit	31
4.5.6	BP a LR rekombinační reakce	31
4.5.7	Transformace chemokompetentních buněk a elektrokompetentních buněk <i>E. coli</i>	32
4.5.8	PCR kolonií pro ověření rekombinace plazmidů	33
4.5.9	Izolace entry klonů kitem Sigma Aldrich	35
4.5.10	Agarosová elektroforéza	35
4.5.11	Měření koncentrace a čistoty dsDNA a ssDNA	36
4.5.12	Restrikční štěpení entry klonů	36
4.5.13	Transformace <i>A. tumefaciens</i> chladovým šokem	38
4.5.14	Transientní transformace <i>N. benthamiana</i>	38
4.5.15	Mikroskopické pozorování	39
4.5.16	Extrakce proteinů	40
4.5.17	Měření koncentrace proteinů	40
4.5.18	Nativní PAGE	41
4.5.19	SDS-PAGE a Western blot	41
5	VÝSLEDKY	43
5.1	<i>In silico</i> analýza genu <i>OMTK1</i>	43
5.2	MultiSite Gateway klonování genu <i>OMTK1</i>	43
5.3	Transientní transformace genu <i>OMTK1</i> do listů <i>N. benthamiana</i>	49
5.4	Detekce fúzního proteinu YFP- <i>OMTK1</i>	52
5.5	Analýza fenotypu transientně transformovaných listů <i>N. benthamiana</i>	53
6	DISKUZE	55
7	ZÁVĚR	57
8	LITERATURA	58
8.1	Odborná literatura	58
8.2	Hypertextové odkazy	66
9	PŘÍLOHY	67

Seznam symbolů a zkratek

ACS2/6	1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid synthase 2/6
ASR3	<i>Arabidopsis</i> SH4-related3
BAK1	brassinosteroid insensitive 1-associated receptor kinase 1
BASL	breaking of asymmetry in the stomatal lineage
CBF	C-repeat-binding factor
cDNA	komplementární DNA
COR	cold regulated genes (geny regulované chladem)
CRK3	calmodulin-binding receptor-like cytoplasmic kinase 3
CRLK1/2	calcium/calmodulin-regulated receptor-like kinases 1/2 (vápníkem/kalmodulinem regulované receptorům podobné protein kinázy)
CRT/DRE	C-repeat/dehydration responsive element
CTR1	constitutive triple response 1
DAMP	damage-associated molecular patterns (molekulární vzory asociované s poškozením)
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EFR	elongation factor EF-Tu receptor (receptor pro elongační faktot Ef-Tu)
EIN2/3	ethylene insensitive 2/3
EPF1/2	epidermal patterning factor 1/2
ERK2	extracellular signal-regulated protein kinases 2
flg22	flagelin 22
FLS2	flagellin sensing 2 receptor
FRK1	flg22-induced receptor-like kinase 1
gDNA	genomová DNA
GEN	gentamycin
ICE1	inducer of CBF expression 1
KAN	kanamycin
LRR-RK	leucine-rich repeat receptor kinase (receptorové kinázy bohaté na leucin)
LRR-RLK	leucine-rich repeat receptor-like protein kinase (proteinová kináza podobná receptorům bohatým na leucin)
MAMP	microbe-associated molecular patterns (molekulární vzory asociované s mikroby)
MAP65-1	microtubule-associated protein 65-1

MAPK	mitogenem aktivovaná protein kináza
MAPKK	mitogenem aktivovaná protein kináza kináza
MAPKKK	mitogenem aktivovaná protein kináza kináza kináza
MKS1 MAP	kinase substrate 1 (MAP kináza substrát 1)
NB-LRR	nucleotide-binding leucine-rich repeat (typ receptoru obsahující nukleotid-vázající doménu a opakující se sekvence bohaté na leucin)
nlp20	Nep1-like protein 20
NPK1	<i>Nicotiana</i> protein kinase 1
PAMP	pathogen-associated molecular patterns (molekulární vzory asociované s patogeny)
PAT1	protein associated with topoisomerase II (protein asociovaný s topoizomerázou II)
pep1	protein effector protein 1
PLT1/2	plethora 1/2
PP2C5	protein phosphatase 2C 5 (protein fosfatáza 2C 5)
PRRs	pattern-recognition receptors (receptory rozpoznávající molekuly typické pro patogeny)
PTP1	protein tyrosine phosphatase 1 (protein tyrosin fosfatáza 1)
PVDF	polyvinyliden difluoridová membrána
RGF1	root meristem growth factor 1
RGI	RGF1 insensitives
RIF	rifampicin
RLK	receptor-like protein kinases (receptorům podobné protein kinázy)
ROS	reaktivní formy kyslíku
SIMK	salt stress-induced MAPK
SIMKK	salt stress-induced MAPKK
SPE	spektinomycin
SPCH	speechless
SUMM	suppressor of mkk1 mkk2 2
TAE	Tris acetát EDTA

Seznam obrázků

Obrázek 1: Studovaná rostlina <i>Medicago sativa</i>	3
Obrázek 2: Schéma základního modelu kaskády MAPK.	4
Obrázek 3: Signalizační dráha MAPK u <i>A. thaliana</i> v reakci na patogeny	8
Obrázek 4: Signalizační dráha MAPK u <i>A. thaliana</i> v regulaci vývoje kořenového meristému a růstu primárních kořenů.....	11
Obrázek 5: Signalizační dráha MAPK u <i>A. thaliana</i> v reakci na solný stres.....	12
Obrázek 6: Schéma integrační a excizní místně-specifické rekombinace bakteriofágu λ do genomu <i>E. coli</i>	17
Obrázek 7: Schéma BP a LR reakce.	18
Obrázek 8: Schéma klonování expresního klonu za použití kitu od firmy Invitrogen.....	19
Obrázek 9: Příklad analýzy štěpných míst v programu ApE	37
Obrázek 10: Porovnání sekvence genu <i>OMTK1</i> získané Sangerovým sekvenováním a referenční sekvence dostupné v databázi NCBI.	43
Obrázek 11: Ověření funkčnosti primerů pomocí PCR a elektroforetické separace na agarosovém gelu.	44
Obrázek 12: Ověření přítomnosti PCR amplikonů po přečištění elektroforetickou separací na agarosových gelech.....	45
Obrázek 13: Ověření úspěšnosti rekombinace metodou PCR kolonií a elektroforetickou separací na agarosovém gelu.	46
Obrázek 14: Restrikční štěpení entry klonů pro ověření úspěšnosti BP rekombinace.....	47
Obrázek 15: Selektce kolonií <i>E. coli</i> metodou PCR kolonií a restrikční štěpení plazmidu <i>AtUBQ10::YFP:cOMTK1</i>	49
Obrázek 16: Fúzní protein YFP-OMTK1 exprimovaný v epidermálních buňkách listů <i>N. benthamiana</i> transientně transformovaných konstruktem <i>AtUBQ10::YFP:cOMTK1</i> , pozorovaný epifluorescenčním mikroskopem.....	50
Obrázek 17: Fúzní protein YFP-OMTK1 exprimovaný v epidermálních buňkách listů <i>N. benthamiana</i> transientně transformovaných konstruktem <i>AtUBQ10::YFP:cOMTK1</i> , pozorovaný konfokálním mikroskopem druhý den po transformaci	51
Obrázek 18: Fúzní protein YFP-OMTK1 exprimovaný v epidermálních buňkách listů <i>N. benthamiana</i> transientně transformovaných konstruktem <i>AtUBQ10::YFP:cOMTK1</i> , pozorovaný konfokálním mikroskopem třetí den po transformaci.	51

Obrázek 19: Fúzní protein YFP-MMK3 exprimovaný v epidermálních buňkách listů <i>N. benthamiana</i> transientně transformovaných bakterií <i>A. tumefaciens</i> nesoucí konstrukt <i>AtUBQ10::YFP:cMMK3</i> použitý jako kontrola transformace.	52
Obrázek 20: Western blot analýza a nativní PAGE fúzního proteinu YFP-OMTK1..	53
Obrázek 21: Fenotypová analýza listů <i>N. benthamiana</i> po transientní transformaci konstruktem <i>AtUBQ10::YFP:cOMTK1</i> indukujícím zvýšenou expresi proteinu YFP-OMTK1.	54

Seznam tabulek

Tabulka 1: Seznam použitých plazmidů a antibiotik použitých pro selekci bakterií <i>E. coli</i>	21
Tabulka 2: Seznam použitých konstruktů a antibiotik použitých pro selekci bakterií <i>E. coli</i> a <i>A. tumefaciens</i>	22
Tabulka 3: Složení PCR směsi pro ověření funkčnosti primerů.	29
Tabulka 4: Složení PCR směsi pro amplifikaci genu OMTK1, který byl využit při klonování.	30
Tabulka 5: Konstrukty, které byly ověřeny metodou PCR kolonií, použité primery a jejich teplota nasednutí použitá v thermocykleru.....	34
Tabulka 6: Složení PCR směsi pro ověření přítomnosti genu zájmu v entry klonech.....	35
Tabulka 7: Počet testovaných kolonií entry klonů po BP reakci a její procentuální úspěšnost...46	

1 Úvod

Tolice vojtěška (*Medicago sativa*) je důležitá hospodářská plodina, která obsahuje velké množství bílkovin a využívá se především jako vysokoenergetické krmivo pro zvířata. Rostliny žijí přisedlým způsobem života a během růstu jsou vystaveny neustále se měnícím podnětům z vnějšího prostředí. V reakci na nepříznivé podmínky si rostliny vyvinuly účinné obranné mechanismy, které jsou řízeny komplexními signálními drahami.

Mezi jedny z nejčastějších komponentů těchto drah patří mitogenem aktivované protein kinázy (MAPK), které se vyskytují u všech eukaryot. MAPK jsou zapojeny v signalizaci při růstu, vývoji, reakcích rostlin na patogeny nebo abiotický stres. Kaskády MAPK jsou obvykle třístupňové, kdy mitogenem aktivovaná protein kináza kináza kináza (MAPKKK) fosforyluje mitogenem aktivovanou protein kinázu kinázu (MAPKK), která fosforyluje mitogenem aktivovanou protein kinázu (MAPK), která aktivuje substrát. Protein OMTK1 patří mezi MAPKKK. OMTK1 je zapojen v signalizační kaskádě zapojené v odpověď na stres způsobený peroxidem vodíku v rostlině *M. sativa*. Má práce se zaměřuje na prohloubení znalostí o proteinu OMTK1 a jeho funkci.

Studium kaskád MAPK je důležité obzvláště v rychle se měnících klimatických podmínkách, kdy jsou rostliny vystaveny novým stresům a stimulům. Pochopení funkce signálních drah rostlin je tudíž esenciální pro dlouhodobou a udržitelnou budoucnost zemědělství.

2 Cíle práce

1. Zpracovat odbornou literaturu zaměřenou na mitogen aktivované protein kinázy (MAPK) v *Medicago sativa* a dalších rostlinných druzích. Dále na přehled signálních drah MAPK při vývinu a odpovědi na stres a také v souvislosti s regulací cytoskeletu a interakce rostliny s mikroorganismy.

2. Praktická část bude zaměřena na klonování konstruktů pro fúzní protein YFP-OMTK1 metodou MultiSite Gateway klonování, transientní transformaci listů *Nicotiana benthamiana* tímto konstruktem a také metody detekce exprese fúzních proteinů mikroskopicky a metodami PAGE a Western blot.

3 Literární přehled

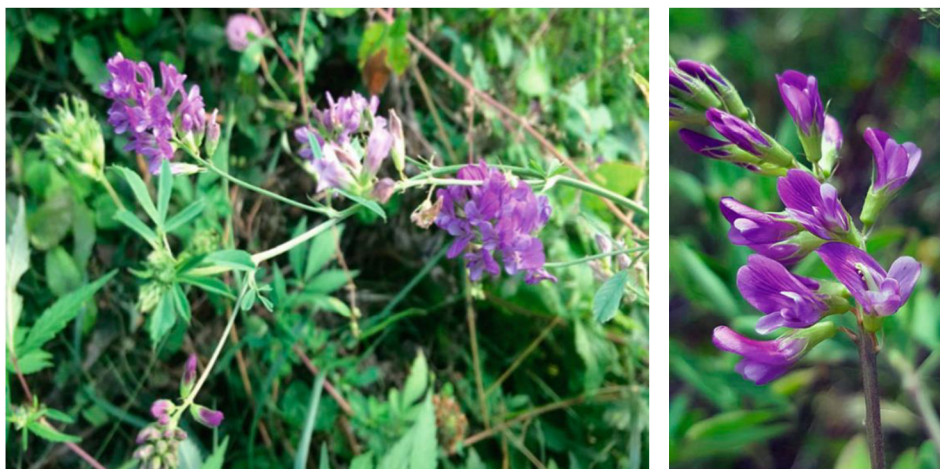
3.1 Tolice vojtěška (*Medicago sativa* L.)

Tolice vojtěška (*M. sativa*) je víceletá bylina vysoká 30 cm až jeden metr viz Obrázek 1. Má trojčetné řapíkaté listy, modrofialové květy a plodem je ledvinovitě nebo spirálovitě stočený lusk. *M. sativa* je vysoce ceněná luštěnina, která produkuje více bílkovin na hektar než jakákoli jiná plodina pro hospodářská zvířata. V některých částech Ruska a Číny se mladé listy používají taktéž jako zelenina. *M. sativa* lze též pěstovat jako krycí plodinu za účelem snížení eroze a zvýšení výnosnosti jiných rostlin, například brambor, rýže, okurek, salátu nebo kukuřice. Rostlina je původem z jihozápadní Asie, divoký typ se nachází na Kavkazu a v horských oblastech Afghánistánu, Íránu a přilehlých regionech. Dnes pěstěná podoba vznikla pravděpodobně v západní Persii (Duke, 1981).

3.2 Obecná charakteristika mitogenem aktivované protein kinázy

Aktivace kináz v kaskádách mitogenem aktivovaných protein kináz (MAPK) je běžný a evolučně konzervovaný mechanismus přenosu signálu. Tyto kaskády spolupracují při přenosu různých extracelulárních signálů, a tak řídí velké množství odlišných, a dokonce protichůdných buněčných procesů, jako je proliferace, buněčné dělení, diferenciace, vývoj, stresová reakce a apoptóza (Keshet *et* Seger, 2010).

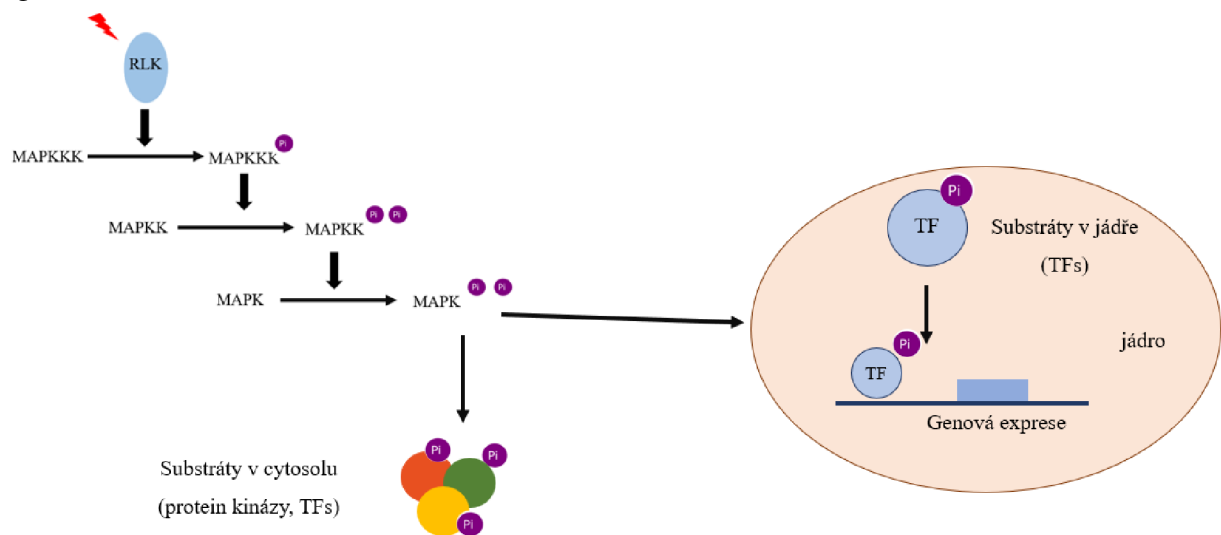
MAPK jsou exprimovány ve všech eukaryotických buňkách a patří k nejlépe prostudovaným systémům pro přenos signálu. Základní sestavou cest MAPK je tříložkový model, který zahrnuje tři kinázy, které vytvářejí sekvenční aktivační dráhu zahrnující MAPK kinázovou kinázu (MKKK, MAPKKK, MEKK), MAPK kinázu (MKK, MAPKK, MEK) a MAPK viz



Obrázek 1: Studovaná rostlina *Medicago sativa* foceno v Pakistanu, autor Wahid Hussain (převzato z Hammad *et al.*, 2021)

Obrázek 2. Tento základní MAPK model kaskády skládající se ze tří kináz je vysoce konzervovaný od člověka až po kvasinku. Ovšem o regulaci aktivity MAPKKK a signálních drahách mezi receptory a MAPKKK v rostlinách je známo jen velmi málo (Widmann *et al.*, 1999). Ve většině případů je jeden modul MAPK zodpovědný za aktivaci více reakcí v rostlině. Identifikace a funkční charakterizace modulů MAPK zapojených v biotickém a abiotickém stresu má praktickou hodnotu pro zlepšování plodin (Sinha *et al.*, 2011).

Princip přenosu signálu v kaskádě je zajištěn fosforylací, kdy MAPK je aktivována MAPK kinázou (MAPKK), která je sama aktivována jinou serin/threoninovou MAPKK kinázou (MAPKKK). Takto aktivovaná MAPK se následně váže na specifické substráty (Whitmarsh *et Davis*, 1998). Prvním krokem přenosu signálu je aktivace MAPKKK stimulací receptorů plazmatické membrány. MAPKKK následně aktivují MAPKK fosforylací dvou serinových a/nebo threoninových zbytků, v motivu S/T-X₅-S/T (kde X značí libovolnou aminokyselinu) v T-smyčce. MAPK jsou následně aktivovány MAPKK prostřednictvím duální fosforylace konzervovaných zbytků threoninu a tyrosinu motivu TXY umístěném v aktivační T-smyčce mezi kinázovými subdoménami VII a VIII. MAPK aktivují různé efektorové proteiny v cytoplazmě nebo jádře, včetně jiných kináz, enzymů, cytoskeletálních proteinů nebo transkripčních faktorů. Interakce mezi kinázami jsou zprostředkovány dokovacími místy signál



Obrázek 2: Schéma základního modelu kaskády mitogenem aktivované protein kinázy (MAPK), která se skládá ze tří kináz. Aktivace MAPKKK pomocí receptoru podobné protein kináze (RLK) vede k postupné fosforylaci a následné aktivaci MAPKK a MAPK. MAPK následně fosforyluje substráty například transkripční faktory (TFs), které regulují genovou expresi. (upraveno v PowerPoint podle Danquah *et al.*, 2014; Widmann *et al.*, 1999).

v samotných enzymech anebo vnějšími scaffold (z ang. lešení) proteiny (Ichimura *et al.*, 2002; Jagodzick *et al.*, 2018).

Krystalová struktura ERK2 (extracellular signal-regulated protein kinases 2), savčí MAPK, navrhuje vysvětlení, proč je pro aktivaci této skupiny protein kináz nezbytná jedinečná duální fosforylace. Thr183 a Tyr185 z ERK2 jsou obsaženy ve smyčce, která spojuje kinázové subdomény VII a VIII. Thr183 je přítomen na povrchu smyčky, a proto je přístupný pro MAPKK MEK1, zatímco Tyr185 je ukryt v hydrofobní kapse. Oba zbytky musí být fosforylovány, aby se ERK2 aktivoval. MEK1 musí nejprve fosforylovat Thr183 a následná konformační změna ERK2 zpřístupňuje Tyr185 pro následnou fosforylaci (Canagarajah *et al.*, 1997).

Dokončení projektu sekvenování genomu *A. thaliana* odhalilo existenci 20 MAPK, 10 MAPK kináz a 60 domnělých MAPKK kináz. Skupina MAPKKK tvoří největší a nejheterogennější skupinu komponent kaskády MAPK. Na základě sekvenční analýzy lze MAPKKK z *A. thaliana* rozdělit do tří hlavních tříd, a to MEKK-like (21 členů), Raf-like (48 členů) a ZIK-like (11 členů). Ačkoli jsou Raf-like i ZIK-like kinázy jednoznačně členy rodiny MAPKKK, nebylo potvrzeno, že by fosforylovaly MAPKK v rostlinách (Chardin *et al.*, 2017; Danquah *et al.*, 2014).

Rostlinné MAPKK lze dělit do čtyř skupin. Skupina A MAPKK zahrnuje MKK1, MKK2 a MKK6 z *A. thaliana*. Bylo zjištěno, že tyto MAPKK jsou zapojeny v reakci na chlad, zasolení nebo patogeny. Skupina B MAPKK v *A. thaliana* má pouze jednoho člena, MKK3. Do skupiny C MAPKK patří v *A. thaliana* MKK4 a MKK5 reagující při regulaci imunity, růstu nebo vývoje rostlin. Mezi MAPKK skupiny D v *A. thaliana* patří MKK7, MKK8, MKK9 nebo MKK10.

Rodinu MAPK lze snadno identifikovat na základě sekvenční podobnosti a charakteristického motivu TXY. Dle sekvence aminokyselin ve střední pozici motivu TXY lze rostlinné MAPK rozdělit na dva podtypy, podtyp TEY, který je příbuzný kvasinkovým a živočišným ERK, a podtyp TDY, který je specifický pro rostliny. Podtyp TEY lze rozdělit do tří skupin A, B a C, zatímco podtyp TDY tvoří vzdálenější skupinu D. MAPK skupiny A se nejčastěji podílejí na environmentálních a hormonálních reakcích, mezi zástupce z rostliny *M. sativa* patří SIMK podílející se na reakcích spojených se solným stresem nebo SAMK, která je aktivována při biotickém a abiotickém stresu, z rostliny *A. thaliana* MPK3 a MPK6. MAPK skupiny B, kam patří MPK4, MPK5, MPK11, MPK12 a MPK13 z *A. thaliana*, se taktéž podílejí jak na reakcích na stres z prostředí, tak na růstu a vývoji rostliny. O MAPK skupiny C není známo mnoho informací a vyžadují další výzkum, patří sem MPK1, MPK2, MPK7

a MPK14 z *A. thaliana*. MAPK skupiny D se vyznačují motivem TDY v T-smyčce a prodlouženou C-koncovou oblastí ve srovnání se skupinami A, B a C. MAPK skupiny D také postrádají C-koncovou CD doménu, která se vyskytuje u členů ostatních skupin MAPK. Mezi zůstupce z rostliny *A. thaliana* sem patří MPK8, MPK9 a MPK15 až MPK20 (Ichimura et al., 2002; Zhang et Zhang, 2022).

3.3 Signalizace vybraných MAPK při útoku patogenů

Rostliny mají různé strategie při obraně proti patogenům. Vrozená imunitní reakce působí v rostlinném imunitním systému jako přední linie obrany, může být aktivována molekulárními vzory asociovanými s patogeny/mikroby PAMPs/MAMPs (pathogen/microbe-associated molecular patterns) nebo molekulárními vzory asociovanými s poškozením DAMPs (damage-associated molecular patterns). Receptory rozpoznávání vzorů lokalizované na plazmatické membráně rostlinných buněk vnímají konzervované složky a aktivují navazující obranné reakce, mnohé z těchto receptorů patří mezi receptorům podobné protein kinázy (RLKs) (Boller et Felix, 2009). Rostlinné NB-LRR (nucleotide-binding leucine-rich repeat), typ receptoru obsahující nukleotid-vázající doménu a opakující se sekvence bohaté na leucin, většinou rozpoznávají polymorfní efektory, které nejsou mezi mikroby konzervovány. Proto se silná rezistenční odpověď vyvolaná rostlinnými NB-LRR označuje jako tzv. efektem spouštěná imunita. Tento proces může zahrnovat například programovanou buněčnou smrt, syntézu obranného hormonu kyseliny salicylové nebo indukci obranných genů (Li et al., 2015b).

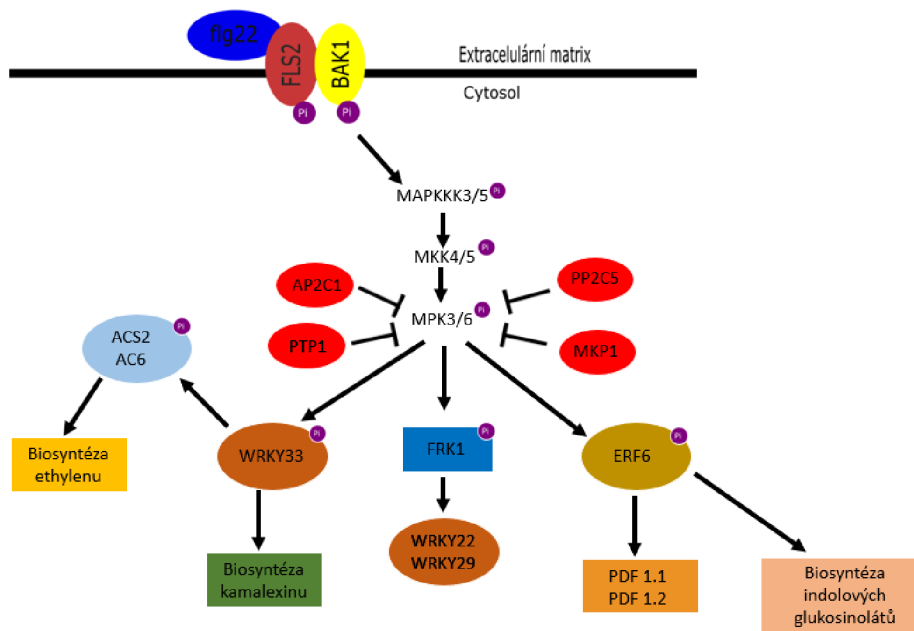
Modul, jehož kaskádu tvoří MEKK1-MEK1/2-MPK4 byl objeven metodou kvasinkové 2-hybridní analýzy a komplementačního testu kvasinkových mutantů. Takto bylo zjištěno, že jednotlivé složky spolu interagují a tvoří specifickou kaskádu MAPK v *A. thaliana*. Jednalo se o první důkaz kaskády MAPK u rostlin (Mizoguchi et al., 1998). Upstream komponenty MAPK kaskád reagujících v obraně proti patogenům jsou receptory rozpoznávající molekuly typické pro patogeny PRRs (pattern-recognition receptors). PRRs obvykle rozpoznávají PAMPs. Patří mezi ně například receptorové kinázy bohaté na leucin (LRR-RK) FLS2 (flagellin sensing 2 receptor) a EFR (elongation factor EF-Tu receptor) a jejich koreceptor BAK1 (brassinosteroid insensitive 1-associated receptor kinase 1) (Shan et al., 2008). MEKK1 je velmi dobře prostudovaná MAPKKK zapojená do mnoha signálních drah. Je taktéž označována jako AtMEKK1, ARAKIN nebo MAPK/ERK kináza kináza (Ref. 2).

Při hledání supresorů autoimunitního fenotypu *mkk1* a *mkk2* byl identifikován protein SUMM2 (suppressor of *mkk1 mkk2* 2) obsahující nukleotid-vázající doménu a opakující se sekvence bohaté na leucin (NB-LRR). Bylo rovněž zjištěno, že kaskáda negativně reguluje

imunitu zprostředkovanou proteinem SUMM2. Dále kaskáda pozitivně reguluje bazální obranu cílenou na patogenní efektor *Pseudomonas syringae* HopAI1, který inhibuje kinázovou aktivitu MPK4. Inaktivace MPK4 pomocí HopAI1 vede k aktivaci obranných reakcí zprostředkovaných SUMM2 (Zhang *et al.*, 2012). Nově bylo zjištěno, že MKK6 funguje podobně jako MKK1/MKK2 a spolupracuje s MEKK1 a MPK4, aby zabránila auto-aktivaci obranných reakcí zprostředkovaných SUMM2, a to v kaskádě MEKK1-MEK1/2/6-MPK4 (Lian *et al.*, 2018).

MPK4 má mnoho substrátů, je přítomna při expresi přibližně 50 % genů indukovaných flg22 (flagelin 22) bakteriálním peptidem bičíku (Frei dit Frey *et al.*, 2014). Jedním ze substrátů je CRK3 (calmodulin-binding receptor-like cytoplasmic kinase 3), který asociuje s proteinem SUMM2. Pokud je CRK3 fosforylován proteinem MPK4, dojde k zablokování imunity zprostředkované proteinem SUMM2 (Zhang *et al.*, 2017). Dalším substrátem MPK4 je PAT1 (protein associated with topoisomerase II), který se váže na transkripty v eukaryotických buňkách. PAT1 je zodpovědný za odstranění čepičky z 5' konce mRNA. Absence PAT1 vede k aktivaci obranných reakcí závislých na SUMM2 (Roux *et al.*, 2015). Zajímavé je, že MPK4 může též negativně ovlivňovat expresi genů v reakci na flg22, a to fosforylací transkripčního represoru ASR3 (*Arabidopsis* SH4-related3) (Li *et al.*, 2015a). Pokud MPK4 fosforyluje MKS1 (MAP kinase substrate 1) dojde ke spuštění obranných reakcí spojených s jasmonáty a salicyláty (Qiu *et al.*, 2008).

Další kaskádou reagující na patogeny tvoří MAPKKK3/5-MKK4/5-MPK3/6. Tato kaskáda v reakci na patogeny aktivuje downstream komponenty viz Obrázek 3 (Asai *et al.*, 2002; Bi *et al.*, 2018; Sun *et al.* 2018). Bylo zjištěno, že MAPKKK3 a MAPKKK6 aktivují kaskádu v reakci na flg22, nlp20 (Nep1-like protein 20), chitin a pep1 (protein effector protein 1), které patří mezi PAMPs a DAMPs. Zajímavé je, že MPK6 zpětně fosforyluje MAPKKK5, což následně zvyšuje aktivaci MPK3/6. Dá se předpokládat, že se jedná o pozitivní zpětnovazebnou regulaci (Bi *et al.*, 2018). MAP3/6 aktivují mnoho substrátů, zde jsou uvedeni zástupci spojení se signalizací v reakci na patogeny. Substrátem MPK3/MPK6 je FRK1 (flg22-induced receptor-like kinase 1), který aktivuje transkripční faktory WRKY22 a WRKY29, které spouštějí imunitní odpověď (Asai *et al.*, 2002). MPK3 a MPK6 mohou v reakci na patogen *Botrytis cinerea* spustit transkripční faktor WRKY33, který spouští biosyntézu kamalexinu, hlavního fytoalexinu v *A. thaliana*. Dalším substrátem MPK3 a MPK6 je ERF6 (ethylen response factor 6). ERF6 aktivuje geny *PDF1.1* a *PDF1.2* v reakci na houbový patogen *Botrytis cinerea*.



Obrázek 3: Signalizační dráha MAPK u *A. thaliana* v reakci na patogeny. Rozpoznání PAMPs probíhá na membráně pomocí receptorů, které aktivují kaskádu MAPKKK3/5-MKK4/5-MPK3/6. Mezi obranné reakce spuštěné touto kaskádou patří aktivace ACS2/6, která podporuje biosyntézu ethylenu, dále aktivace WRKY 33 vedoucí k biosyntéze kamalexinu, fosforylace WRKY22/29 a fosforylace ERF6 vedoucí k aktivaci genů *PDF1.1* a *PDF1.2* a biosyntéze indolových glukosinolátů. Jako negativní regulátory fungují fosfatázy AP2C1, PTP1, PP2C5 a MKP1 (upraveno v PowerPoint podle Sharma *et al.*, 2020; Sun *et Zhang*, 2022).

Geny *PDF1.1* a *PDF1.2* jsou zapojeny v obranných reakcích proti patogenům (Meng *et al.*, 2013). Taktéž se podílí na fosforylaci WRKY 33, ACS2 a ACS6 (1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid synthase 2/6) vedoucích k biosyntéze ethylenu (Li *et al.*, 2012) a aktivaci biosyntézy indolových glukosinolátů (IGS) (Xu *et al.*, 2016).

V signalizaci jsou zapojeny též fosfatázy, které jsou negativní regulátory MAPKs. Ser/Thr fosfatáza AP2C1 inaktivuje MAPKs MPK4 a MPK6 (Schweighofer *et al.*, 2007). Další fosfatázou způsobující inaktivaci především v jádře je fosfatáza PP2C5 (protein phosphatase 2C 5) (Brock *et al.*, 2010). Fosfatáza s duální specifitou MAPK fosfatáza 1 (MKP1) a protein tyrosin fosfatáza 1 (PTP1) se taktéž podílí na downregulaci MPK3 a MPK6, což naznačují jejich zvýšené bazální hladiny u rostlin s mutanty *mkp1* a *ptp1* (Bartels *et al.*, 2009).

3.4 Kaskády MAPK zapojené v růstu a vývinu

Kaskády MAPK se podílejí na téměř všech aspektech růstu a vývoje rostlin, včetně gametogeneze, embryogeneze, morfogeneze, senescence, abscise, oplození a tvorby semen. Hrají klíčovou roli jak v buněčné proliferaci, tak v buněčné diferenciaci, což jsou dva klíčové

procesy v růstu a vývoji organismu. Různorodost substrátů MAPK a jejich specifita dává kaskádám MAPK obrovskou sílu řídit rozmanité biologické procesy (Xu *et al.*, 2015).

Kaskáda MAPK složená z NPK1-NQK1-NRK1 hraje zásadní roli v rostlinné cytokinezi u *Nicotiana tabacum*. NPK1 (*Nicotiana* protein kinase 1) z tabáku patří mezi MAPKKK. Protein NPK1 je lokalizován na buněčné desce v dělicích se buňkách a je nezbytný při jejím růstu k okrajům mateřské buňky během cytokineze. NPK1 je aktivován vazbou dvou kinesinu podobných proteinů NACK1 a NACK2 v pozdní M-fázi buněčného cyklu. NPKK1 (MAPKKK) fosforyluje NQK1 (MAPKK), která následně fosforylací aktivuje NRK1 (MAPK) (Banno *et al.*, 1993; Nishihama *et al.*, 2001; Soyano *et al.*, 2003). Protein NRK1 fosforyluje protein MAP65-1 (microtubule-associated protein 65-1), který je nezbytný pro stabilitu anafázových vřetének během cytokineze. Fosforylace probíhá na threoninovém zbytku v poloze 579 proteinu MAP65-1a. Množství fosforylovaného proteinu MAP65-1 se zvyšuje během pozdní fáze M buněčného cyklu, kdy je NRK1 aktivován. Fosforylovaný MAP65-1 se stejně jako NRK1 koncentruje v oblasti fragmoplastu. Fosforylace MAP65-1 vede k destabilizaci mikrotubulů fragmoplastu a následně k expanzi fragmoplastu a buněčnému dělení (Sasabe *et al.*, 2006).

Pomocí reverzní genetiky byly izolovány rostliny nesoucí knokautované („knock-out“ mutované) alely genů MAPKKK *ANP1*, *ANP2* a *ANP3* z rostliny *A. thaliana*. Jednotlivé rostliny s inaktivovanými geny nevykazovaly žádné abnormální fenotypy. Dvě ze tří sledovaných rostlin s dvojitou mutací, konkrétně *anp2/3* a *anp1/3*, vykazovaly defekty v buněčném dělení a růstu. Kombinace s trojitou mutací se po sérii pokusů jevila jako letální (Krysan *et al.*, 2002). MAPKKK *ANP1/2/3* jsou ortologní MAPKKK NPK1 z *N. tabacum*. Bylo zjištěno že *ANP1/2/3* jsou exprimovány v tkáních s aktivním dělením buněk a podílejí se na cytokinezi v kaskádě s MKK6 a MPK4 (Kosetsu *et al.*, 2010).

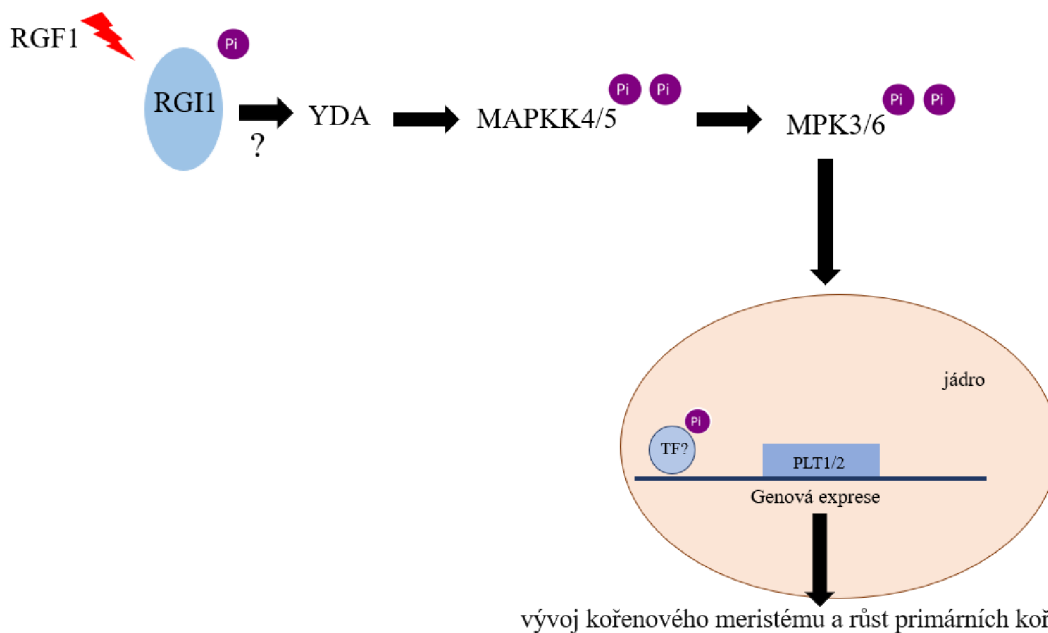
Další MAPK kaskáda ovlivňující morfologii rostlinných orgánů v *A. thaliana* je složena z YDA-MKK4/MKK5-MPK3/MPK6. YDA (YODA), známá také jako MAPK kinase kinase 4 (MAPKKK4), je upstream komponentem MKK4/MKK5. Tato kaskáda v reakci na vazbu ligand-receptor v různých typech buněk reguluje vývoj stomat, květenství nebo růst kořenů. Může být aktivována skupinou proteinových kináz podobných receptoru ERECTA, do níž patří ER, ER-LIKE1 (ERL1) a ERL2. ERECTA hraje také důležitou roli při lokalizované buněčné proliferaci, která určuje stavbu květenství, tvar jednotlivých orgánů a jejich velikost (Bemis *et al.*, 2013; Meng *et al.*, 2012). EPF2 (epidermal patterning factor 2) a EPF1 jsou peptidové ligandy komplexu receptorů ERECTA, tyto ligandy jsou exprimovány specificky v podskupině buněk stomatální linie. Aplikace EPF2 vyvolala rychlou fosforylací signální kaskády *in vivo*,

což vedlo k inhibici vývoje stomat. Peptidový ligand Stomagen je pozitivním regulátorem tvorby stomat. Tento ligand se váže na ERECTA namísto EPF2 a potlačuje aktivaci kaskády MAPK, čímž podporuje tvorbu stomat (Lee *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2015). Peptidové ligandy EPFL4 a EPFL6, které se taktéž váží na receptory ERECTA, působí jako pozitivní regulátory růstu květenství (Uchida *et al.*, 2012).

Dalším substrátem MPK3/6 je transkripční faktor typu helix-smyčka-helix SPCH (speechless), který podporuje iniciaci asymetrického buněčného dělení. Zakládání nových buněčných linií během vývoje často vyžaduje narušení symetrie. Asymetrické dělení v epidermis rostlin iniciuje vytváření buněk stomat. Stomata zajišťují výměnu plynů mezi rostlinami a atmosférou, napomáhají fotosyntéze, koloběhu vody a uhlíku v rostlině (Lampard *et al.*, 2008; MacAlister *et al.*, 2007). Bylo zjištěno, že fosforylovaný BASL (breaking of asymmetry in the stomatal lineage) funguje jako scaffold (z angl. lešení) protein, který řídí subcelulární lokalizaci YDA a MPK3/6. BASL lokalizovaný v buněčné kůře stomatálních buněk, kde zvyšuje koncentraci signalizace MAP kináz, čímž dochází k pozitivní zpětné reakci, jelikož aktivovaná MPK3/6 může opět fosforylovat BASL. Zároveň aktivovaná MPK3/6 může fosforylovat SPCH, čímž inhibuje tvorbu stomat (Zhang *et al.*, 2015).

Samčí gametogeneze rostlin zahrnuje komplexní a dynamické změny v genové expresi. MAPKs MPK3/MPK6 jsou schopny fosforylovat různé WRKY homology v odlišných biologických procesech. WRKY34, substrát MPK3/MPK6 *in vivo*, se exprimuje při regulaci vývoje a funkce pylu. WRKY34 je fosforylován během časně samčí gametogeneze a je defosforylován těsně před dozráváním pylu. WRKY34 je spolu s WRKY2 nezbytný pro samčí gametogenezi. Mutace *wrky34* i *wrky2* výrazně snižují životaschopnost pylu, což je spojeno se sníženou klíčivostí a menším růstem pylových trubic, a to jak *in vitro*, tak *in vivo* (Guan *et al.*, 2014).

Dále byla identifikována kaskáda RGF1-RGI1-YDA-MKK4/5-MPK3/6-PLT1/2 viz Obrázek 4. RGF1 (root meristem growth factor 1) je peptidový hormon a RGI (RGF1 insensitives) je proteinová kináza podobná receptorům bohatým na leucin (LRR-RLK). RGF1-RGI spolu působí jako ligand a receptor, který spouští kaskádu YDA-MKK4/5-MPK3/6, která následně aktivuje transkripční faktory PLT1/2 (plethora 1/2). Tato kaskáda řídí vývoj kořenového meristému a růst primárních kořenů v *A. thaliana*. Ovšem část komponentů této signální dráhy stále vyžaduje identifikaci, předpokládá se, že peptidový hormon RGF1 nefosforyluje přímo MAPKKK YDA, tudíž je možné, že neznámá RLK lokalizovaná



Obrázek 4: Signalizační dráha MAPK u *A. thaliana* v regulaci vývoje kořenového meristému a růstu primárních kořenů. Model signalizační kaskády, kde RGF1-RGI1 působí jako ligand-hormon aktivující MAPK dráhu YDA-MKK4/5-MPK3/6, která aktivuje transkripční faktory *PLT1/2* (upraveno v PowerPoint dle Lu *et al.*, 2020).

na plazmatické membráně spojuje RGI a YDA. Kromě toho nebyly odhaleny transkripční faktory regulující expresi *PLT1* a *PLT2* (Lu *et al.*, 2020).

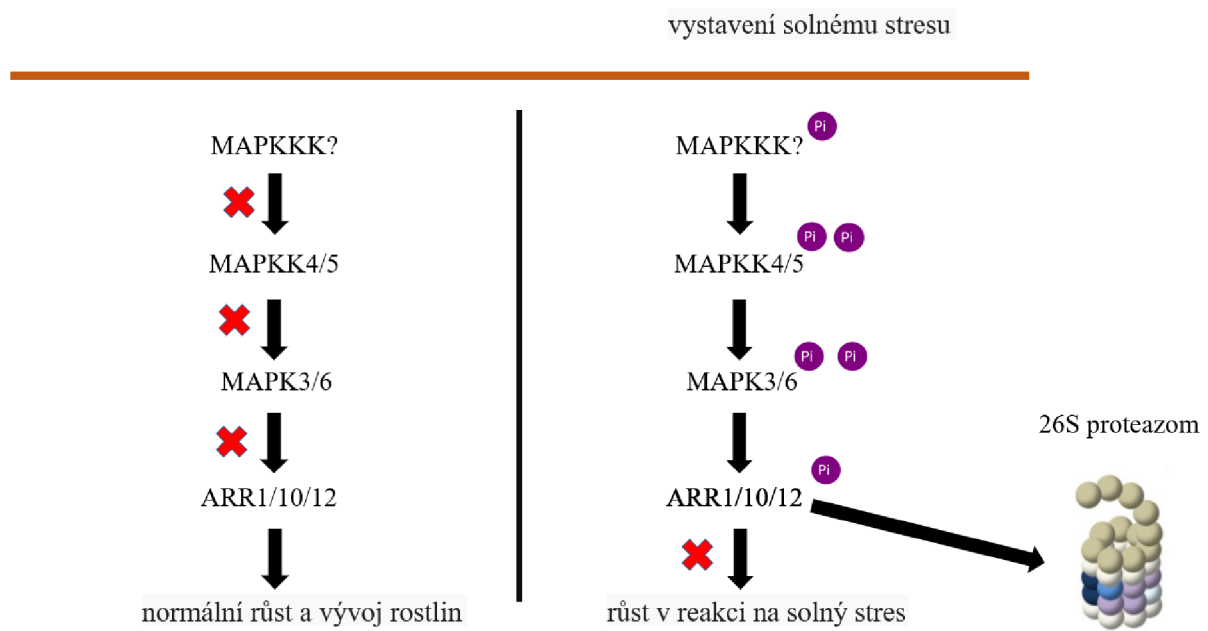
V rostlině *M. trunculata* byl pomocí metod reverzní genetiky identifikován MtMAPKK4, který hraje zásadní roli v růstu a vývinu. Homozygotní mutanti *mapkk4^{-/-}* se jeví jako letální, zatímco heterozygotní mutanti *mapkk4^{+/-}* vykazovaly zpomalení růstu, příznaky chlorózy a snížený počet infekčních vláken a nodulů. Tento jev naznačuje zapojení MAPKK4 v signalizaci se symbiotickými bakteriemi. Dále bylo zjištěno, že MtMAPKK4 interaguje s proteiny MtMAPK3 a MtMAPK6 (Chen *et al.*, 2017).

3.5 Kaskády MAPK zapojené v abiotickém stresu

Chladový stres omezuje zeměpisné rozšíření rostlin a ovlivňuje jejich růst, vývoj a výnosy. Rostliny si vyvinuly složité biochemické a fyziologické mechanismy, aby se přizpůsobily chladovému stresu. ICE1 (inducer of CBF expression 1) je hlavním pozitivním regulátorem transkripčních faktorů CBF (C-repeat binding factor). Protein CBF se váže na CRT/DRE (C-repeat/dehydration responsive element), který se nachází v promotoru genů regulovaných chladem *COR* (cold regulated genes), a aktivuje jejich transkripci. Tyto aktivity pak vedou k účinné toleranci vůči chladovému stresu (Hwarari *et al.*, 2022).

Bylo zjištěno, že ICE1 je substrátem MPK3 a MPK6 v *A. thaliana*. Jednotlivé mutanty *mpk3* a *mpk6* a dvojité mutanty *mpk3/6* vykazují zvýšenou toleranci vůči mrazu, zatímco aktivace MPK3/MPK6 toleranci vůči mrazu oslabuje. MPK3/6 v kaskádě MKK4/5-MPK3/6 aktivované chladem fosforyluje ICE1 a podporuje jeho degradaci, čímž negativně regulují odpověď na chlad. Zatímco MPK4 v kaskádě MEKK1-MKK2-MPK4 pozitivně reguluje chladovou odpověď potlačením aktivity MPK3 a MPK6. MAPKKK YDA a dvě vápníkem/kalmodulinem regulované receptorům podobné protein kinázy CRLK1 a CRLK2 (calcium/calmodulin-regulated receptor-like kinases 1/2) taktéž negativně regulují aktivaci MPK3/MPK6, čímž regulují i reakci rostlin na chlad (Li *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2017).

MPK3 a MPK6 interagují s klíčovými složkami cytokininové signalizace ARR1, ARR10 a ARR12 (*Arabidopsis* response regulator 1/10/12) a fosforylují je, čímž podporují jejich degradaci v reakci na solný stres viz Obrázek 5. Byla zaznamenána snížená tolerance k soli u dvojitého mutantu *mpk3/6*. Zároveň byla tolerance k soli zvýšena při aktivaci MPK3/MPK6 v linii *MKK5^{DD}*, což je konstitutivně aktivní forma MKK5, která byla vytvořena mutací dvou aminokyselin na kyselinu asparagovou (Yan *et al.*, 2021).



Obrázek 5: Signalizační dráha MAPK u *A. thaliana* v reakci na solný stres. Za normálních podmínek růstu jsou MPK3/6 méně aktivní a ARR1/10/12 udržují optimální cytokininovou odpověď pro kontrolu růstu a vývoje rostlin. Vystavení rostliny vysoké salinitě aktivuje MPK3/6, které fosforylují ARR1/10/12, což vede k jejich degradaci prostřednictvím proteazomu 26S (upraveno v PowerPoint podle Schipper-Krom *et al.*, 2019; Yan *et al.*, 2021).

3.6 MAPK u *Medicago sativa*

3.6.1 OMTK1

Primární struktura domnělé C-terminální kinázové domény genu *OMTK1* vykazovala 68,1%, 65%, 64,9%, 60,6%, 40,9% a 23,6% identitu s kinázovými doménami genů z *A. thaliana* *MEKK1*, *MEKK2*, *MEKK3*, *MEKK4*, *ANP1* a *CTR1*. Tato podobnost naznačuje, že OMTK1 patří mezi rostlinné MAPKKK, N-koncová nekatalytická oblast OMTK1 nevykazovala žádnou významnou podobnost se známými funkčními sekvenčními motivy.

MAPKKK OMTK1 fúzovaná na C-konci Myc epitopem byla koexprimována společně se čtyřmi dalšími MAPK značenými hemaglutininem v protoplastech *A. thaliana*. Byla zjištěna aktivace MAPK MMK3-HA, u zbylých tří MAPK SIMK-HA, MMK2-HA a SAMK-HA nebyla zaznamenána zvýšená aktivita. HA-tag epitop je krátká peptidová sekvence odvozená od hemaglutininu (HA). HA-tag a Myc-tag epitop lze následně detekovat primárními protilátkami. Za účelem určení stimulů, které regulují aktivitu OMTK1 byly OMTK1-Myc a MMK3-HA koexprimovány v protoplastech *A. thaliana*. Pro zjištění stimulu byly protoplasty ošetřeny postupně NaCl, aminocyklopropan-1-karboxylovou kyselinou (ACC), H₂O₂, kvasinkovým elicitorem, inhibítorem proteazomu MG115, methyljasmonátem, kyselinou salicylovou, kyselinou abscisovou, benzylalkoholem, kyselinou 1-naftylenoctovou, kinetinem a chladovým stresem. Bylo zjištěno, že H₂O₂ silně aktivuje MMK3-HA v kombinaci s OMTK1-Myc. Pozoruhodné je, že samotná MMK3-HA v přítomnosti H₂O₂ aktivována nebyla. MMK3-HA byla aktivována peroxidem vodíku při koncentraci nad 200 μmol·l⁻¹. K aktivaci došlo za 5 minut a trvala po dobu 90 minut. Byla analyzována viabilita buněk v přechodně transformovaných protoplastech *A. thaliana*. V buňkách s MMK3-HA byla pozorována mírná indukce buněčné smrti, zatímco buňky s koexpresí OMTK1-Myc a MMK3-HA vykazovaly velkou míru buněčné smrti bez i po ošetření peroxidem vodíku.

Za účelem identifikace zjištění katalytické části genu *OMTK1* zodpovědné za aktivaci MMK3 byl zkonstruován ΔOMTK1 zkrácený o domnělou N-terminální doménu (aminokyseliny 1-310). Byla zaznamenána slabá aktivace MMK3-HA proteinem ΔOMTK1-Myc, což naznačuje, že N-terminální nekatalytická doména může přispívat k vazbě s MAPK. Koexprese ΔOMTK1 a MMK3 také indukovala buněčnou smrt, ovšem míra buněčné smrti byla ve srovnání s OMTK1 a MMK3 plné délky výrazně nižší (Nakagami *et al.*, 2004).

Při hledání MAPKK, která by interagovala s MMK3 a OMTK1 v kaskádě byly testovány tři MAPKK izolované z *M. sativa* MsMKK1, PRKK a SIMKK. Ačkoli studie prokázala jistou interakci s OMTK1 *in vitro*, tak přidání těchto MAPKK inhibovalo aktivaci MMK3

prostřednictvím OMTK1 v protoplastech. Funkci této MAPKK tudíž pravděpodobně plnila v protoplastech neidentifikovaná endogenní MAPKK z *A. thaliana*. Specifita reakce OMTK1 a MMK3 naznačuje, že OMTK1 by mohlo být tzv. scaffold proteinem (Nakagami *et al.*, 2004). Scaffold (z angl. lešení) proteiny dokáží navázat a přivést dva nebo více signálních proteinů do blízkosti. Takto následně řídí tok informací v buňce, a to mimo jiné aktivací, koordinací anebo regulací signálních drah (Buday *et Tompa*, 2010).

3.6.2 MMK3

Protein MMK3 je zapojen v regulaci rostlinné cytokineze. Jeho přítomnost byla detekována ve všech fázích buněčného cyklu, ale jeho protein kinázová aktivita byla přechodná v mitóze a korelovala s načasováním tvorby fragmoplastu. Depolymerizace mikrotubulů po ošetření léčivem amiprofos methyl (látka destabilizující mikrotubuly) během anafáze a telofáze způsobila přerušení aktivity MMK3. Zároveň bylo zjištěno, že během anafáze se MMK3 koncentruje mezi segregujícími chromozomy a následně se lokalizuje na střední rovině buněčného dělení ve fragmoplastu. Přestože během telofáze byly mikrotubuly ve fragmoplastu redistribuovány ze středu na periferii, protein MMK3 se stále lokalizoval v celé rovině dělení. Mikrotubuly ve fragmoplastu tedy nejsou nutné k udržení MMK3 na tomto místě (Bögge *et al.*, 1999).

MAP kinázy SIMK a MMK3 jsou zapojeny v biosyntéze ethylenu. U obou MAPK byla zjištěna silná aktivace ethylenovým prekurzorem aminocyklopropan-1-karboxylovou kyselinou (ACC). Při hledání procesu aktivace transienční exprese v protoplastech *A. thaliana* byl určen ethylenový receptor ETR1. Histidin kináza ETR1 funguje jako ethylenový receptor, který aktivuje CTR1 (constitutive triple response 1) v nepřítomnosti ethylenu. CTR1 je negativním regulátorem MAPKK SIMKK a MAPK SIMK a MMK3, které působí jako regulátory cílových genů *EIN2* a *EIN3* (ethylene insensitive 2/3) (Ouaked *et al.*, 2003). MAPKK SIMKK dokáže aktivovat MMK3 bez předchozí aktivace upstream komponenty. MAPKK PRKK, která aktivuje MMK3 v reakci na patogenní elicitor, vyžaduje nejdříve aktivaci upstream komponenty. Zajímavým zjištěním bylo, že při absenci extracelulárních signálů SIMKK aktivovala SIMK a SAMK, ovšem nikoli MMK3. Po působení patogenních elicitorů SIMKK silně aktivovala SIMK a MMK3, ovšem SAMK téměř ne. Při solném stresu SIMKK aktivovala SIMK, ale nikoli MMK3 nebo SAMK. Tato specifita při působení různých signálů by mohla být dosažena scaffold (z angl. lešení) proteiny, které byly již identifikovány u kvasinkových a živočišných MAPK kaskád (Cardinale *et al.*, 2002) a nově i u rostlin (Zhang *et al.*, 2015).

Byla zjištěna aktivace MMK3 po vystavení kořenů semenáčků *M. sativa* těžkými kovy mědi a kadmia. Měď je důležitý mikroelement, který je nezbytný pro normální růst a vývoj rostlin. Nadměrné množství mědi je však škodlivé v důsledku produkce ROS autooxidací a Fentonovou reakcí. Kadmium nemá žádnou známou biologickou funkci, je vysoce reaktivní a inaktivuje různé enzymatické procesy. V důsledku toho je kadmium obecně toxické pro všechny živé buňky. Po srovnání kinetiky aktivace se ukázalo, že MMK3 je velmi rychle aktivována ionty mědi, zatímco ionty kadmia vyvolávají opožděnou aktivaci (Jonak *et al.*, 2004).

3.6.3 SIMK

SIMK (salt stress-induced MAPK) je patogenním elicitorem (Cardinale *et al.*, 2002) a solným stresem indukovaná MAPK v *M. sativa*. Rostlinný růst je silně ovlivněn hyperosmotickým solným prostředím. Bylo zjištěno, že 46 kDa protein kináza SIMK nacházející se v *M. sativa* je aktivována zvýšenými koncentracemi soli, a to nad $125 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl. SIMK se dále podařilo aktivovat také KCl a sorbitolem, což naznačuje, že dráha SIMK se podílí na zprostředkování obecných hyperosmotických stavů. Solný stres vyvolává rychlou, ale přechodnou aktivaci SIMK, která vykazuje maximální aktivitu mezi 8 a 16 minutami před následnou pomalou inaktivací (Munnik *et al.*, 1999). Bylo zjištěno, že zvýšená exprese a snížená exprese SIMK a SIMKK způsobuje změny v růstu kořenových vlásků, nodulů a listů. Zatímco snížená exprese SIMKKi způsobila jejich menší vzrůst, tak zvýšená exprese GFP-SIMK způsobila zvýšení biomasy v nadzemní části rostlin (Hrbáčková *et al.*, 2020). Pro zjištění reakce na nadbytek mědi byly značené SIMKK, SIMK a SAMK transientně exprimovány v protoplastech *A. thaliana*, byla zjištěna rychlá aktivace MAP kinázy SIMK a SAMK pomocí SIMKK. SIMK a SAMK byly aktivovány i po vystavení kadmii, ve srovnání s vystavením mědi pomalu. Aktivace ovšem nebyla zprostředkována prostřednictvím SIMKK (Jonak *et al.*, 2004).

Za pomoci kvasinkového dvouhybridního modelu bylo zjištěno, že rekombinantní SIMKK specificky aktivuje SIMK fosforylací jak threoninových, tak tyrosinových zbytků v aktivační smyčce SIMK. SIMKK obsahuje domnělé dokovací místo na N-konci, které je konzervováno v savčích MAPK kinázách, transkripčních faktorech a fosfatázách. Odstranění dokovacího místa částečně přerušuje, ale ne zcela zamezuje interakci se SIMK, což naznačuje, že na vazbě se podílejí i další domény SIMKK (Kiegerl *et al.*, 2000).

3.7 Gateway klonování

Pro porozumění funkce genu a jeho kódujících sekvencí je typicky exprimován protein, který je následně purifikován, jsou k němu vytvořeny protilátky a je určen jeho fenotyp, intracelulární

lokalizace a interakce s jinými proteiny. Klasický genetický přístup ke zkoumání biologických drah obvykle začíná identifikací mutací, které způsobují specifický fenotyp. Ovšem zvýšená exprese nebo snížená exprese produktu divokého (z ang. wild-type) genu může způsobit také mutované fenotypy, což genetikům poskytuje alternativní, ale účinný nástroj k identifikaci dílčích složek signálních drah. K tomu je potřeba vytvořit vektor s genem zájmu, jedním z možných postupů je metoda Gateway zavedena firmou Invitrogen (Hartley *et al.*, 2000; Prelich, 2012). Gateway technologie je založena na místně-specifických rekombinačních reakcích, které zprostředkovávají integraci a excizi bakteriofága λ a přepínání mezi lytickým a lyzogenním cyklem (Ptashne, 1992).

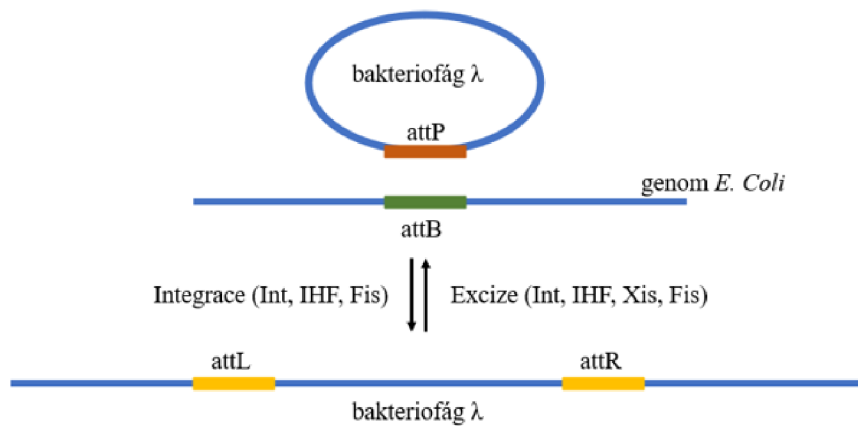
3.7.1 Místně-specifická rekombinace bakteriofága λ

Bakteriofág λ je virus, který infikuje bakterii *E. coli*. Je široce používán v molekulární biologii jako modelový organismus a jako nástroj pro genetické inženýrství. Rekombinace probíhá na specifických sekvencích nazývaných attP (z fága) a attB (z bakterie). Obě att místa jsou složena ze sedmi párů nukleotidů, tyto sekvence jsou označovány jako centrální sekvence (O), a ze dvou postranních ramen nazývaných P a P' a B a B'. Proces integrace začíná, když se několik molekul fágem kódované integrázy a bakteriálního integračního hostitelského faktoru (IHF) pevně naváže na 232 bází místa attP. Komplex se pak spojí s dvaceti jedna bázovým párem attB v bakteriálním chromozomu. Na koncích centrální sekvence obou sekvencí attP a attB se vytvoří zářezy v DNA a následuje výměna vláken mezi těmito sekvencemi. Jelikož spojené sekvence obsahují krátké homologní úseky (7 párů bází) vzniká v těchto bodech malý heteroduplexní spoj. Z Hollidayova spoje následně vzniká profág s navázanými att místy, nazývanými attL (z anglického označení pro levý) a attR (z anglického označení pro pravý). Tento proces rekombinace mezi attB a attP místy je označován jako BP reakce. Přestože je rekombinační reakce reverzibilní, je zajištěno, aby integrace nebyla okamžitě opravena excizí.

Druhou rekombinační reakcí probíhající u bakteriofága λ je excize. Při této rekombinační reakci, označované LR reakce, se zpětně rekombinují místa attL a attR za vzniku attB a attP míst. Při integraci jsou zapojeny enzymy integráza (Int), faktor pro inverzní stimulaci (Fis) a integrační faktor hostitele (IHF), při excizi je navíc zapojen enzym excizionáza (Xis) viz Obrázek 6 (Landy, 1989; Katzen, 2007).

3.7.2 Charakteristika metody Gateway klonování

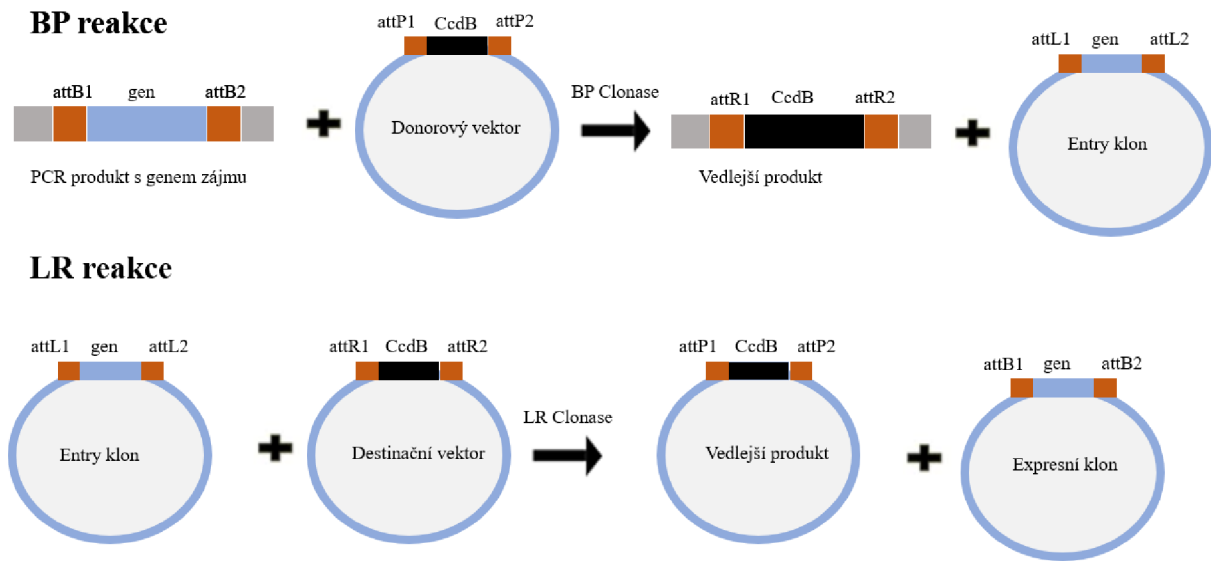
Metoda Gateway klonování využívá dvou rekombinačních reakcí BP a LR. Při BP reakci probíhá rekombinace mezi attB a attP místem. Při této reakci je vnesena nukleotidová sekvence



Obrázek 6: Schéma integrační a excizní místně-specifické rekombinace bakteriofágu λ do genomu *E. coli*. Rekombinací attP a attB míst vznikají attL a attR místa. Při integraci jsou použity enzymy integráza (Int), faktor pro inverzní stimulaci (Fis) a integrační faktor hostitele (IHF), při excizi je navíc využit enzym excizionáza (Xis) (upraveno v PowerPoint podle Abbani, *et al.* 2007).

s attB místy do donorového vektoru s odpovídajícími attP místy za vzniku entry klonu a vedlejšího produktu. Entry klon obsahuje gen zájmu mezi specifickými attL místy a vedlejší produkt obsahuje gen *CcdB* pro negativní selekci mezi specifickými attR, tento gen v bakterii *E. coli* interferuje s funkcí DNA gyrázy, zamezuje pohybu DNA polymerázy a vede ke dvouřetězcovému zlomu DNA, čímž inhibuje její růst. Reakci katalyzuje směs enzymů BP Clonase™ II, která obsahuje enzym Int z bakteriofágu λ a enzym IHF z *E. coli*. LR reakce probíhá mezi místy attL entry klonu a místy attR cílového destinačního vektoru. Reakci katalyzuje směs enzymů LR Clonase, která obsahuje enzymy Int a Xis z bakteriofágu λ a enzym IHF z *E. coli*. Touto reakcí vzniká expresní klon obsahující gen zájmu s attB místy a také jako v BP reakci vedlejší produkt obsahující gen *CcdB* s attP místy viz Obrázek 7 (Invitrogen, 2012; Wang *et al.*, 2013).

Za účelem pozitivní selekce buněk nesoucích gen zájmu nese donorový a destinační vektor různé geny rezistence vůči antibiotikům například kanamycin, spektinomycin nebo gentamycin. Pro získání úspěšně rekombinovaných genů zájmu obsahují destinační vektory gen *CcdB* pro negativní selekci. Při úspěšné rekombinaci je tento gen nahrazen nukleotidovou sekvencí s attB místy a gen *CcdB* je rekombinován do vedlejšího produktu. Gen *CcdB* kóduje toxický protein inhibující proliferaci buněk. Bakterie, které nekódují gen *CcdA* (inhibitor proteinu CcdB), umírají po přijetí plazmidu obsahujícího gen *CcdB*. Tato selekce je užitečným nástrojem pro molekulární klonování využívaná např. v kmeni *E. coli* DB3.1 (Bahassi *et al.*, 1999; Bernard *et Couturier*, 1992).



Obrázek 7: Schéma BP a LR reakce. Při BP reakci probíhá rekombinace PCR produktu se attB místy do donorového vektoru s attP místy za vzniku entry klonu. Při LR reakci probíhá rekombinace genu z entry klonu s attL do destinačního vektoru s attR místy za vzniku expresního klonu. U obou reakcí vzniká vedlejší produkt s *CcdB* genem (upraveno v PowerPoint podle Invitrogen, 2007).

Rekombinační místa bakteriofágu λ byla modifikována za účelem zvýšení účinnosti a specifčnosti rekombinačních reakcí BP a LR. Byly provedeny mutace v centrálních sekvencích (O) att míst z nichž byly odstraněny STOP kodony a byla zde zajištěna specifčnost rekombinačních reakcí pro zachování orientace a čtecího rámce. Mutací byly upraveny krátké sekvence (5 bp) napojené na 15bp centrální sekvenci v attB místech, čímž byla minimalizována tvorba sekundárních struktur v jednovláknové struktuře attB plazmidů. Dále byla odstraněna 43 párů bází dlouhá sekvence místa attR, aby se reakce místa attL a attR stala efektivnější a ireverzibilní (Bushman *et al.*, 1985; Invitrogen, 2012).

3.7.3 MultiSite Gateway klonování

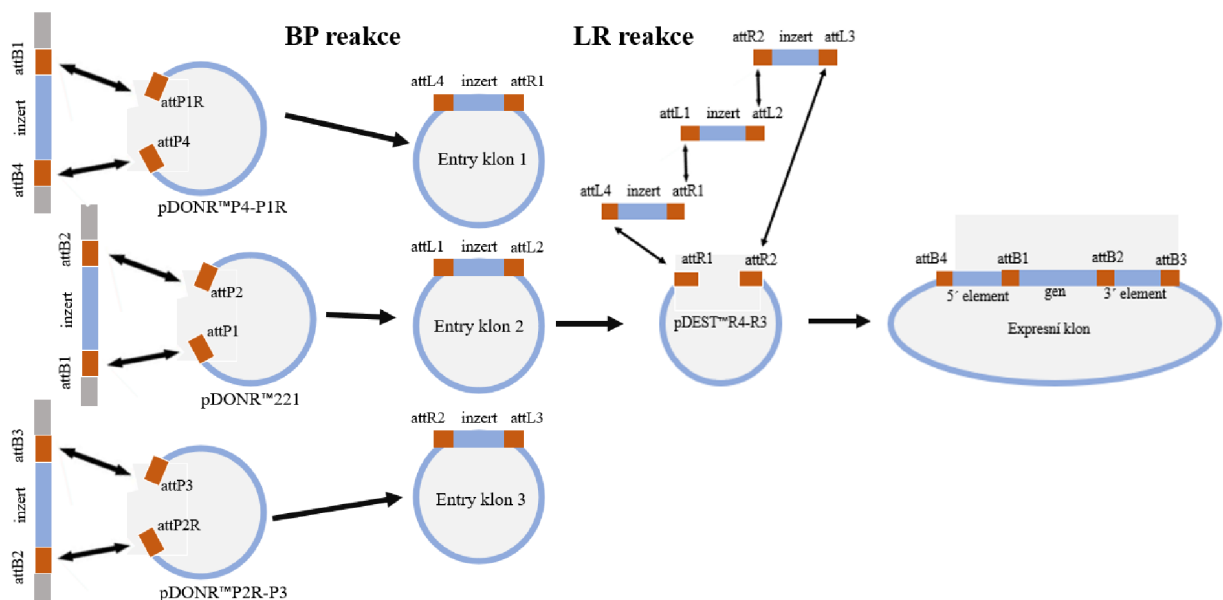
MultiSite Gateway klonování umožňuje do výsledného vektoru simultánně inkorporovat více DNA fragmentů. Použitím rozšířeného repertoáru rekombinačních míst je možné do vektoru vložit až čtyři fragmenty DNA v libovolném pořadí a orientaci. Takto lze připravit mimo jiné fúzní proteiny nebo spojit promotory s geny (Cheo *et al.*, 2004).

Použitím různých donorových vektorů lze snadno dosáhnout sestavení 2 až 5 multifragmentových expresních klonů, kde ve výsledném expresním klonu jsou jednotlivé fragmenty vzájemně propojeny sekvencemi attB. Čím složitější je reakce, tím nižší je očekávaný výstup kolonií a účinnost rekombinace. Ovšem i v těch nejsložitějších případech

jsou účinnosti stále dostatečně vysoké, aby bylo možné získat požadovaný klon pouhou selekcí kolonií. Klonování více než pěti fragmentů již nelze dosáhnout výše popsanými metodami.

Jedním z možných postupů vytvoření vektoru obsahujícího vyšší počet jednotlivých fragmentů je vytvoření tzv. modulárního destinačního vektoru, do kterého lze postupně tandemově vkládat cDNA. Takto lze dosáhnout vložení i 10 a více fragmentů do jediného vektoru. Existuje mnoho postupů Gateway klonování, komplikovanost výrazně snižují komerčně dostupné soupravy. Například manuál pro MultiSite Gateway PRO od firmy Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, který lze zakoupit i s potřebnými chemikáliemi a vektory (Katzen, 2007; Sasaki *et al.*, 2004; Sone *et al.*, 2008).

Firma Invitrogen umožňuje sestavení tří fragmentů do jednoho destinačního vektoru pomocí komerčně dostupného kitu. Proces spočívá v amplifikaci tří sekvencí DNA za pomoci primerů se specifickými attB místy, které odpovídají attP místům donorových vektorů. Ze tří donorových vektorů (pDONRTMP4-P1R, pDONRTM221, pDONRTMP2R-P3) BP rekombinační reakcí vznikají tři entry klony. Takto se typicky vytvoří entry klon s attL4 a attR1 místy obsahující promotorovou sekvenci, která je potřebná k řízení exprese genu zájmu. Zároveň zde mohou být přidány i N-koncové fúzní značky. Dále entry klon s attL1 a attL2 místy obsahující gen zájmu a entry klon s attR2 a attL3 místy obsahující buď sekvenci potřebnou pro ukončení transkripce a polyadenylaci mRNA, nebo zde může být přidána C-koncová fúzní značka.



Obrázek 8: Schéma klonování expresního klonu za použití kitu od firmy Invitrogen. BP reakcí inzertů a donorových vektorů (pDONRTMP4-P1R, pDONRTM221, pDONRTMP2R-P3) vznikají tři entry klony, jejichž inzerty lze LR reakcí vložit do destinačního vektoru (pDESTTMR4-R3) za vzniku expresního klonu upraveno upraveno v PowerPoint podle Ref. 1.

Následuje LR rekombinační reakce, pomocí níž jsou fragmenty se specifickými attL a attR místy přeneseny do jediného destinačního vektoru např. pDESTTMR4-R3 nebo rostlinných destinačních vektorů pUBQ10:YFP-GW či pB7m34GW,0 viz Obrázek 8 (Invitrogen, 2007).

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

Pro klonování genu *OMTK1* metodou MultiSite Gateway klonování byly použity bakterie *Escherichia Coli* a *Agrobacterium tumefaciens*. Pro transienční transformaci *Nicotiana benthamiana* byl použit konstrukt p19 (poskytnut školitelem) a *AtUBQ10::YFP:cMMK3* (připraven Lokajová, 2024).

- DB3.1 Competent Cells *E. coli*, *CcdB* rezistentní kmen (Invitrogen, kat. č. 11782-018)
- One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen, kat. č. C404003)
- One Shot™ TOP10 Electrocomp™ *E. coli* (Invitrogen, kat. č. C404050)
- One Shot® DH5α™ Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen, kat. č. 18263012)
- *A. tumefaciens* kmen GV3101
- *A. tumefaciens* kmen GV3101 nesoucí konstrukt p19 využívaný k supresi RNAi
- *A. tumefaciens* kmen GV3101 nesoucí konstrukt *AtUBQ10::YFP:cMMK3*

Pro klonování metodou MultiSite Gateway byly použity selekční antibiotika. V Tabulce 1 a 2 jsou uvedeny využitá antibiotika pro selekci bakterií *E. coli* kmene DB3.1 (chemokompetentní) a kmenů „a One Shot®“ TOP10 a DH5α (chemokompetentní nebo i elektrokompetentní) nesoucí po transformaci příslušné plazmidy nebo konstrukty. V Tabulce 2 jsou uvedena selekční antibiotika pro selekci bakterií *A. tumefaciens* kmen GV3101 nesoucí příslušné konstrukty.

Tabulka 1: Seznam použitých plazmidů a antibiotik použitých pro selekci bakterií *E. coli*. GEN – gentamycin, KAN – kanamycin.

Plazmid	Selekční antibiotika	Zásobní koncentrace (mg.ml ⁻¹)	Finální koncentrace (μg.ml ⁻¹)
pDONR™207	GEN	50	50
pDONR™P4-P1R	KAN	50	50
pDONR™P2R-P3	KAN	50	50

Tabulka 2: Seznam použitých konstruktů a antibiotik použitých pro selekci bakterií *E. coli* a *A. tumefaciens*. KAN – kanamycin, RIF – rifampicin, SPE – spektinomycin.

Organismus	Konstrukt	Selekční antibiotika	Zásobní koncentrace (mg.ml ⁻¹)	Finální koncentrace (μg.ml ⁻¹)
<i>E. coli</i>	<i>AtUBQ10::YFP:cOMTK1</i>	KAN	50	50
<i>E. coli</i>	<i>35S::EGFP:cOMTK1</i>	SPE	50	100
<i>E. coli</i>	<i>AtUBQ10::YFP:cMMK3</i>	KAN	50	50
<i>A. tumefaciens</i>	<i>AtUBQ10::YFP:cOMTK1</i>	KAN/RIF	50/50	25/100
<i>A. tumefaciens</i>	<i>AtUBQ10::YFP:cMMK3</i>	KAN/RIF	50/50	25/100
<i>A. tumefaciens</i>	p19	KAN/RIF	50/50	25/100

Pro otestování funkčnosti fúzního genu *OMTK1*, zjištění lokalizace *in vivo* a fenotypové analýzy metodou transienční transformace *A. tumefaciens* byly použity 6 týdnů staré rostliny tabáku (*N. benthamiana*), které byly pěstovány v kultivační místnosti (70% vlhkost vzduchu, teplota 21 °C, světelný režim 16 hodin/8 hodin, osvětlení 60 až 80 μE·m⁻²·s⁻¹).

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

Použité chemikálie

- 2-merkaptoethanol (Sigma Aldrich, kat. č. M6250)
- 6x DNA Loading Dye (Thermo Scientific, kat. č. R0611)
- Acetosyringon (Sigma-Aldrich, kat. č. M8266)
- Agarosa (Sigma Aldrich, kat. č. A9539)
- Akrylamid/N,N'-metylenbisakrylamid, 40%, 37,5:1 (BioRad, kat. č. 1610148)
- Complete Protease Inhibitor Cocktail (Complete; Roche, kat. č. 11697498001)
- Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution (BioRad, kat. č. 1610436)
- Deionizovaná voda
- Dihydrogenfosforečnan sodný (NaH₂PO₄; Sigma Aldrich, kat. č. S8282)
- Dimethylsulfoxid (DMSO; Sigma-Aldrich, kat. č. D4540)
- Dithiotreitol (DTT; Sigma Aldrich, kat. č. D0632)
- Dodecylsírán sodný (SDS; Sigma Aldrich, kat. č. L3771)
- Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylether)-tetraoctová kyselina (EGTA; Sigma Aldrich, kat. č. E3889)
- Fluorid sodný (NaF; Sigma Aldrich, kat. č. 201154)

- GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, kat. č. SM1331)
- Gentamycin (GEN) (Duchefa Biochemie, kat. č. G0124)
- GFP Monoclonal Antibody (Sigma Aldrich, kat. č. G10362))
- Glycerol (Sigma Aldrich, kat. č. G5516)
- Glycin (Sigma Aldrich, kat. č. G8898)
- Goat anti-rabbit IgG F(AB)₂ HRP sekundární protilátka (Thermo-Fischer, kat. č. 31460)
- Hovězí sérový albumin (BSA, Bovine serum albumin; Sigma Aldrich, kat. č. A2153)
- Hydroxid sodný (NaOH; Sigma Aldrich, kat. č. S8045)
- Chlorid hořečnatý (MgCl₂; Sigma Aldrich, kat. č. M8266)
- Chlorid sodný (NaCl; Sigma Aldrich, kat. č. 31434)
- Isopropanol (Sigma Aldrich, kat. č. 278475)
- Kanamycin (KAN; Duchefa Biochemie, kat. č. K0126)
- Kultivační médium Super Optimal broth with Catabolite repression (S.O.C médium; Sigma Aldrich, kat. č. S1797)
- Kyselina 2-(N-morfolino)ethansulfonová (MES; Sigma Aldrich, kat. č. M3671)
- Kyselina chlorovodíková (HCl; Sigma Aldrich, kat. č. 30721)
- Kyselina L-askorbová (Sigma Aldrich, kat. č. A92902)
- Laemmlí Sample Buffer, 4X (LSB; BioRad, kat. č. 1610747)
- LB Broth (Miller; Sigma Aldrich, kat. č. L3522)
- LB Broth s agarem (Miller; Sigma Aldrich, kat. č. L3147)
- Midori Green Advance DNA/RNA stain (Nippon Genetics, kat. č. MG04)
- Modř bromfenolová (Honeywell, kat. č. 32712-5G)
- N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED; Sigma Aldrich, kat. č. T9281)
- N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina (HEPES; Sigma Aldrich, kat. č. H3375)
- P 0.45 PVDF blotting membrane (Amersham Hybond, kat. č. 10600023)
- Peroxidisíran amonný (APS; Sigma Aldrich, kat. č. A3678)
- Ponceau S (Sigma Aldrich, kat. č. 78376)
- Powdered milk, blotting grade, low in fat (Carl Roth, kat. č. 68514-61-4)
- Precision Plus Protein Dual Color Standards (BioRad, kat. č. 1610374)
- Protein Assay Dye Reagent Concentrate, 5X (Bradfordovo činidlo, 5x; BioRad, kat. č. 5000006)
- Proteináza K (Thermo Scientific, kat. č. EO0491)

- Restrikční endonukleáza FastDigest *PstI* (Thermo Scientific, kat. č. FD0614)
- Restrikční endonukleáza *PstI* (Thermo Scientific, kat. č. ER0611)
- Restrikční endonukleáza *PvuI* (Thermo Scientific, kat. č. ER0621)
- Restrikční endonukleáza *TaqI* (Thermo Scientific, kat. č. ER0671)
- Rifampicin (RIF; Duchefa Biochemie, kat. č. R0146)
- Spektinomycin (SPE; Duchefa Biochemie, kat. č. S0188)
- Tris Acetát EDTA, 10X (TAE; Sigma Aldrich, kat. č. 574797)
- Tris(hydroxymetyl)aminometán (Tris; Sigma Aldrich, kat. č. 108386)
- Tween 20 (Sigma Aldrich, kat. č. P1379)

Použité soupravy

- GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma Aldrich, kat. č. PLN70)
- iProof High-Fidelity PCR Kit (BioRad, kat. č. 1725331)
- NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel, kat. č. 740609.250)
- Phire Plant Direct PCR Kit (Thermo Scientific, kat. č. F130WH)
- Syringe Filter, 0.22 µm, PVDF, sterile (Starlab, kat. č. E4780-1221)
- Clarity Western ECL Substrate (BioRad, kat. č. 1705061)

Použité roztoky a jejich příprava

- PCR voda: Potřebný objem DNase/RNase-Free destilované vody byl rozpipetován do 1,5ml mikrozkušavek, které byly autoklávovány a následně uchovány při -20 °C.
- LB médium, tuhé (1000 ml): Do 1 l deionizované vody pomalu za stálého míchání přidat 40 g LB médium, tuhé; sterilizovat autoklávováním.
- LB médium, tekuté (1000 ml): Do 1 l deionizované vody přidat 25 g LB médium, tekuté; upravit pH na 7,2 pomocí 1M KOH; sterilizovat autoklávováním.
- LB médium se selekčními antibiotiky (50 ml): K tuhému nebo tekutému LB médiu bylo přidáno selekční antibiotikum v závislosti na použitém plazmidu nebo konstruktu. Pro selekci *E. coli* s příslušnými plazmidy nebo konstrukty (KAN: 50 µl do 50 ml média, zásobní koncentrace 50 mg·ml⁻¹, finální koncentrace 50 µg·ml⁻¹, ředění 1:1000; SPE: 100 µl do 50 ml média, zásobní koncentrace 50 mg·ml⁻¹, finální koncentrace 100 µg·ml⁻¹, ředění 1:500; GEN: 50 µl do 50 ml média, zásobní koncentrace 50 mg·ml⁻¹, finální koncentrace 50 µg·ml⁻¹, ředění 1:1000). Pro selekci bakterií *A. tumefaciens* s příslušnými konstrukty (KAN: 25 µl do 50 ml média, zásobní koncentrace 50 mg·ml⁻¹, finální koncentrace 25 µg·ml⁻¹, ředění 1:2000; RIF: 100 µl do 50 ml média, zásobní koncentrace 50 mg·ml⁻¹, finální koncentrace 100 µg·ml⁻¹, ředění 1:500).

- Infiltrační (kokultivační) médium (50 ml): Byly připraveny zásobní roztoky, 1 mol·l⁻¹ roztok MES byl připraven rozpuštěním 9,762 g MES v 50 ml destilované vody, pH bylo upraveno za pomoci KOH na 5,6; 1 mol·l⁻¹ roztok MgCl₂ byl připraven rozpuštěním 4,76 g MgCl₂ v 50 ml destilované vody (reakce je exotermická, MgCl₂ je třeba velmi pomalu přidávat do deionizované vody v kádince chlazené ledem a použít ochranné brýle). Zásobní roztoky MES a MgCl₂ byly sterilizovány v aseptických podmínkách laminárního boxu Syringe filtrem (0,22 μm, PVDF); 150 mmol·l⁻¹ roztok acetosyringonu byl připraven rozpuštěním 6 mg acetosyringonu v 204,8 μl DMSO. Ze zásobních roztoků bylo připraveno inokulačního média přidáním 0,5 ml MgCl₂ (1 mol·l⁻¹), 0,5 ml MES (1 mol·l⁻¹) a 50 μl acetosyringonu (150 mmol·l⁻¹), objem byl doplněn do 50 ml deionizovanou vodou.
- Tris buffer saline s přidavkem Tween 20 (TBS-T; 1000 ml): přidat 2,42 g Tris; 8,75 g NaCl; upravit na pH 7,6 (HCl); 1 ml Tween 20 a doplnit deionizovanou vodou do objemu 1000 ml.
- Fosfátový pufr (200 ml): přidat 1,1998 g NaH₂PO₄, upravit pH na 7,8 (NaOH); 20 ml glycerolu a doplnit do objemu 200 ml deionizovanou vodou.
- 10% peroxidisíran amonný (w/v) (APS; 1 ml): 0,1 g APS doplnit do objemu 1 ml deionizovanou vodou.
- S.O.C. médium: 2% trypton, 0,5% kvasničný extrakt, 10 mmol·l⁻¹ NaCl, 2,5 mmol·l⁻¹ KCl, 10 mmol·l⁻¹ MgCl₂, 10 mmol·l⁻¹ MgSO₄ a 20 mmol·l⁻¹ glukosa.
- 10% zaostřovací gel (5 ml): 1,26 ml Tris-HCl o koncentraci 0,5 mol·dm⁻³ (pH = 6,8); 0,5 ml akrylamid/N,N'-metylenbisakrylamid (40 %); 25 μl APS (10 %); 5 μl TEMED; v případě SDS PAGE bylo přidáno 50 μl SDS (10%) a následně byl objem doplněn na 5 ml deionizovanou vodou.
- Extrakční pufr E (100 ml): přidat 1,19 g HEPES (pH 7,5); 0,43 g NaCl; 0,038 g EGTA; 100 μl MgCl₂ (1 mol·l⁻¹); 0,004 g NaF; 10 ml glycerol; inhibitory proteas Complete o objemu 20 μl·ml⁻¹; redukční činidlo DTT o koncentraci 1 mol·dm⁻³ a objemu 10 μl/ml a doplnit deionizovanou vodou na 100 ml.
- 10 % rozdělovací gel (20 ml): 5 ml Tris-HCl o koncentraci 1,5 mol·dm⁻³ (pH = 8,8); 5 ml akrylamid/N,N'-metylenbisakrylamid (40 %); 100 μl APS (10 %); 10 μl TEMED; v případě SDS PAGE bylo přidáno 200 μl SDS (10%) a 10 μl bromfenolové modři pro lepší viditelnost jamek, následně byl objem doplněn na 20 ml deionizovanou vodou.

- Running pufr 1x (1000 ml): přidat 3 g Tris; 14,4 glycin; 1 g SDS a doplnit do objemu 1000 ml deionizovanou vodou.
- Transfer pufr 1x (1000 ml): přidat 3 g Tris; 14,4 glycin a doplnit do objemu 1000 ml deionizovanou vodou.
- TAE, 1x (1000 ml): Do 900 ml deionizované vody přidat 100 ml TAE, 10x.

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- Analytická váha XA110/2X (Radwag)
- Aparatura pro transfer proteinů Mini Trans-Blot Cell (BioRad)
- Autokláv Sterrivap HP IL (MMM Group)
- Automatické pipety (Eppendorf)
- Centrifuga Allegra 64 R (Beckman Coulter)
- Čtecí zařízení Tecan Infinite F200 Fluorescence Microplate Reader (Tecan)
- Dokumentační zařízení ChemiDoc MP Imaging System (BioRad)
- Elektroforetická vana Mini-Protean Tetra Vertical Electrophoresis Cell (BioRad)
- Elektroforetická vana Mini-Sub Cell GT Cell (BioRad)
- Elektroforetická vana Wide Mini-Sub Cell GT Cell (BioRad)
- Elektromagnetická míchačka MSH-420 (BOECO)
- Epifluorescenční mikroskop Axio Imager.M2 (Zeiss)
- Gel Doc™ EZ Imager (Bio-Rad, USA).
- Hlubokomrazicí box MDF-U500VX-PE (Panasonic)
- Konfokální laserový skenovací mikroskop LSM 710 Axio Imager 2 (Zeiss)
- Kultivační místnost (WEISS Gallenkamp)
- Laminární box (Merci)
- Mikrovlnná trouba MHE21 (HITACHI)
- Mraznička LIE G 5216 513L (Liebherr Comfort)
- NanoDrop™ Lite Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific)
- Obrazový skener Image Scanner III (GE Healthcare)
- PCR cykler (T100 Thermal Cycler, BioRad)
- pH metr PC 2700 (Eutech Instruments)
- Přístroj pro elektroporaci BTX™ ECM™ 399 Exponential Decay Wave Electroporator (ThermoFisher Scientific)
- Spektrofotometr Infinite M Nano (Tecan)
- Stolní centrifuga ScanSpeed 1730R (LaboGene; Dánsko)

- Stolní centrifuga Spectrafuge 24D Digital Lab Microcentrifuge (Labnet)
- Třepačka MR-12 (Biosan)
- Výrobník deionizované vody Simplicity water purification system (Merck Millipore)
- Zdroj napětí PowerPac HV (BioRad)

4.4 Seznam použitých programů

- ApE – A plasmid Editor v2.0.37 (M.W. Davis)
- Geneious version 7.1 (Biomatters)
- Image LabTM Software (Bio-Rad Laboratories Inc.)
- Microsoft Office (Excel, Powerpoint, Word) (Microsoft)
- ZEN (black edition) v3.0 (Zeiss)
- ZEN 3.4 (blue edition) (Zeiss)

4.5 Metody

4.5.1 Navržení primerů

Pro navržení primerů bylo třeba získat sekvenci genu *OMTK1*. V databázi NCBI byla získána sekvence cDNA genu *OMTK1* (Ref. 3). Pro získání sekvence gDNA a promotoru genu *OMTK1* byla využita webová stránka Sequenceserver 2.0.0 (Priyam *et al.*, 2019), kde byla vložena sekvence cDNA genu *OMTK1* a z databáze nukleotidů bylo zvoleno pole *Medicago sativa* Genomic Sequence Collection. Dále byla stáhnuta sekvence medsa.RegenSY27x.gnm0_9.ptg0003601 ve formátu FASTA, jelikož toto sekvenování bylo provedeno u rostliny *M. sativa* kultivaru Regen SY (RSY), tudíž na stejném kultivaru, ze kterého byla izolována gDNA v mé práci. Sekvence nukleotidů byla zobrazena v softwaru ApE – A plasmid Editor v2.0.37, ve které bylo možno získat sekvenci gDNA a promotoru.

Byly navrženy PCR primery se specifickými attB místy, aby je bylo následně možné v BP reakci vnést do entry klonu. Při navrhování primerů byl pro zjištění specifických attB sekvencí použit manuál „MultiSite Gateway® Three-Fragment Vector Construction Kit Using Gateway® Technology to simultaneously clone multiple DNA fragments“ verze D (Invitrogen, 2007). U navržených PCR primerů byla délka attB míst 22 až 25 nukleotidů a sekvence nukleotidů odpovídající genu zájmu 18 až 25 nukleotidů dlouhá. Pro získání A fragmentu pro rekombinaci do donorového vektoru pDONRTMP4-P1R byly navrženy primery pro promotor, kde přední primer obsahuje attB4 místo a zadní primer attB1 místo. Pro získání B fragmentu pro rekombinaci do donorového vektoru pDONRTM207 byly navrženy primery pro cDNA a gDNA, tak aby přední primer obsahoval attB1 místo a zadní primer attB2 místo.

Pro získání C fragmentu pro rekombinaci do donorového vektoru pDONRTMP2R-P3 byly navrženy primery pro cDNA a gDNA, kde přední primer obsahuje attB2 místo a zadní primer attB3 místo.

Pro ověření správného čtecího rámce entry klonů byly navrženy primery pro jejich osekvenování. Primery byly navrženy, aby jejich T_m odpovídala přibližně 55 – 60 °C a aby délka vzniklých amplikonů odpovídala přibližně 1000 bp. Jako kontrola byly vždy na osekvenování zaslány dva různé entry klony obsahující stejný fragment. Mikrokumavky obsahující 500 ng entry klonu a 2,5 μ l primeru (10 pmol· μ l⁻¹) byly doplněny do 10 μ l PCR vodou a odeslány firmě SEQme s.r.o.

Délka navržených primerů byla dále upravena v kalkulátoru teplot pro nasedání primerů od firmy NEB a ThermoFisher (Ref. 4 a 5), a to tak, aby nasednutí předního a zadního primeru probíhalo při podobné teplotě. Pro finální úpravu podoby primerů byla použita webová stránka Integrated DNA technologies (Ref. 6). Zde byla vybrána záložka Tools a následně OligoAnalyzerTM Tool, kde byla vyhodnocena pravděpodobnost vzniku vlásenek a dalších nežádoucích sekundárních struktur. Především primer-dimer, což jsou krátké nechtěné produkty vznikající hybridizací komplementárních bází buď mezi dvěma stejnými primery anebo mezi předním a zadním primerem. Délka primerů byla upravena tak, aby byla snížena pravděpodobnost jejich vzniku.

4.5.2 PCR pro získání amplikonů

Primery objednané z firmy Eurofins genomics byly naředěny PCR vodou tak, aby jejich koncentrace odpovídala 10 μ mol·l⁻¹. Koncentrace navržených primerů byla ověřena na NanoDropu.

Pro ověření funkčnosti primerů byla provedena PCR s enzymem Phire II DNA polymerase. Složení PCR reakce je uvedeno v Tabulce 3, jako templát byla využita v případě A fragmentu gDNA. Pro B a C fragment byla použita, jak cDNA (připravena ze 2 μ g RNA a 40x ředěna), tak gDNA (25 ng· μ l⁻¹). Podmínky pro polymerázovou řetězovou reakci v thermocykleru byly následné, úvodní denaturace – 98 °C/30 s, následně 35 cyklů složených z denaturace, nasednutí primerů a extenze, kde denaturace proběhla při – 98 °C/5s, nasednutí primerů – zde byl nastaven teplotní gradient pro A fragment 56,1 °C, pro B fragment 54 °C a pro C fragment 57,2 °C /5s, extenze – 72 °C/1 min následovala závěrečná extenze – 72 °C/1 min a ochlazení 12 °C/ ∞ .

Tabulka 3: Složení PCR směsi pro ověření funkčnosti primerů.

Komponenty	Finální koncentrace	Objem 1 reakce [μl]
PCR voda		5,6
5x Phire II Buffer		2
Phire II DNA polymerase		0,2
10 mmol·dm⁻³ dNTPs	0,5 mmol·dm ⁻³	0,2
10 μmol·dm⁻³ přední primer	0,5 μmol·dm ⁻³	0,5
10 μmol·dm⁻³ zadní primer	0,5 μmol·dm ⁻³	0,5
templát gDNA/cDNA		1
	Celkový objem	10

Pro získání ampliconů genu zájmu využitých při klonování byla provedena PCR s enzymem iProof™ High-Fidelity DNA polymerase. Složení PCR reakce je uvedeno v Tabulce 4, jako templát byla využita v případě A fragmentu gDNA. Pro B a C fragment byla použita, jak gDNA tak cDNA. Podmínky pro polymerázovou řetězovou reakci v thermocykleru byly následné, úvodní denaturace – 98 °C/30s, následně 35 cyklů složených z denaturace, nasednutí primerů a extenze, kde denaturace proběhla při – 98 °C/10s, nasedání primerů – zde byl nastaven teplotní gradient pro A fragment 56,1 °C, pro B fragment 54 °C a pro C fragment 57,2 °C /30s, extenze – 72 °C/3,5 min, následovala závěrečná extenze – 72 °C/10 min a ochlazení 12 °C/∞. Experiment byl opakován, jelikož se nepodařilo získat všechny amplicony, podmínky PCR reakce byly upraveny následně, teploty u nasednutí primerů byly sníženy pro B fragment na 52 °C a pro C fragment na 55,2 °C /30s a čas extenze byl prodloužen na – 72 °C/4 min.

Následně byla provedena agarosová gelová elektroforéza pro ověření přítomnosti ampliconů. U promotoru byla očekávaná délka 2 055 bp, u cDNA 1 779 bp a u gDNA 6 597 bp.

4.5.3 Přečištění PCR produktů

Po elektroforetickém ověření přítomnosti ampliconů byly PCR produkty přečištěny kitem Nucleospin gel and PCR clean-up, byl použit manuál přiložený výrobcem (popis viz Příloha 2, Protokol 1). Po přečištění byla pro ověření čistoty ampliconů provedena agarosová elektroforéza, zároveň byla koncentrace a čistota získaných ampliconů změřena na NanoDropu. Mikrozkumavky s přečištěnými PCR amplicony byly uchovávány v mrazáku při – 20 °C.

Tabulka 4: Složení PCR směsi pro amplifikaci genu OMTK1, který byl využit při klonování.

Komponenty	Finální koncentrace	Objem [μl]
PCR voda		14,25
5x iProof™ HF Buffer		5
10 mmol·l⁻¹ dNTPs	0,5 mmol·dm ⁻³	0,5
10 mmol·l⁻¹ přední primer	0,5 μmol·dm ⁻³	1,25
10 mmol·l⁻¹ zadní primer	0,5 μmol·dm ⁻³	1,25
iProof™ High-Fidelity DNA polymerase		0,25
templát gDNA/cDNA		2,5
	Celkový objem	25

4.5.4 Izolace donorových plazmidů isopropanolem

Z buněk *E. coli* kmene DB3.1 (*CcdB* rezistentní kmen) byly izolovány donorové plazmidy pDONRTMP4-P1R, pDONRTM207 a pDONRTMP2R-P3, které byly následně použity pro BP rekombinační reakci. pDONRTM207, který obsahuje stejná att místa jako pDONRTM221, byl zvolen, jelikož obsahuje gen pro rezistenci vůči gentamycinu. Takto bylo možné následně provést selekci po LR rekombinační reakci s destinačním vektorem pUBQ10:YFP-GW, který obsahuje rezistenci na kanamycin. Buňky *E. coli* DB3.1 s příslušnými plazmidy byly vyndány z hlubokomrazícího boxu, kde byly uchovávány při -80 °C a byly ponechány se pomalu rozmrazit na ledu. Při sterilních podmínkách bylo připraveno LB tekuté médium se selekčními antibiotiky. Do 15ml uzavíratelných zkumavek bylo odlito po 5 ml LB tekutého média se selekčními antibiotiky a automatickou pipetou bylo přidáno 15 μl příslušné kultury *E. coli* DB3.1. Kultury byly přes noc ponechány v inkubátoru při 37 °C a 200 rpm. Jednotlivé zkumavky byly umístěny našikmo, aby bylo dosaženo co největšího zvýšení nárůstu bakterií.

Následující den byla provedena centrifugace a lýze buněk. Narostlé kultury byly přelity do 2 ml mikrozkušavek a byly umístěny na stolní centrifugu po dobu 3 minut, 3 000 g, supernatant byl odlit. V následujícím postupu byly využity pufrы z kitu DNA QIAprep Spin Miniprep. K peletu bylo přidáno 250 μl P1 pufru, který slouží jako stabilizační roztok, a mikrozkušavky byly resuspendovány na vortexu. Bylo přidáno 250 μl P2 pufru, kterým byly buňky lyzovány, a mikrozkušavky byly desetkrát opatrně převráceny a ponechány se 5 minut inkubovat při laboratorní teplotě. Následně bylo přidáno 250 μl předchlazeného P3 pufru, který

slouží jako neutralizační roztok, a mikrozkuřavky byly desetkrát opatrně převráceny a ponechány se 5 minut inkubovat na ledu.

Následovala izolace plazmidové DNA. Mikrozkuřavky byly umístěny na stolní centrifugu po dobu 10 minut, 15 600 g. Supernatant byl přenesen do 1,5ml mikrozkuřavek a bylo přidáno 700 μ l isopropanolu a inkubováno po dobu 5 minut při laboratorní teplotě. Mikrozkuřavky byly centrifugovány po dobu 10 minut, 15 600 g, supernatant byl odlit. Do mikrozkuřavek bylo automatickou pipetou přidáno 750 μ l 75% předchlazeného ethanolu a byly centrifugovány po dobu 5 minut, 5 200 g, supernatant byl odlit. Následně byly mikrozkuřavky stočeny a zbytek ethanolu byl opatrně odpipetován automatickou pipetou tak, aby nebyl odebrán pelet. Mikrozkuřavky byly ponechány otevřené na ledu, aby se mohl zbytkový ethanol odpařit, následně bylo přidáno 50 μ l PCR vody. Takto připravená plazmidová DNA byla uschována do mrazáku při -20 °C.

4.5.5 Přečištění plazmidové DNA QIAprep Spin Miniprep Kit

Jelikož u donorových plazmidů byly metodou gelové agarosové elektroforézy zjištěny příměsi, byla plazmidová DNA přečištěna QIAprep Spin Miniprep kitem. Byl použit manuál přiložený výrobcem (popis viz Příloha 2, Protokol 2). Pro ověření čistoty eluované plazmidové DNA byla provedena agarosová elektroforéza. Mikrozkuřavky s plazmidovou DNA byly uschovány v mrazáku při -20 °C pro další použití.

4.5.6 BP a LR rekombinační reakce

Přečištěné PCR produkty s attB místy byly rekombinovány do příslušných donorových plazmidů za vzniku entry klonů a následně byly transformovány do chemokompetentních buněk *E. coli* kmene TOP 10 anebo DH5 α . Pro vytvoření entry klonu byla provedena BP reakce, kterou byl vnesen gen zájmu s příslušným attB místem do donorového vektoru s odpovídajícím attP místem, a to následovně pDONRTMP4-P1R + attB4-PCR produkt-attB1, pDONRTM207 + attB1-PCR produkt-attB2, pDONRTMP2R-P3 + attB2-PCR produkt-attB3.

Do směsi pro BP reakci byl napipetován objem odpovídající 50-ti femtomolům PCR produktu s attB místem, 50ti femtomolům donorového vektoru s attP místem a 2 μ l BP ClonaseTM II enzyme mix, která byla před použitím dvakrát po dvou sekundách zvortexována a stočena. Objem byl následně doplněn PCR vodou na 10 μ l. Mikrozkuřavky byly umístěny na 16 hodin do thermocykleru předehřátého na 25 °C. Pro ukončení rekombinační reakce byl přidán 1 μ l proteinázy K a mikrozkuřavky byly umístěny do thermocykleru předehřátého na 37 °C po dobu 10 min. Takto připravené entry klony byly transformovány do buněk *E. coli* TOP 10 anebo DH5 α , pro ověření úspěšnosti rekombinace byla u kolonií narostlých na médiu

se selekčními antibiotiky provedena PCR kolonií a agarosová elektroforéza. Z bakterií selektovaných metodou PCR kolonií byly izolovány plazmidy, které byly pro ověření genu zájmu štěpeny restričními endonukleázami a následně separovány metodou agarosové elektroforézy. Plazmidy byly osekvenovány Sangerovým sekvenováním.

Následně byla provedena LR rekombinační reakce. Do směsi pro jednokomponentovou LR reakci bylo napipetováno 150 ng pDONRTM207 + cDNA OMTK1, 150 ng destinačního vektoru pUBQ10:YFP-GW, 2 µl LR ClonaseTM II Plus enzyme. Objem byl následně doplněn na 10 µl PCR vodou. Do směsi pro tříkomponentovou LR reakci bylo napipetováno 10 fmol od každého ze tří entry klonů pEN-L4-2-R1TM (obsahující gen pro konstitutivní promotor 35S), pEN-L1-F-L2TM (obsahující gen pro GFP) a pDONRTMP2R-P3 + cDNA OMTK1, dále 20 fmol destinačního vektoru pB7m34GW,0. K takto připravené směsi bylo přidáno 2 µl LR ClonaseTM II Plus enzym. Objem byl následně doplněn na 10 µl PCR vodou. Mikrozkušavky byly umístěny na 16 hodin do thermocyklu předehřátého na 25 °C, rekombinační reakce byla ukončena přidáním 1 µl proteinázy K a umístěním mikrozkušavek do thermocyklu předehřátého na 37 °C po dobu 10 min. Vytvořené expresní klony byly následně transformovány do buněk *E. coli* TOP 10 a bylo provedeno stejně jako u BP reakce ověření přítomnosti rekombinovaného genu zájmu metodou PCR kolonií a štěpením restričními endonukleázami s následnou separací agarosovou elektroforézou. Expresní klony byly transformovány do *A. tumefaciens* kmene GV3101.

4.5.7 Transformace chemokompetentních buněk a elektrokompetentních buněk *E. coli*

Plazmidy byly po BP rekombinační reakci transformovány do chemokompetentních buněk *E. coli* kmene DH5α anebo TOP10. Dva kmeny byly použity z důvodu otestování počtu narostlých kolonií u jednotlivých kmenů a vybrání vhodnějšího. Po LR rekombinační reakci byly plazmidy transformovány do chemokompetentních buněk DH5α. Do 2ml mikrozkušavek se 100 ml chemokompetentních buněk, které byly uchovávány při - 80 °C, bylo v poloroztálem stavu ihned přidáno 3 µl směsi po BP reakci, která byla inhibována proteinázou K. Zkušavky byly umístěny na led po dobu 30 minut a po 10 minutách byl jejich obsah jemně promíchán. Zkušavky byly umístěny do thermobloku předehřátého na 42 °C po dobu jedné minuty, poté byly zkušavky umístěny na dvě minuty na led. Do mikrozkušavek bylo přidáno 150 µl S.O.C. média a vršky mikrozkušavek byly obaleny parafilmem. Takto zavřené mikrozkušavky byly připevněny v horizontální pozici do inkubátoru při 37 °C po dobu jedné a půl hodiny.

Po tříkomponentové LR rekombinační reakci byly plazmidy transformovány i do elektrokompetentních buněk *E. coli* kmene TOP10 z důvodu neúspěšné transformace

chemokompetentních buněk. Do 1,5ml mikrozkuvek bylo k 90 μ l elektrokompetentních buněk přidán 1 μ l destinačního vektoru po LR rekombinaci, který byl inhibován proteinázou K, mikrozkuvky byly krátce zvortexovány a stočeny. Roztok plazmidů a elektrokompetentních buněk byl přenesen do kyvety určené k elektroporaci plastovou kapilární pipetou. Kyveta byla vložena do elektroporátoru, kde byly buňky transformovány při 1 800 V po dobu 5 ms. Po transformaci bylo k buňkám přidáno plastovou kapilární pipetou 150 μ l S.O.C. média, roztok byl promíchán a byl přenesen do 1,5ml mikrozkuvek. Vršky mikrozkuvek byly obaleny parafilmem a byly umístěny do inkubátoru při 37 °C, 200 rpm po dobu jedné hodiny.

Obsah mikrozkuvek s chemokompetentními i elektrokompetentními buňkami byl v aseptickém prostředí laminárního boxu přenesen automatickou pipetou na Petriho misky s tuhým LB médiem obsahujícím selekční antibiotikum. LB medium na Petriho miskách bylo předežháno na 37 °C. Bakteriologickou hokejkou byla tekutina krouživým pohybem rovnoměrně rozetřena. Petriho misky byly ponechány přes noc v inkubátoru při 37 °C spodní stranou s tuhým LB médiem vzhůru.

4.5.8 PCR kolonií pro ověření rekombinace plazmidů

Pro ověření přítomnosti genu zájmu v entry klonech a expresních klonech byla provedena PCR kolonií. Tento krok byl proveden pro vyloučení bakterií *E. coli* obsahující plazmidy, které byly transformovány nespecifickými produkty tzv. primer-dimery.

Do 300 μ l mikrozkuvek bylo napipetováno 10 μ l PCR vody. V Petriho miskách s narostlými bakteriemi *E. coli* DH5 α nebo TOP10, které byly ponechány v inkubátoru přes noc po jejich transformaci tepelným šokem, byly vybrány jednotlivé kolonie, které byly špičkou od automatické pipety odebrány a přeneseny do připravených mikrozkuvek s PCR vodou. Špička byla několikrát propipetována pro rozsuspendování veškerého biologického materiálu. Mikrozkuvky s templátem byly zvortexovány a krátce stočeny.

V Tabulce 5 jsou uvedeny jednotlivé ověřované konstrukty, použité primery a teplota jejich nasednutí použitá v thermocyklu, která byla určena na webové stránce viz Ref. 4 a 5. Délky jednotlivých amplikonů byly zjištěny v *in silico* mapách vytvořených pro jednotlivé vektory.

Podmínky nastavené v Thermocyklu byly následné, úvodní denaturace – 95 °C/60s, následně 40 cyklů složených z denaturace, nasednutí primerů a extenze, kde denaturace proběhla při – 95 °C/30s, nasedání primerů – 1min, extenze – 72 °C/1min, následovala závěrečná extenze – 72 °C/10 s a ochlazení 12 °C/ ∞ . Následně byla provedena PCR kolonií, jednotlivé komponenty reakce jsou uvedeny v Tabulce 6. Pro ověření přítomnosti amplikonů byla provedena agarosová gelová elektroforéza.

Tabulka 5: Konstrukty, které byly ověřeny metodou PCR kolonií, použité primery a jejich teplota nasednutí použita v thermocykleru.

Konstrukt	Přední primer	Zadní primer	Teplota nasednutí primerů [°C]
pDONR TM P4- P1R + promotor OMTK1	SeqMe_M13_Fw	SeqMe_M13_Rev	52,1
pDONR TM P2R- P3 + cDNA OMTK1	SeqMe_M13_Fw	SeqMe_M13_Rev	52,1
pDONR TM 207 + cDNA OMTK1	pDONR207_seq_Fw	pDONR207_seq_Rev	56,2
pDONR TM P2R- P3 + gDNA OMTK1	SeqMe_M13_Fw	OMTK1_E2_Rev1	56,5
pDONR TM 207 + gDNA	pDONR207_seq_Fw	OMTK1_E2_Rev1	57,1
pUBQ10:YFP- GW + cDNA OMTK1	OMTK1_E7_Fw1	SeqMe_M13Fw	56,5

Tabulka 6: Složení PCR směsi pro ověření přítomnosti genu zájmu v entry kloněch

Komponenty	Finální koncentrace	Objem [μl]
PCR voda		6,75
DreamTaq Buffer		1
10 mmol·dm⁻³ dNTPs	0,5 mmol·dm ⁻³	0,2
10 μmol·dm⁻³ přední primer	0,5 μmol·dm ⁻³	0,5
10 μmol·dm⁻³ zadní primer	0,5 μmol·dm ⁻³	0,5
DreamTaq Polymerase		0,05
Templát		1
	Celkový objem	10

4.5.9 Izolace entry klonů kitem Sigma Aldrich

Z buněk nesoucích entry klony a destinační vektory, u kterých byla metodou PCR kolonií prokázána přítomnost amplikonů genu zájmu, byly izolovány plazmidy kitem Sigma Aldrich. Z 300 μl mikrozkuvek s PCR vodou a setřenými koloniemi bakterií *E. coli* DH5α anebo TOP10, které byly odebrány z tuhého LB média na Petriho miskách, bylo odebráno 5 μl roztoku. Takto odebraný roztok byl napipetován v aseptickém prostředí laminárního boxu do Falconových zkumavek s 5 ml tekutého LB média obsahujícího selekční antibiotikum. Falconovy zkumavky s bakteriemi byly ponechány přes noc v inkubátoru při 37 °C a 200 rpm.

Z narostlých kultur bakterií byly následující den připraveny zásobní bakteriální kryokonzervy. V aseptickém prostředí laminárního boxu bylo do 2ml mikrozkuvek napipetováno 700 μl 80% glycerolu a 700 μl narostlé kultury bakterií v LB tekutém médiu. Mikrozkuvky byly zvortexovány a poté ponořeny do tekutého dusíku a po úplném zmrznutí uchovány v hlubokomrazím boxu při – 80 °C.

Následně byly izolovány plazmidy kitem Sigma Aldrich, bylo postupováno dle manuálu (popis viz Příloha 2, Protokol 3). U izolované plazmidové DNA byla na NanoDropu zjištěna hodnota poměru absorbancí A260/280 a koncentrace.

4.5.10 Agarosová elektroforéza

Pro ověření přítomnosti amplikonů byla provedena gelová agarosová elektroforéza v elektrolytu 1x TAE. Na laboratorních vahách byl odvážen 1 g agarosy do 250 ml Erlenmeyerovy baňky a odměrným válcem bylo přilito 100 ml 1x TAE. Erlenmeyerova baňka

byla umístěna do mikrovlnné trouby a suspenze byla zahřívána až do rozpuštění všech krystalek agarosy. Následně po klesnutí teploty roztoku pod 60 °C bylo přidáno barvivo Midori Green Advance DNA/RNA stain a roztok byl přelit do sestavené elektroforetické aparatury. Ta byla za pomoci vodováhy vyvážena, a poté do ní byl umístěn hřebínek pro vytvoření jamek v gelu.

Po zatuhnutí byl gel umístěn do elektroforetické vany, která byla doplněna roztokem 1x TAE, tak aby roztok nepřesahoval rysku. Následně byl z gelu opatrně vyjmut hřebínek, aby nedošlo k poškození jamek v gelu. K 1 μl PCR produktu bylo přidáno 4 μl PCR H₂O a 1 μl 6x DNA Loading Dye, takto připravený vzorek byl špičkou automatické pipety opakovaným nasátím a vypuštěním důkladně promíchán a byl nanesen do jamky v agarosovém gelu. Po stranách bylo do jamek automatickou pipetou nanášeno 1,5 μl standardu GeneRuler™ 1 kb plus DNA ladder.

Elektroforéza byla spuštěna při 90 V po dobu až 70 minut, gel byl po 20 minutách vyndáván a byly pořizovány snímky v Gel Doc™ EZ Imager.

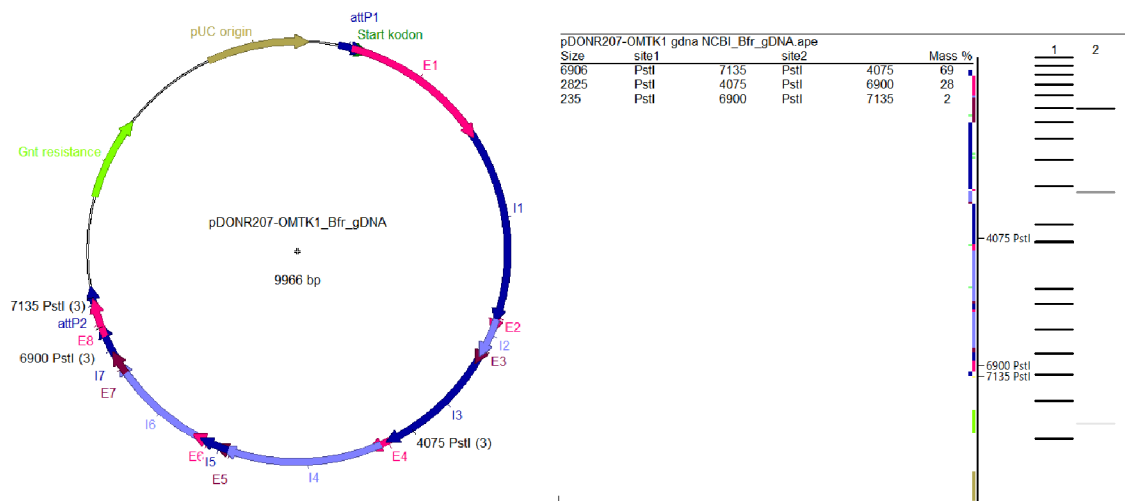
4.5.11 Měření koncentrace a čistoty dsDNA a ssDNA

Pro ověření čistoty a koncentrace PCR amplikonů a izolovaných plazmidů byl použit NanoDrop™ Lite Spectrophotometer. Na přístroji bylo vybráno měření dsDNA, jako blank byl použit 1 μl PCR vody. Kapka PCR vody byla usušena buničinou a následně byl nanesen 1 μl vzorku, u kterého byla změřena koncentrace a hodnota poměru absorbcí A₂₆₀/A₂₈₀, ze které bylo možno usoudit čistotu vzorku.

Pro kontrolu správného naředění zakoupených primerů byl NanoDrop nastaven pro měření ssDNA a jako blank byl použit 1 μl PCR vody. Následně byl nanesen 1 μl primeru o koncentraci 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a byla změřena jeho absorbance při A₂₆₀. V kalkulátoru Oligo Calc (Kibbe, 2007) byla zadána nukleotidová sekvence navrženého primeru, po stisknutí tlačítka vypočítat bylo spočteno kolika molární je primer při hodnotě absorbance A₂₆₀ rovna jedné. Pro zjištění molarity naředěných primerů byla tato hodnota vynásobena změřenou absorbcí primeru při A₂₆₀.

4.5.12 Restrikční štěpení entry klonů

Pro ověření přítomnosti genu zájmu v entry klonech a expresních klonech byla využita metoda restrikčního štěpení. K určení štěpných míst byl použit program ApE – A plasmid



Obrázek 9: Příklad analýzy štěpných míst v programu ApE – A plasmid Editor v2.0.37 pro pDONRTM207 + gDNA OMTK1 při použití restriční endonukleázy PstI. V plazmidu jsou přítomna tři štěpná místa v intronu 3, exonu 8 a attP2 místě plazmidu pDONR207. Výsledné fragmenty po restriční endonukleáze budou odpovídat délce 6906, 2825 a 235 bp.

Editor v2.0.37, ve kterém byly *in silico* sestaveny mapy rekombinovaných plazmidů. V takto vytvořených mapách byly následně vyhledány restriční endonukleázy, které štěpí plazmidy minimálně ve dvou místech viz Obrázek 9. Pro porovnání byl vždy restričně štěpen i prázdný plazmid obsahující *CcdB* gen.

Dle štěpných míst predikovaných *in silico* a dostupnosti enzymů byly vybrány vhodné restriční endonukleázy. Na webových stránkách firmy ThermoFisher Scientific byl vybrán nejúčinnější pufr a doporučená teplota reakce viz Ref. 7. V případě použití dvou enzymů byla využita stránka DoubleDigest Calculator viz Ref. 8. Do jedné reakce bylo přidáno 0,2 μ l enzymu a 1 μ l pufru, 4 μ l vzorku plazmidové DNA a objem byl doplněn na 10 μ l PCR vodou. Enzymy a pufr byly použity v kombinaci PstI Fast Digest s 10x FastDigest Buffer, PstI s 10x Orange buffer, PvuI a TaqI a PstI+PvuI s 10x R buffer. Takto připravené vzorky byly následně vloženy na 1 hodinu do thermocykleru při použití FastDigest enzymu nebo na 2 hodiny při použití zbylých enzymů. Thermocykler byl nastaven na 37 °C při použití enzymů PstI Fast Digest, PstI a PvuI. Při použití enzymu TaqI byl thermocykler nastaven na teplotu 65 °C.

Následně byly vzorky připraveny na agarosovou elektroforézu. Enzym PstI Fast Digest již obsahuje barvivo určující polohu při separaci v agarosovém gelu a glycerol, tudíž vzorky byly ihned naneseny na gel v objemu 5 μ l. U enzymů PstI, PvuI a TaqI bylo k 5 μ l vzorku přidán 1 μ l 6x DNA Loading Dye a až poté byly naneseny na gel.

4.5.13 Transformace *A. tumefaciens* chladovým šokem

Kryokonzervy chemokompetentních buněk *A. tumefaciens* kmene GW3101 v 2ml mikrozkumavkách byly umístěny na led a ponechány zde, dokud bakteriální suspenze nenabyla poloroztátého stavu. Následně bylo do mikrozkumavek přidáno po 10 μ l plazmidu *AtUBQ10::YFP:cOMTK1* o koncentraci 100 ng \cdot μ l⁻¹. Mikrozkumavky byly ponechány po dobu 30 minut na ledě, kde byly průběžně mírným poklepáním na spodek mikrozkumavky promíchávány. Transformace chladovým šokem (z ang. cold-shock) byla provedena ponořením mikrozkumavek po dobu 5 minut do tekutého dusíku. Následně byly mikrozkumavky ponechány roztát při laboratorní teplotě a bylo přidáno 150 μ l S.O.C. média. Vršky byly zajištěny parafilmem a mikrozkumavky byly umístěny po dobu 2 hodin do inkubátoru při 200 rpm.

Bakterie v S.O.C. médiu byly v aseptickém prostředí laminárního boxu automatickou pipetou přeneseny na Petriho misky s tuhým LB médiem se selekčními antibiotiky, na něž byly rovnoměrně rozetřeny bakteriologickou hokejkou. Následně byly Petriho misky ponechány v zatemněném inkubátoru při 28 °C po dobu 2 dní.

4.5.14 Transientní transformace *N. benthamiana*

Pro ověření funkčnosti konstruktů *AtUBQ10::YFP:cOMTK1*, který byl transformován do bakterií *A. tumefaciens*, a lokalizaci fúzního proteinu *in vivo* byla provedena transientní transformace. Z Petriho misek s tuhým LB médiem, na nichž narostly kolonie bakterií byly vybrány jednotlivé kolonie, které byly setřeny sterilním dřevěným párátkem do 50ml Falkonovy zkumavky obsahující 10 ml LB tekutého média se selekčními antibiotiky. Jako negativní kontrola a zároveň blank při měření optické hustoty byla použita 1,5ml mikrozkumavka obsahující 1,2 ml LB tekutého média se stejnou koncentrací selekčních antibiotik, do které nebyly přidány bakterie. Bakterie a negativní kontrola byly ponechány ve tmě jeden den při 28 °C a 200 rpm. Z narostlých kultur byly vytvořeny kryokonzervy.

Falkonovy zkumavky s narostlými kulturami byly umístěny do centrifugy při 3000 g po dobu 10 minut. Supernatant byl odlit a k peletu byly přidány 2 ml inokulačního média, zkumavky byly důkladně zvortexovány, aby došlo k rozpuštění veškerého peletu. Falkonovy zkumavky byly znovu centrifugovány při 3000 g po dobu 10 minut za účelem vymytí zbytků antibiotik a LB média. Supernatant byl odlit, byly přidány 2 ml inokulačního média a zkumavky byly zvortexovány.

V kyvetách, do kterých bylo napipetováno 50 μ l bakteriální kultury a 450 μ l inokulačního média, byla změřena optická hustota při 600 nm (OD₆₀₀), ze získaných hodnot byl vypočten

objem bakteriálních kultur, které byly napipetovány do mikrozkušavek společně s inokulačním médiem. Bakteriální kultura byla naředěna inokulačním médiem tak, aby optická hustota v 2 ml odpovídala $OD_{600} = 0,7$. Takto připravené bakteriální suspenze byly inkubovány ve tmě po dobu 2 hodin.

Rostliny *N. benthamiana*, které byly pěstovány v kontrolovaných podmínkách fytotronu, byly minimálně dvě hodiny před transformací zality vodou, aby došlo k otevření stomat rostliny. Inokulační médium s bakteriemi bylo nabráno do plastové injekční stříkačky a vtlačeno přes stomata do spodní strany listů. Zóna infiltrace byla označena černou fixou.

Část inokulovaných listů byla použita k fenotypové analýze, jako kontroly byly použity listy inokulované konstrukty p19 a inokulačním médiem bez bakterií. Průběžně byly pořizovány snímky listů.

4.5.15 Mikroskopické pozorování

Pozorování inokulovaných listů bylo provedeno 2 až 3 dny po transienční transformaci. Mikroskopické preparáty byly připraveny odstřížením části listů ve tvaru trojúhelníku, kdy jeden ze tří vrcholů obsahoval inokulovanou část listu a dva zbylé byly až za inokulovanou zónou. Odstřižená část listu byla abaxiální stranou vzhůru umístěna na podložní sklíčko. Na list byla nanesena kapka deionizované vody a vzorek byl překryt krycím sklíčkem, celý preparát byl navíc stabilizován upevněním parafilmu po stranách. Listy byly pozorovány pod epifluorescenčním mikroskopem Axio Imager.M2 (objektiv EC Plan-Neofluar 20x/0,4 Korr M27) a konfokálním laserovým skenovacím mikroskopem LSM 710 Axio Imager 2 (objektiv Plan-Apochromat 20x/0,8 M27). Snímky byly pořízeny a zpracovány v aplikaci ZEN 3.4 (blue edition) a ZEN 3.0 (black edition), kde byla použita aplikace „Z-stack“ pro snímání více optických rovin jedné buňky.

Na epifluorescenčním mikroskopu byla použita černobílá kamera a kanál TagYFP s excitační vlnovou délkou 508 nm a emisní vlnovou délkou 524 nm, který odpovídá excitačnímu maximu proteinu YFP. Pro ověření specifity signálu byly jako kontroly použity kanály DAPI s excitační vlnovou délkou 353 nm a emisní vlnovou délkou 465 nm a kanál TagRFP s excitační vlnovou délkou 558 nm a emisní vlnovou délkou 583 nm, čímž byla vyloučena autofluorescence listu při použití funkce „merge“ kdy dochází k překryvu kanálu a je možno vyhodnotit specifitu signálu. Na konfokálním mikroskopu byly použity kanály YFP s excitační vlnovou délkou 514 nm a emisní vlnovou délkou 571 nm, RFP s excitační vlnovou délkou 633 nm a emisní vlnovou délkou 680 nm a DAPI s excitační vlnovou délkou 405 nm a emisní vlnovou délkou 457 nm.

4.5.16 Extrakce proteinů

Proteiny byly extrahovány z listů *N. benthamiana* tři dny po tranzientní transformaci. Z listů byly odštířeny inokulované oblasti, které byly následně zmrazeny v tekutém dusíku a uchovávány při -80 °C. Po celou dobu homogenizace byly listy uchovávány v tekutém dusíku, všechny laboratorní nástroje včetně třecí misky s tloučkem byly vychlazeny tekutým dusíkem, aby nedošlo k degradaci proteinů. Listy byly umístěny do třecí misky, kde byly rozmělněny na jemný prášek, který byl přenesen do 1,5ml mikrozkušavek přibližně po rysku 250 µl. Mikrozkušavky byly ihned umístěny do tekutého dusíku a následně skladovány při -80 °C do dalšího použití.

Ke vzorkům, které byly použity pro SDS-PAGE, byl přidán pufr E. Do 1,5ml mikrozkušavek s homogenizovanými listy bylo přidáno 200 µl vychlazeného extrakčního pufru E. Ke vzorkům, které byly použity pro nativní PAGE bylo přidáno 200 µl fosfátového pufru. Mikrozkušavky byly krátce promíchány na vortexu, stočeny na stolní centrifuze a ponechány 30 minut na ledu, následně byly centrifugovány při 7000 g po dobu 10 minut v předem vychlazené centrifuze na 4 °C. Supernatant byl odebrán do nových předem vychlazených 1,5ml mikrozkušavek a centrifugace byla zopakována za účelem získání čistého supernatantu bez peletu. Takto připravené vzorky extrahované ve fosfátovém pufru byly uskladněny při -20 °C.

Ke vzorkům extrahovaným v pufru E byl přidán 4x Laemliho pufr (Laemli Sample Buffer, LSB) obsahující 2-merkaptoethanol. Ke 150 µl vzorku bylo přidáno 50 µl 4x LSB (obsahující 10 µl 2-merkaptoethanolu). Poměr extraktu proteinů a činidla odpovídal poměru 3:1 a finální koncentrace 2-merkaptoethanolu ve vzorku byla 5 %. Takto připravené vzorky byly promíchány na vortexu a stočeny na stolní centrifuze. Následně byly mikrozkušavky umístěny do thermobloku a denaturovány při 95 °C po dobu 3 minut. Po zchlazení vzorků umístěných na ledu byly uchovány při -20 °C.

4.5.17 Měření koncentrace proteinů

Stanovení koncentrace izolovaných proteinů z rostliny *N. benthamiana* bylo provedeno Bradfordovou metodou, a to měřením změny absorbance po adsorpční vazbě barviva na molekulu proteinu.

Bradfordovo činidlo 5x bylo smícháno s deionizovanou vodou v poměru 1:5. Takto naředěné Bradfordovo činidlo 1x bylo rozpipetováno po 299 µl do 96 jamkové destičky. Následně byl do každé jamky přidán 1 µl proteinů rozpuštěných v extrakčním pufru E. Jako referenční vzorek byl využit extrakční pufr E bez izolovaných proteinů. Jednotlivé jamky byly opatrně

promíchány pipetou, tak aby se nevytvořily bubliny vzduchu, a byly ponechány inkubovat se po dobu 10 minut. Následně byla 96 jamková destička vložena do přístroje Tecan Infinite F200 Fluorescence Microplate Reader, kde byly změřena absorbance při vlnové délce 595 nm.

Každý vzorek byl měřen ve třech opakováních. Výsledná koncentrace byla vypočtena za pomoci kalibrační křivky, která byla vytvořena změřením koncentrací roztoků BSA o známé koncentraci (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$). Vypočtené koncentrace byly použity pro nanesení stejného množství proteinů na polyakrylamidový gel. Výpočty a zpracování dat bylo provedeno v programu Microsoft Excel.

4.5.18 Nativní PAGE

Za účelem ověření přítomnosti fúzního proteinu byly separovány proteiny extrahované ve fosfátovém pufru na polyakrylamidovém gelu za nedenedurujících podmínek. Byl připraven 1mm polyakrylamidový gel, kde spodní část tvořil 10% rozdělovací gel a vrchní část 10% zaostřovací gel. Do připravené aparatury byl nalit rozdělovací gel, který byl převrstven isopropanolem a gel byl ponechán 45 minut zatuhnout. Isopropanol byl odlit a do aparatury byl nalit zaostřovací gel. Po 30 minutách byla aparatura pro elektroforézu vložena do vaničky s ledem, aby bylo zabráněno zahřátí pufru a denuraci vzorků. Gel byl zalit 1x Transfer pufr a do jednotlivých jamek bylo nanášeno po 15 μl od každého vzorku. Aparatura byla připojena ke zdroji napětí a byla spuštěna po dobu 10 min při 100 V a následně 60 minut při 180 V. Po ukončení separace byl gel umístěn do deionizované vody, kde byl promyt po dobu 10 minut. Snímek gelu byl pořízen v dokumentačním zařízení ChemiDoc MP Imaging System. Po změření fluorescence byly snímky vyhodnoceny za pomoci softwaru Image Lab.

4.5.19 SDS-PAGE a Western blot

Byla provedena SDS-PAGE za účelem separace proteinů. Nejdříve byl připraven polyakrylamidový gel, spodní část tvořil 10% rozdělovací gel a vrchní část 10% zaostřovací gel. Gel byl umístěn do elektroforetické aparatury umístěné ve vaničce s ledem a byl zalit 1x Running pufr. Do první jamky bylo napipetováno 5 μl proteinového standardu (Precision Plus Protein Dual Colour Standards) a do zbylých jamek 20 μg proteinů extrahovaných v pufru E. Separace proteinů probíhala po dobu 75 minut při 180 V. Proteiny separované metodou SDS-PAGE byly po dobu 10 minut promyty v deionizované vodě a následně po dobu 10 minut v Transferovém pufru 1x.

Následně byly separované proteiny přeneseny na membránu. Před složením kazety byla PVDF membrána o rozměrech stran 8,5 a 6 cm aktivována ponořením do methanolu po dobu

30 s. Následně byla sestavena kazeta, a to z houbičky, filtračního papíru, PVDF membrány, polyakrylamidového gelu, který byl uhlazen válečkem, aby byly odstraněny bublinky vzduchu, filtračního papíru a houbičky. Všechny složky kazety byly průběžně vlhčeny v Transfer pufru 1x. Takto složená kazeta byla vložena do aparatury pro transfer proteinů s Transfer pufrům 1x a methanolem (50 ml methanolu na 950 ml Transfer pufr 1x), v níž byly umístěny vychlazené bloky. Přenos proteinů na PVDF membránu probíhal při 100 V po dobu 2 hodin.

Byla použita třepačka MR-12, která byla nastavena pro promývání na 50 rpm a při inkubaci s protilátkami a blokování membrány na 15 rpm. Membrány byly po transferu promyty deionizovanou vodou po dobu 10 minut. Následně byly obarveny po dobu 1 minuty 0,2% roztokem Ponceau S, třikrát krátce promyty deionizovanou vodou a zdokumentovány obrazovým skenerem Image Scanner III pro ověření úspěšného přenosu proteinů na membránu. Membrány byly promývány v pufru TBS-T (Tris buffer saline s přísadkou Tween 20) až do odbarvení roztoku Ponceau S. Vazebná místa na membráně byly blokovány v 5% (w/v) roztoku odtučněného sušeného mléka v TBS-T pufru při 4 °C přes noc. Polyakrylamidové gely byly obarveny roztokem Coomassie Brilliant Blue pro zviditelnění nepřenesených proteinů a zdokumentovány obrazovým skenerem Image Scanner III.

Následující den byly membrány třikrát promyty v pufru TBS-T pokaždé po dobu 10 minut. Následovala inkubace v 12,5 µl primární protilátky anti-GFP naředěné v poměru 1:1000 a rozpuštěné v 4% (w/v) roztoku odtučněného sušeného mléka v TBS-T pufru po dobu 1,5 hodiny. Po inkubaci byly membrány pětkrát promyty TBS-T pufru po 10 minutách. Následovala inkubace membrány po dobu 2 hodin v 12,5 ml roztoku sekundárních protilátek (Goat anti-rabbit protilátka konjugovaná s křenovou peroxidasou) naředěných v poměru 1:5000 a rozpuštěných v 1% (w/v) BSA v TBS-T pufru. Membrány byly čtyřikrát promyty v TBS-T pufru po dobu 10 minut.

Pro vizualizaci proteinů značených protilátkami byly membrány po dobu 2 minut inkubovány v 6 ml Clarity Western ECL Substrate. Následně byly membrány vloženy do dokumentačního zařízení ChemiDoc MP Imaging System, kde byl zvolen program Chemi Hi Sensitivity pro detekci luminiscence křenové peroxidasy se substrátem. Snímky byly vyhodnoceny v programu Image Lab.

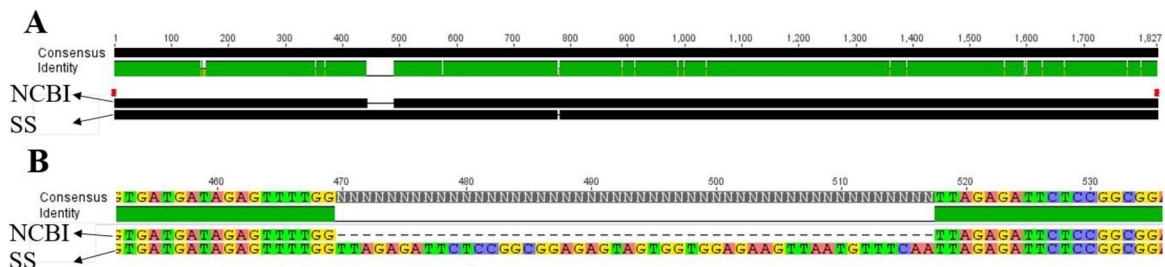
5 Výsledky

5.1 *In silico* analýza genu *OMTK1*

V databázi BlastN (Ref. 9) byl vyhledán ortolog genu *OMTK1* (accession number AJ575100.1) u rostliny *A. thaliana*. Největší procento identity 72.88 % vykazoval gen *MEKK1* (accession number NM_116919.4) (Zhang *et al.*, 2000). V databázi BlastP (Ref. 10) byl taktéž vyhledán ortolog proteinu OMTK1 (accession number CAE00640.1) u rostliny *A. thaliana*, protein MEKK1 (accession number OAO97072) vykazoval procento identity 51,4 % (Altschul *et al.*, 1997; Altschul *et al.*, 2005).

Na webové stránce Sequenceserver 2.0.0 (Priyam *et al.*, 2019) byla získána genomická DNA rostliny *M. sativa* RSY. V softwaru ApE – A plasmid Editor v2.0.37 byly navrženy primery pro získání cDNA, gDNA a promotoru genu *OMTK1* se specifickými att místy a primery pro Sangerovo sekvenování entry klonů viz Příloha 1.

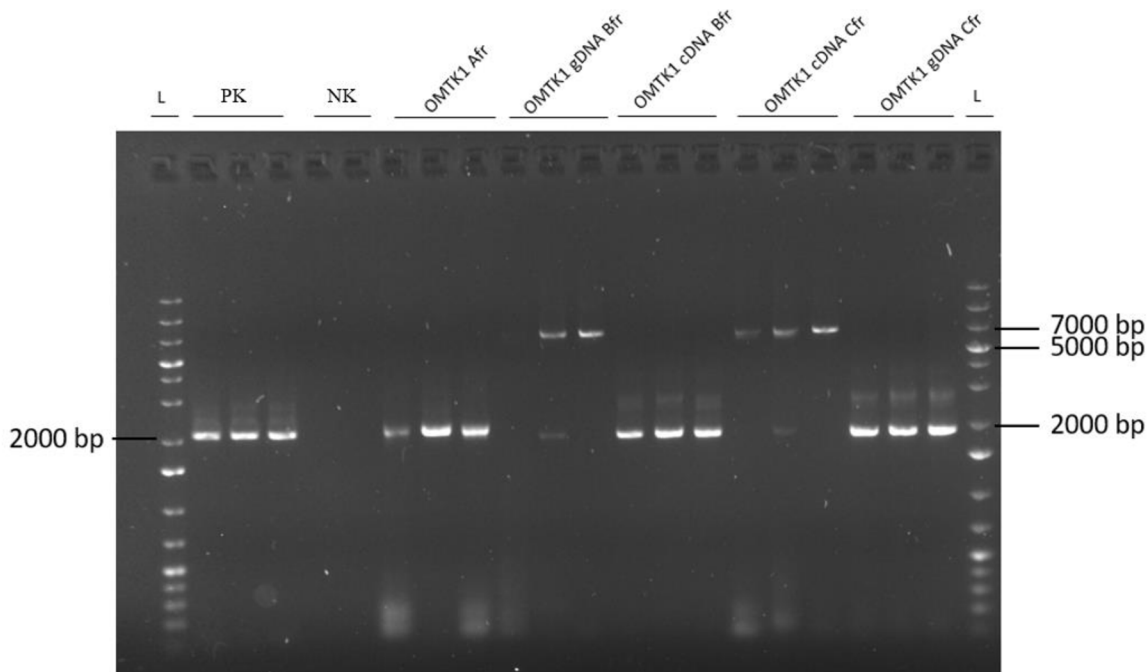
Nukleotidová sekvence získaná Sangerovým sekvenováním (viz Příloha 3) byla porovnána se sekvencí z databáze NCBI (viz Příloha 4) v programu Geneious version 7.1. Na Obrázku 10A lze vidět dvě delece/inzerce, první o délce 48 nukleotidů a druhou o délce tři nukleotidy (přerušení černé čáry), zároveň jsou zde vidět jednotlivé jednonukleotidové polymorfismy (přerušení zelené čáry). Na Obrázku 10B je detailně zobrazena první delece/inzerce.



Obrázek 10: Porovnání sekvence genu *OMTK1* získané Sangerovým sekvenováním (SS) a referenční sekvence dostupné v databázi NCBI (Ref. 3). Sekvence byly porovnány v programu Geneious version 7.1.

5.2 MultiSite Gateway klonování genu *OMTK1*

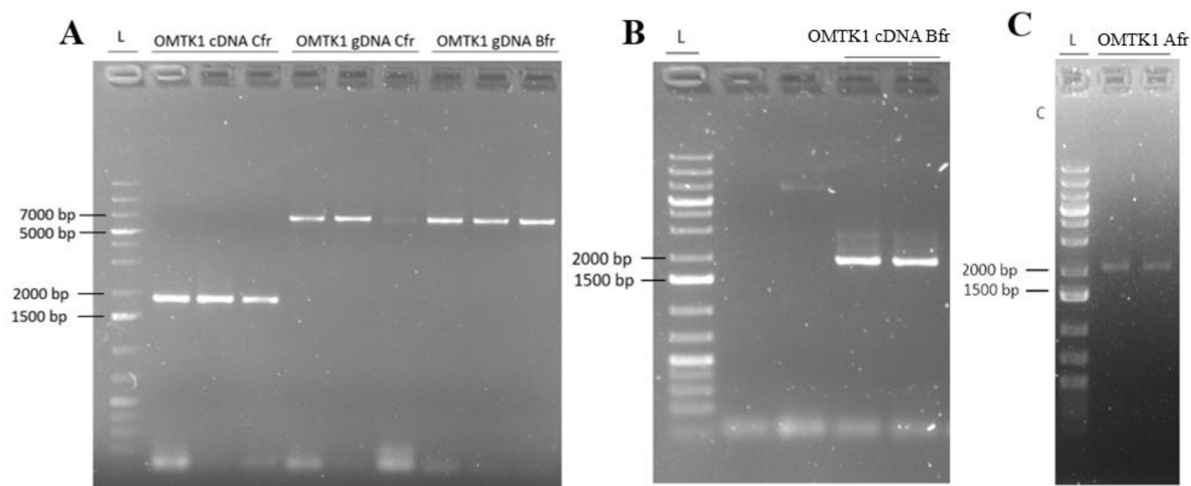
Pro ověření funkčnosti specifických primerů navržených pro amplifikaci genu *OMTK1* byla provedena PCR s Phire II polymerázou viz Obrázek 11. Byla použita gDNA a cDNA izolovaná z tolíce vojtěšky (*M. sativa*) kultivaru RSY. Jako pozitivní kontrola byla použita PCR směs s primery pro MMK3-Afr-Fw2 a MMK3-Afr-Rev1 pro amplifikaci promotoru genu *MMK3* a jako negativní kontrola byla použita PCR směs bez primerů (premix byl pipetován



Obrázek 11: Ověření funkčnosti primerů pomocí PCR a elektroforetické separace na agarosovém gelu. L- marker relativní molekulové hmotnosti; PK- pozitivní kontrola (očekávaná velikost amplikonu 2000 bp); NK- negativní kontrola; OMTK1 Afr- očekávaná velikost amplikonu 2055 bp; OMTK1 gDNA/cDNA Bfr- očekávaná velikost amplikonu 6658 a 1840 bp; OMTK1 gDNA/cDNA Cfr- očekávaná velikost amplikonu 6652 a 1834 bp.

s templátovou DNA a následně byly pipetovány testované primery). V PCR reakci byly využity specificky navrhnuté primery. Primery OMTK1_Afr_Fw1 a OMTK1_Afr_Rev1 byly použity pro získání amplikonu OMTK1 Afr. Primery OMTK1_Bfr_Fw1 a OMTK1_Bfr_Rev1 byly použity pro získání amplikonu OMTK1 cDNA/gDNA Bfr. Primery OMTK1_Cfr_Fw1 a OMTK1_Cfr_Rev1 byly použity pro získání amplikonu OMTK1 cDNA/gDNA Cfr.

Následně byla provedena PCR s iProof™ High-Fidelity DNA polymerázou, pro získání PCR amplikonů se specifickými attB místy, které byly dále použity v rekombinační BP reakci. PCR amplikony musely být před BP reakcí přečištěny kitem Nucleospin gel an PCR clean-up. Pro ověření přítomnosti amplikonů byla provedena agarosová elektroforéza viz Obrázek 12.



Obrázek 12: Ověření přítomnosti PCR amplikonů po přečištění elektroforetickou separací na agarosových gelech. L- marker relativní molekulové hmotnosti; A) OMTK1 cDNA/gDNA Cfr- amplikon komplementárního/genomického genu OMTK1 s attB2 a attB3 místem (očekávaná velikost amplikonu 6652 a 1834 bp); OMTK1 gDNA Bfr- amplikon genomického genu OMTK1 s attB1 a attB2 místem (očekávaná velikost amplikonu 6658 bp); B) OMTK1 cDNA Bfr- amplikon komplementárního genu *OMTK1* s attB1 a attB2 místem (očekávaná velikost amplikonu 1840 bp); C) OMTK1 Afr- amplikon promotoru genu *OMTK1* s attB4 místem a attB1 místem (očekávaná velikost amplikonu 2055 bp).

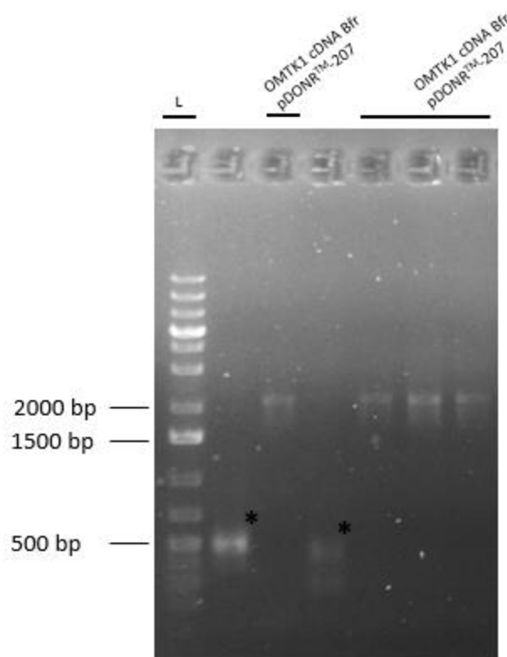
Buňky *E. coli* kmene DH5 α i TOP10 vykazovaly obdobný počet transformovaných buněk narostlých na LB tuhém médiu, z důvodu mírně většího množství narostlých kolonií u kmene DH5 α byl v další práci využit tento kmen.

Úspěšnost rekombinace PCR amplikonů se specifickými att místy do příslušných donorových vektorů za vzniku entry klonů byla ověřena metodou PCR kolonií. Na Obrázku 13 je reprezentativní elektroforetogram donorového vektoru pDONRTM-207 po rekombinaci cDNA sekvence genu *OMTK1* za vzniku B fragmentu pro MultiSite Gateway klonování. K amplifikaci byly použity primery pDONR207_seq_Fw a pDONR207_seq_Rev. Na Obrázku 13 lze vidět tři úspěšně rekombinované entry klony a dva nežádoucí produkty primer-dimer.

Metodou PCR kolonií byly ověřeny všechny entry klony. V Tabulce 7 jsou uvedeny počty testovaných kolonií a počet úspěšně rekombinovaných plazmidů genem zájmu. Z těchto hodnot byla vypočtena úspěšnost BP rekombinační reakce.

Tabulka 7: Počet testovaných kolonií entry klonů po BP reakci a její procentuální úspěšnost.

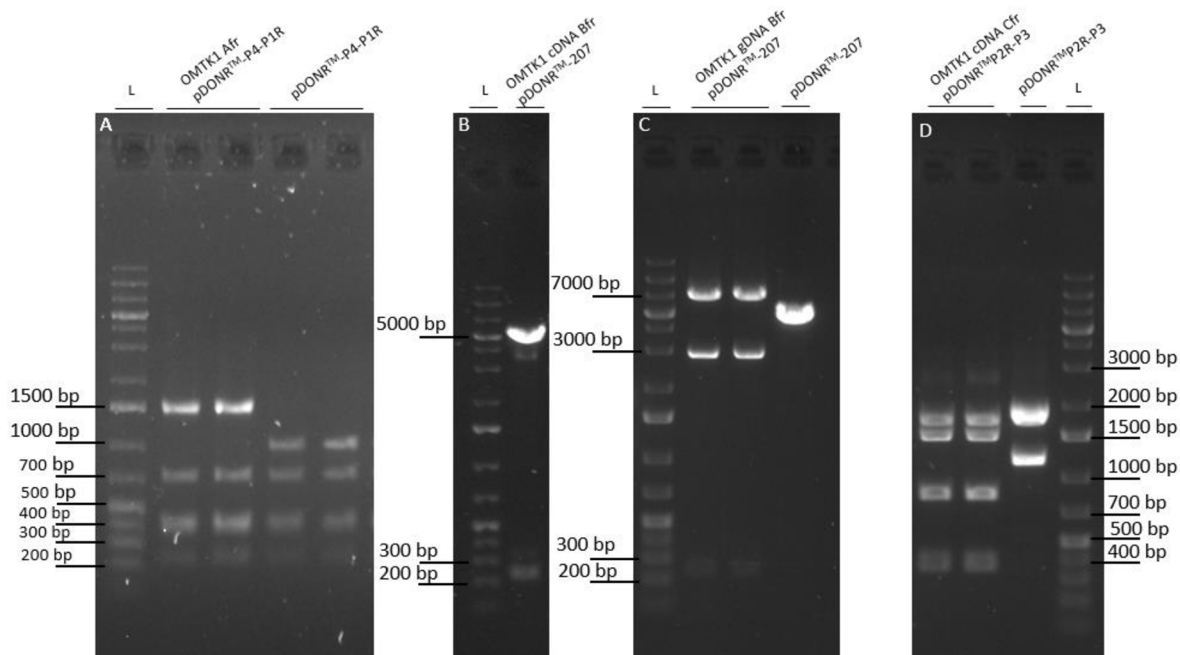
	Počet testovaných kolonií po BP reakci	Počet kolonií rekombinovaných genem zájmu	Procentuální úspěšnost BP reakce [%]
pDONR TM P4-P1R + promotor OMTK1	112	1	0,89
pDONR TM 207 + gDNA OMTK1	54	10	9,26
pDONR TM 207 + cDNA OMTK1	16	12	75
pDONR TM P2R-P3 + gDNA OMTK1	48	0	0
pDONR TM P2R-P3 + cDNA OMTK1	8	4	37,5



Obrázek 13: Ověření úspěšnosti rekombinace metodou PCR kolonií a elektroforetickou separací na agarosovém gelu. Očekávaná velikost amplikonu úspěšně rekombinovaného donorového vektoru pDONRTM207 genem OMTK1 cDNA Bfr je 2102 bp. L-marker relativní molekulové hmotnosti; hvězdičkou jsou označeny vedlejší nežádoucí produkty primer-dimer.

Následně bylo provedeno restriční štěpení izolovaných entry klonů. Pro restriční štěpení pDONRTMP4-P1R + promotor OMTK1 byla použita restriční endonukleáza TaqI. Byl predikován vznik šesti fragmentů o délce 1496, 1460, 709, 403, 366 a 211 bp. Dva největší fragmenty o velikosti 1496 a 1460 a fragmenty o velikosti 403 a 366 bp nebyly na agarosovém gelu odděleny, jelikož velikost štěpných fragmentů se lišila pouze o 36 a 37 bp. Jako kontrola byl restriční endonukleázou TaqI štěpen taktéž prázdný plazmid pDONRTMP4-P1R, délka štěpných fragmentů byla predikována na 1001, 709, 403, 366 a 211 bp. Fragmenty o velikosti 403 a 366 bp nebyly taktéž na agarosovém gelu odděleny.

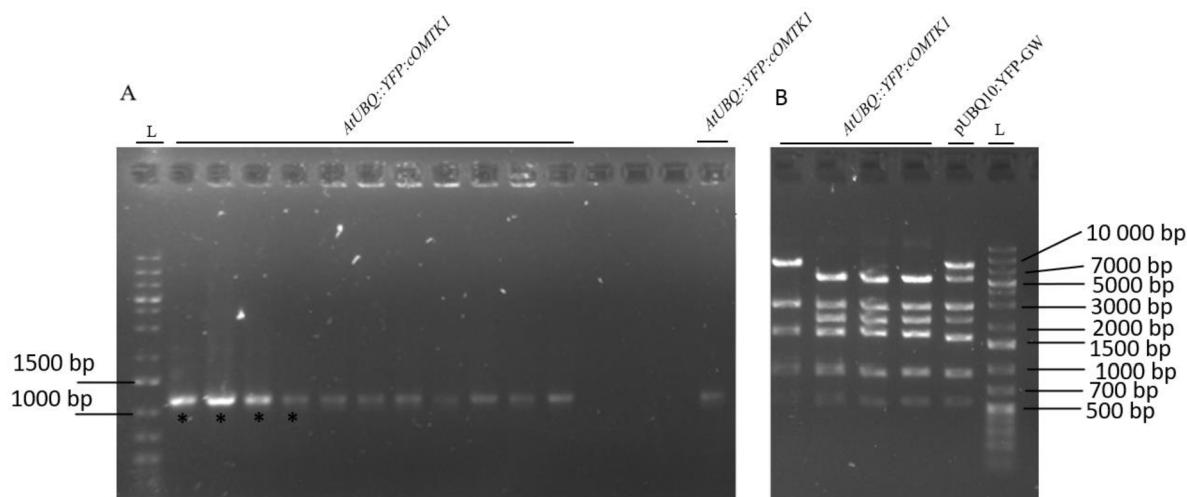
Pro pDONRTM207 + cDNA OMTK1 byl použit enzym PstI Fast Digest, délka očekávaných fragmentů byla predikována na 4914 a 235 bp. Pro pDONRTM207 + gDNA OMTK1 byl použit enzym PstI, délka vzniklých fragmentů byla 6906, 2825 a 235 bp. Pro porovnání byl štěpen taktéž prázdný plazmid pDONRTM207 enzymem PstI, kde vzniklo jedno štěpné místo a výsledný štěpný fragment měl délku 4761 bp. Velikosti štěpných fragmentů odpovídaly očekávání.



Obrázek 14: Restriční štěpení entry klonů pro ověření úspěšnosti BP rekombinace, L- marker relativní molekulové hmotnosti. A) štěpení donorového plazmidu P4-P1R + promotor OMTK1, jako kontrola prázdný donorový plazmid P4-P1R, použitý enzym TaqI; B) štěpení donorového plazmidu 207 + cDNA OMTK1, jako kontrola prázdný donorový plazmid 207, použitý enzym PstI; C) štěpení donorového plazmidu 207 + gDNA OMTK1, použitý enzym PstI; D) štěpení donorového plazmidu P2R-P3 + cDNA OMTK1, jako kontrola prázdný donorový plazmid P2R-P3, použité enzymy PstI a PvuI.

Pro pDONRTMP2R-P3 + cDNA OMTK1 byly použity enzymy PstI a PvuI, kdy délka vzniklých štěpných fragmentů byla predikována na 1752, 1506, 837 a 371 bp. Po restriktivním štěpení byl na agarosové elektroforéze zachycen nedoštěpený fragment o přibližné velikosti 2800 bp. Jako kontrola byl použit prázdný plazmid pDONRTMP2R-P3, který byl štěpen enzymy PstI a PvuI. Predikované štěpné fragmenty měly velikost 1850, 1752 a 1171 bp. Na agarosovém gelu nebyly rozděleny štěpné fragmenty o velikosti 1850 a 1752 bp, což lze vidět z větší velikosti a intenzity spojeného štěpného fragmentu na Obrázku 14D.

Tříkomponentová LR rekombinační reakce byla neúspěšná jak při transformaci do chemokompetentních buněk, tak při opakování LR reakce a následné transformace do elektrokompetentních buněk nebyly na tuhém LB médiu se selekčními antibiotiky zachyceny žádné kolonie. Po provedení jednokomponentové reakce narostly na tuhém LB médiu kolonie. Pro ověření úspěšnosti reakce byla provedena PCR kolonií viz Obrázek 15A, byly použity primery OMTK1_E7_Fw1 nasedající na exon 7 genu *OMTK1* a SeqMe_M13Fw. Takto byly vybrány čtyři kolonie bakterií *E. coli*, z nichž byly izolovány plazmidy pro restriktivní analýzu. Byl použit enzym PstI, plazmid *AtUBQ10::YFP:cOMTK1* měl štěpné fragmenty u prvního vzorku na Obrázku 15B o přibližné velikosti 2800, 1750, 950 a 550 bp a dále zde byl nedoštěpený fragment o velikosti 9000 bp. U zbylých tří plazmidů štěpné fragmenty odpovídaly velikosti 6000, 2800, 2400, 1750, 950 a 550 bp. Velikosti štěpných fragmentů u destinačního plazmidu pUBQ10:YFP-GW byly 6000, 2800, 2400, 1600, 900 a 550 bp. Zároveň zde byl nedoštěpený fragment o velikosti 9000 bp. Velikosti odpovídaly predikovanému štěpení v *in silico* analýze až na fragment o délce 2400 bp. Všechny čtyři expresní klony *AtUBQ10::YFP:cOMTK1* byly chladovým šokem transformovány do buněk *A. tumefaciens* kmene GW3101. Při následné selekci v LB tekutém médiu se selekčními antibiotiky nenarostla jedna kolonie, tudíž byly připraveny tři kultury obsahující konstrukt *AtUBQ10::YFP:cOMTK1* v *A. tumefaciens*.



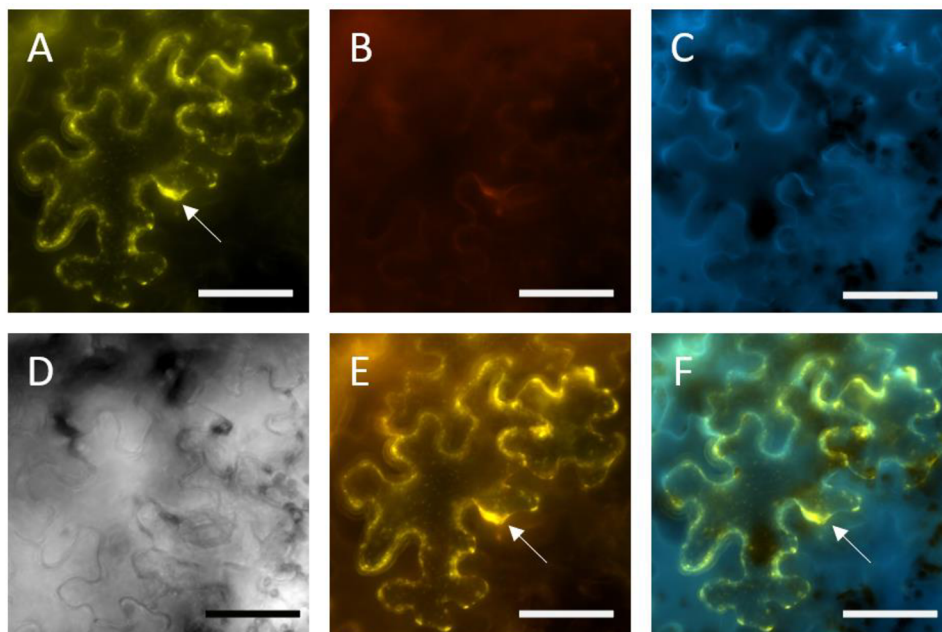
Obrázek 15: Selekcce kolonií *E. Coli* metodou PCR kolonií a restrikční štěpení plazmidu *AtUBQ10::YFP:cOMTK1*. L- marker relativní molekulové hmotnosti. A) Selekcce kolonií *E. Coli* rekombinovaných tímto plazmidem; Hvězdičkou jsou označeny plazmidy, které byly použity pro následné restrikční štěpení; B) Restrikční štěpení rekombinovaného a prázdného plazmidu pomocí enzymu PstI.

5.3 Transientní transformace genu *OMTK1* do listů *N. benthamiana*

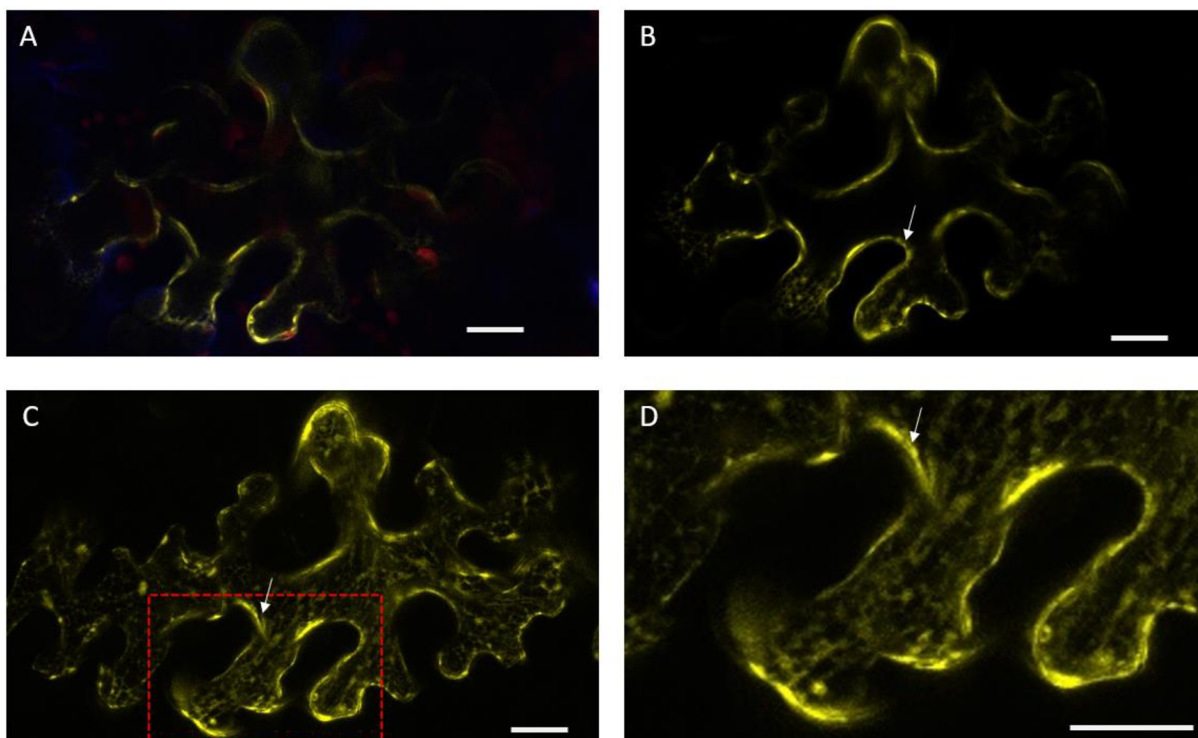
Za účelem ověření funkčnosti konstruktů *AtUBQ10::YFP:cOMTK1* a lokalizace proteinu *OMTK1 in vivo* byly pozorovány listy *N. benthamiana* do nichž byl transientní transformací pomocí *A. tumefaciens* vnesena T-DNA obsahující konstrukt *AtUBQ10::YFP:cOMTK1*. U všech tří naklonovaných kolonií bakterií byla pozorována fluorescence. Listy byly pozorovány druhý a třetí den po transformaci, fluorescence byla nejlépe pozorovatelná den druhý.

Na Obrázku 16 je reprezentativní snímek buňky transformované konstruktem *AtUBQ10::YFP:cOMTK1*, pořízený epifluorescenčním mikroskopem druhý den po transformaci. V kanálu E a F, kde jsou propojeny kanály DAPI a TagRFP s kanálem TagYFP bylo prokázáno, že se jedná o specifický signál konstruktů, a ne o autofluorescenci listu. Na Obrázku 17 a 18 jsou taktéž snímky rekombinovaného proteinu *OMTK1* druhý a třetí den po transformaci pořízené konfokálním mikroskopem. Na Obrázku 18 lze pozorovat výrazné spoty signálu, a taktéž pravděpodobně organely, jež by mohly souviset s nástupem programované buněčné smrti. Specifita signálu byla ověřena propojením tří kanálů YFP, RFP a DAPI.

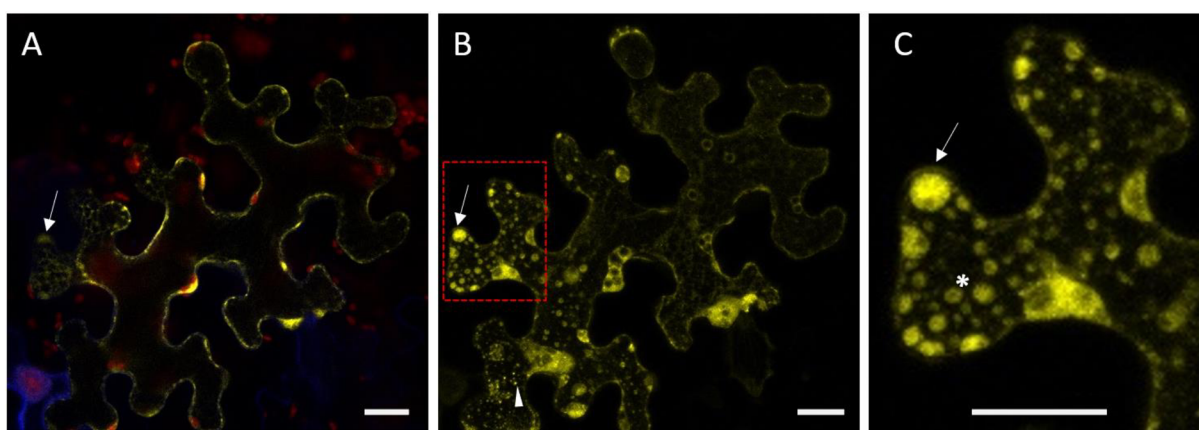
Rekombinantní protein OMTK1 se vyskytuje v cytoplazmě. Akumulovaný cytoplazmatický signál lze pozorovat v oblasti plazmatické membrány v lalocích dlaždicovitých pokožkových buněk. Jako pozitivní kontrola byl použit konstrukt *AtUBQ10::YFP:cMMK3* viz Obrázek 19, protein MMK3 patří mezi MAPK a jeho lokalizace je v cytoplazmatické membráně a jádře buňky. Jako negativní kontrola byly použity listy inokulované konstruktem p19 a inokulačním médiem, u nichž dle očekávání specifická fluorescence pozorována nebyla.



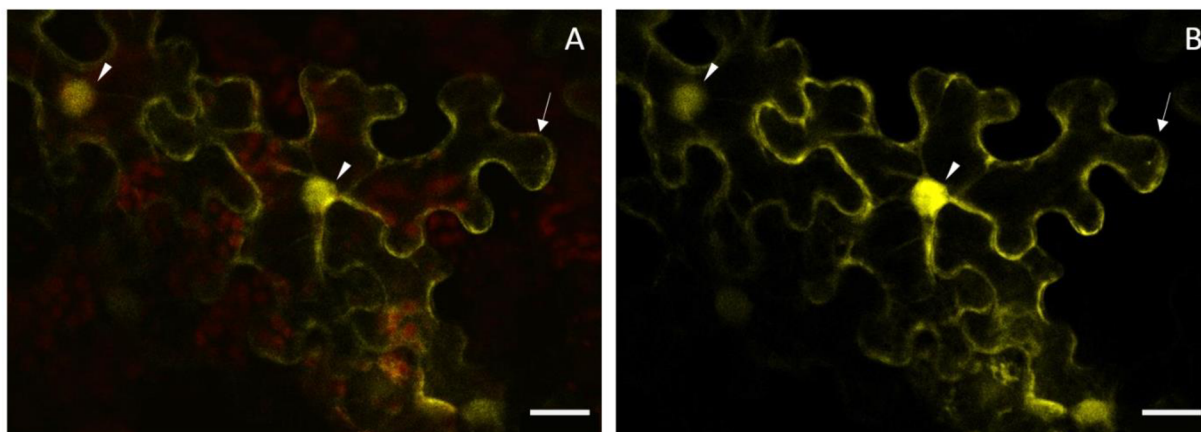
Obrázek 16: Fúzní protein YFP-OMTK1 exprimovaný v epidermálních buňkách listů *N. benthamiana* transientně transformovaných konstruktem *AtUBQ10::YFP:cOMTK1*, pozorovaný epifluorescenčním mikroskopem. Snímky byly pořízeny druhý den po transformaci. Byly použity kanály A- TagYFP; B- TagRFP; C- DAPI; D- černobílá kamera; E- průnik kanálů A a B; F- průnik kanálů A a C. Měřítka = 50 μm ; šipkou je označený akumulovaný cytoplazmatický signál.



Obrázek 17: Fúzní protein YFP-OMTK1 exprimovaný v epidermálních buňkách listů *N. benthamiana* transientně transformovaných konstruktem *AtUBQ10::YFP:cOMTK1*, pozorovaný konfokálním mikroskopem druhý den po transformaci. Snímek A) spojení kanálů YFP+RFP+DAPI; B) kanál YFP; C) kanál YFP použití Z-stack; D) detail laloku buňky. Měřitko = 20 μm ; šipky označují akumulovaný cytoplazmatický signál.



Obrázek 18: Fúzní protein YFP-OMTK1 exprimovaný v epidermálních buňkách listů *N. benthamiana* transientně transformovaných konstruktem *AtUBQ10::YFP:cOMTK1*, pozorovaný konfokálním mikroskopem třetí den po transformaci. Snímek A) spojení kanálů YFP+RFP+DAPI; B) kanál YFP použití Z-stack C) detail laloku buňky. Měřitko = 20 μm ; šipky označují akumulovaný cytoplazmatický signál; trojúhelník označuje spoty signálu; hvězdička označuje domnělé organely.



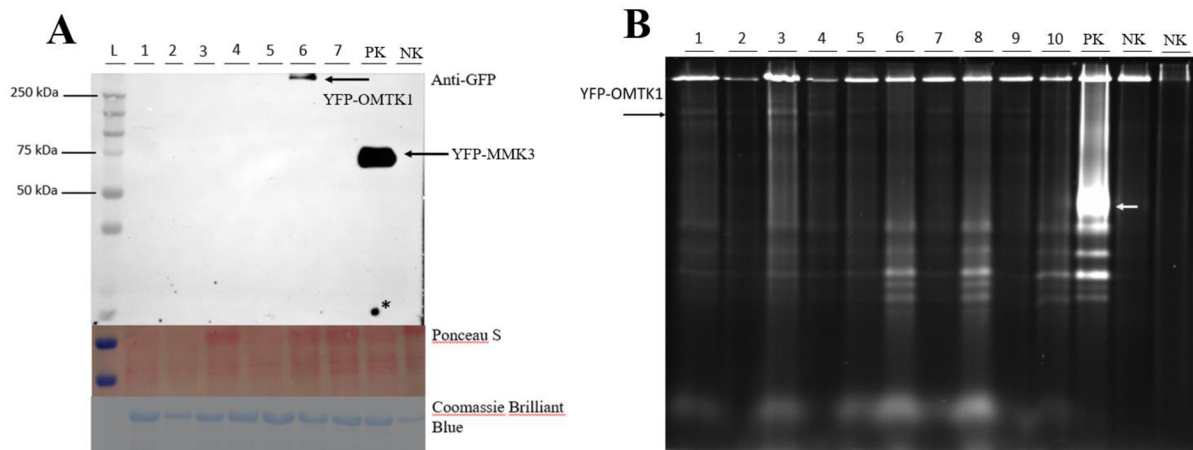
Obrázek 19: Fúzní protein YFP-MMK3 exprimovaný v epidermálních buňkách listů *N. benthamiana* transientně transformovaných bakterií *A. tumefaciens* nesoucí konstrukt *AtUBQ10::YFP:cMMK3* použitý jako kontrola transformace. Snímky byly pořízeny konfokálním mikroskopem třetí den po transformaci, snímek A) spojení kanálů YFP+RFP+DAPI; B) kanál YFP použití Z-stack. Měřítka = 20 μm ; šipky označují specifický signál; trojúhelníky označují jádro.

5.4 Detekce fúzního proteinu YFP-OMTK1

Pro ověření přítomnosti proteinu OMTK1 fúzovaného s fluorescenčním proteinem YFP byly z transformovaných listů extrahovány proteiny.

Byla provedena Western blot analýza pro 14 vzorků proteinů separovaných metodou SDS-PAGE. Proteiny byly detekovány anti-GFP protilátkou, která se váže na protein YFP, tudíž pomocí ní lze detekovat fúzní protein YFP-OMTK1. Na první membráně u vzorku šest byl zachycen pozitivní signál, který ovšem nebyl v očekávané velikosti 94 kDa viz Obrázek 20A. U zbylých vzorků nebyl detekován signál. Pozitivní kontrola obsahuje fúzní protein YFP-MMK3. Negativní kontrola obsahuje proteiny extrahované z listu *N. benthamiana* RSY. Protein OMTK1 má 67 kDa a YFP 27 kDa, tudíž fúzní protein odpovídá velikosti 94 kDa. Protein MMK3 má 43 kDa, tudíž fúzní protein YFP-MMK3 odpovídá velikosti 70 kDa.

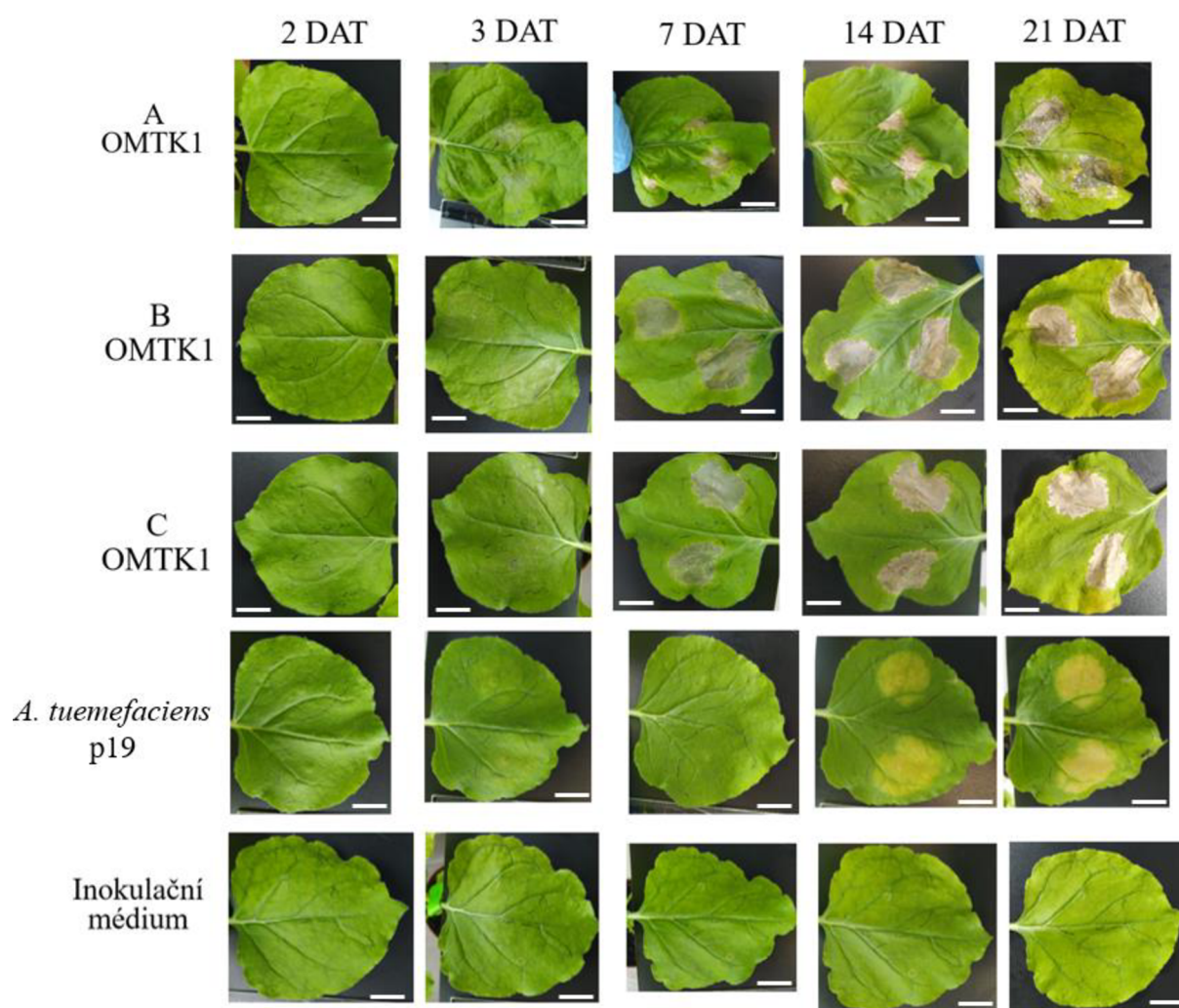
Metodou nativní PAGE byly lokalizovány proteiny vykazující fluorescenční signál při excitačním záření 488 nm. Na Obrázku 20B je šipkou vyznačen potenciální výskyt fúzního genu YFP-OMTK1. Dále jsou na gelu zachyceny nespecifické signály. Pozitivní kontrola a negativní kontrola byla použita stejná, jako u Western blot analýzy. Na druhé membráně byl zachycen pouze nespecifický signál viz Příloha 5.



Obrázek 20: Western blot analýza a nativní PAGE fúzního proteinu YFP-OMTK1. A) Imunodetekce fúzního proteinu YFP-OMTK1 v tranzientně transformovaných listech *N. benthamiana*. Pro imunodetekci proteinů byla použita primární protilátka anti-GFP; L-proteinový standard (Precision Plus Protein Dual Colour Standards); vzorky jsou označeny čísly 1-7; PK- fúzní protein YFP-MMK3; NK- negativní kontrola; šipka značí zachycený signál a hvězdička nespecifický signál. PVDF membrána byla obarvena roztokem Ponceau S pro kontrolu přenosu proteinů, roztok Coomassie Brilliant Blue byl použit pro vizualizaci proteinů, které nebyly přeneseny z gelu. B) Nativní PAGE fúzního proteinu YFP-OMTK1 v tranzientně transformovaných listech *N. benthamiana*; černá šipka značí potenciální signál proteinu OMTK1-YFP vykazující fluorescenci při excitačním záření 488 nm; vzorky jsou označeny čísly 1-10; PK- fúzní protein YFP-MMK3 (bílá šipka); NK- negativní kontrola.

5.5 Analýza fenotypu transientně transformovaných listů *N. benthamiana*

Pro zjištění vlivu nadprodukce fúzního proteinu YFP-OMTK1 byl sledován fenotyp infiltrovaných listů *N. benthamiana*. Transformované listy byly průběžně focený, a to 2, 3, 7, 14 a 21 dní po transformaci (days after transformation; DAT). Jako kontrola byly použity listy infiltrované inokulačním médiem bez bakterií a *A. tumefaciens* s konstruktem p19. Inokulováno bylo alespoň 6 listů od každého konstruktu. Na Obrázku 21 lze vidět vybrané reprezentativní listy. U listů se zvýšenou expresí proteinu YFP-OMTK1 se objevuje již třetí den po transformaci (3 DAT) nekróza a sedmý den po transformaci (7 DAT) ji lze pozorovat skoro v celé infiltrované části listu. U negativních kontrol *A. tumefaciens* obsahujících plazmid p19 lze sledovat mírné náznaky chlorózy od třetího dne po transformaci (3 DAT) a výrazné známky chlorózy od čtrnáctého dne po transformaci (14 DAT), taktéž lze pozorovat mechanické poškození listu v oblasti vpichu. U negativních kontrol s inokulačním médiem nebyly pozorovány výrazné známky odumírání listu, až na mechanické poškození po vpichu.



Obrázek 21: Fenotypová analýza listů *N. benthamiana* po transienční transformaci konstruktem *AtUBQ10::YFP:cOMTK1* indukujícím zvýšenou expresi proteinu YFP-OMTK1. Jako kontrola byly použity buňky *A. tumefaciens* nesoucí konstrukt p19 a inokulační médium bez přidaných bakterií. Snímky byly pořízeny 2, 3, 7, 14 a 21 dní po transformaci (DAT). Měřítka 1 cm.

6 Diskuze

Zemědělství má obrovský dopad na životní prostředí ve světě, protože využívá obrovské množství půdy. Až polovina světové obyvatelné půdy se využívá pro zemědělství. Zajištění udržitelného přístupu k výživné stravě pro všechny je jednou z nejvýznamnějších výzev, kterým čelíme (Ritchie *et al.*, 2022). K roku 2018 stále hladovělo více než 820 milionů lidí na světě, což odpovídá přibližně každému devátému člověku na světě (FAO *et al.*, 2019). Mnohé studie naznačují, že změny klimatu způsobené globálním oteplováním způsobí zvýšení stresu z okolí působící na rostliny, což sníží jejich životaschopnost a produkci. Stále však existuje mnoho neznámých, například jak změny klimatu ovlivní složité interakce mezi fyziologií a chováním rostlin nebo dostupnost a využívání zdrojů (Cho, 2022). Výzkum signalizace spojené s reakcí na stres je velmi důležitý, jelikož nám dává možnost pochopit komplexní pochody odehrávající se v rostlinách, které lze následně aplikovat v zemědělství.

Téma mé bakalářská práce je zaměřeno na výzkum proteinu OMTK1, patřící mezi MAPKKK rostliny tolíce vojtešky (*M. sativa*), který je zapojen v signální kaskádě při odpovědi na stres. Srovnáním nukleotidové sekvence získané osekvenováním vstupních (entry) klonů rekombinovaných genem *OMTK1* izolovaným z *M. sativa* RSY s referenční sekvencí získanou v databázi NCBI (Ref. 3) bylo zjištěno, že mezi 154 a 162 nukleotidem čtecího rámce způsobují tři mutace nukleotidů změnu translace, namísto kyseliny glutamové, serinu a alaninu, které jsou v této pozici v referenčním proteinu se zde objevují kyselina asparagová, leucin a serin. Dále byly objeveny dvě inserce/delece, kdy jedna má velikost 16 aminokyselin a druhá jedné aminokyseliny, tudíž osekvenovaný protein je o 17 aminokyselin delší než referenční. Zbýlých 18 jednonukleotidových mutací je synonymních.

Byly úspěšně naklonovány jednotlivé entry klony a konstrukt *AtUBQ10::YFP:cOMTK1* v plazmidu pUBQ10:YFP-GW se selekcí na rifampicin a kanamycin. Byly připraveny tři kultury obsahující konstrukt *AtUBQ10::YFP:cOMTK1*, u nichž byla mikroskopicky prokázána fluorescence. Zajímavé je, že štěpné fragmenty, které lze vidět na Obrázku 15B u jednoho z klonů (po LR rekombinační reakci a transformaci daného konstrukt) neodpovídají, což může být způsobeno mutací ve štěpném místě, jelikož velikost fragmentu s velikostí 9000 bp přibližně odpovídá svou velikostí dvěma štěpným fragmentům pozorovaným u zbylých konstruktů o velikosti 6000 a 2400 bp, tudíž by se mohla jednat o nerozštěpený fragment. Tomuto by odpovídala i zaznamenaná fluorescence u obou typů kolonií.

Jako kontrola transformace pro expresi proteinu YFP-OMTK1 (MAPKKK) byl použit konstrukt *AtUBQ10::YFP:cMMK3* (Lokajová, 2024), který exprimuje YFP-MMK3 (MAPK)

rekombinovanou do stejného destinačního vektoru a byl již předem pozitivně otestován. Konstrukty *A. tumefaciens* byly transientně transformovány do listů *N. benthamiana*. Byla prokázána funkčnost všech kultur nesoucích stejný konstrukt pro expresi YFP-OMTK1. Při zvýšené expresi proteinu YFP-OMTK1 byla pozorována jeho lokalizace v cytoplazmatické membráně. Nebyla ovšem pozorována jeho lokalizace v jádře, ve kterém se typicky exprimují MAPK MMK2, MMK3 nebo SIMK (Ovečka *et al.*, 2014; Pavlíková, 2022). Zároveň bylo zjištěno, že optimální interval mikroskopování preparátů je již druhý den po transientní transformaci. Jelikož následně buňky vykazovaly fenotyp, který se jevil jako proces podobný plazmolýze.

Pro potvrzení přítomnosti fúzního proteinu YFP-OMTK1 byla provedena nativní PAGE a následně Western blot analýza. Metodou nativní PAGE byl zachycen signál, ovšem nebylo možné s jistotou lokalizovat specifický signál odpovídající fúznímu proteinu YFP-OMTK1. Pomocí Western blot analýzy byl zachycen signál po inkubaci s primárními protilátkami anti-GFP, ovšem jeho molekulární velikost neodpovídala očekávání. To mohlo být způsobeno renaturací fúzního proteinu i přes jeho denaturaci v thermobloku při 95 °C po dobu 3 minut, jelikož vzorek byl následně skladován při -20 °C. Pokud by se protein vrátil do původní konformace nebylo by možné jeho velikost porovnávat s proteinovým standardem (Precision Plus Protein Dual Colour Standards). Western blot analýzu by bylo optimální zopakovat pro potvrzení výsledků.

Fenotypová analýza odpovídala výsledkům popsaným (Nakagami *et al.*, 2004), kde bylo zjištěno, že OMTK1 je zapojen v dráze programované buněčné smrti. Listy *N. benthamiana* v nichž byla zvýšená exprese proteinu YFP-OMTK1 již druhý den po transformaci jevíly zřejmé znaky nekrózy.

Pro budoucí výzkum proteinu OMTK1, by bylo možné z připravených entry klonů pomocí metody MultiSite Gateway klonování v navazující práci připravit nové konstrukty, například i s využitím připraveného nativního promotoru nebo indukovatelného promotoru. Dále by bylo možné připravené entry klony vložit do konstruktů s jinými fluorescenčními proteiny (například cyan fluorescent protein). Což by umožnilo mimo jiné mikroskopickou kolokalizaci s proteinem SIMKK (MAPKK) značeným RFP a SIMK (MAPK) značeným proteinem GFP, jehož nadměrná exprese vede ke zvýšení biomasy v nadzemní části rostlin (Hrbáčková *et al.*, 2020). Takto značené proteiny by bylo možné studovat současně na mikroskopické úrovni, což by mohl mít vysoký biotechnologický potenciál.

7 Závěr

Tato bakalářská práce se zabývala přípravou konstruktů exprimujícího fúzní protein YFP-OMTK1 a jeho testování metodou transientní transformace listů *Nicotiana benthamiana*.

Teoretická část této bakalářské práce byla zaměřena na obecnou charakterizaci mitogen aktivovaných protein kináz (MAPK), na jejich signalizaci při útoku patogenů, růstu, vývinu a abiotickém stresu. Následně byly popsány vybrané MAPK u rostliny *M. sativa*. Dále byl popsán princip Gateway klonování, který byl použit v experimentální části. Tato metoda využívá upravenou místně-specifickou rekombinaci bakteriofágu λ pro vnesení genů zájmu do vektorů.

Experimentální část se věnuje genu *OMTK1*, MAPKKK z *M. sativa*, která je zapojena v signalizačních kaskádách spojených se stresem. V první části byly navrženy specifické primery pro získání genu *OMTK1*. Byly připraveny entry klony genu *OMTK1* metodou MultiSite Gateway klonování, které lze využít pro přípravu dalších konstruktů. Následně byl gen osekvenován a porovnán se sekvencí genu získaným z NCBI (Ref. 3). Byly objeveny dvě inserce/delece, které přidávají ve srovnání s referenčním proteinem 17 aminokyselin, tudíž celková velikost proteinu odpovídá 608 aminokyselinám. Dále byly připraveny a testovány tři kultury *A. tumefaciens* obsahující plazmid *AtUBQ10::YFP:cOMTK1*. Fúzní protein YFP-OMTK1 byl transientně exprimován v listech *N. benthamiana*, kde byl mikroskopicky určena subcelulární lokalizace. Byla zjištěna akumulace cytoplazmatického signálu v oblasti plazmatické membrány a také výrazné spoty signálu.

Na závěr byla provedena fenotypová analýza listů *N. benthamiana*, které byly transientně transformovány konstruktem *AtUBQ10::YFP:cOMTK1*. Výsledky pokusu naznačují zapojení proteinu OMTK1 v programované buněčné smrti, listy rostliny *N. benthamiana* s nadexpresí proteinu YFP-OMTK1 vykazovaly již druhý den po transformaci známky programované buněčné smrti.

Důležitou částí práce byla příprava entry klonů, jejichž funkčnost byla otestována vytvořením konstruktů *AtUBQ10::YFP:cOMTK1*. Připravené entry klony bude možno využít pro přípravu dalších rekombinantních proteinů OMTK1.

8 Literatura

8.1 Odborná literatura

Abbani M. A., Papagiannis C. V., Sam M. D., Cascio D., Johnson R. C., Clubb R. T. (2007): Structure of the cooperative Xis-DNA complex reveals a micronucleoprotein filament that regulates phage lambda intasome assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(7):2109-14.

Altschul S. F., Madden T. L., Schäffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D. J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

Altschul S. F., Wootton J. C., Gertz E. M., Agarwala R., Morgulis A., Schäffer A. A., Yu Y. (2005): Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices, *FEBS J.* 272:5101-5109.

Asai T., Tena G., Plotnikova J., Willmann M. R., Chiu W. L., Gomez-Gomez L., Boller T., Ausubel F. M., Sheen J. (2002): MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature* 415(6875):977-83.

Bahassi E. M., O'Dea M. H., Allali N., Messens J., Gellert M., Couturier M. (1999): Interactions of CcdB with DNA gyrase. Inactivation of Gyra, poisoning of the gyrase-DNA complex, and the antidote action of CcdA. *J Biol Chem.* 16;274(16):10936-44.

Banno H., Hirano K., Nakamura T., Irie K., Nomoto S., Matsumoto K., Machida Y. (1993): NPK1, a tobacco gene that encodes a protein with a domain homologous to yeast BCK1, STE11, and Byr2 protein kinases. *Mol Cell Biol.* 13(8):4745-52.

Bartels S., Anderson J. C., González Besteiro M. A., Carreri A., Hirt H., Buchala A., Métraux J. P., Peck S. C., Ulm R. (2009): MAP kinase phosphatase1 and protein tyrosine phosphatase1 are repressors of salicylic acid synthesis and SNC1-mediated responses in Arabidopsis. *Plant Cell.* 2009 (9):2884-97.

Bemis S. M., Lee J. S., Shpak E. D., Torii K. U. (2013): Regulation of floral patterning and organ identity by Arabidopsis ERECTA-family receptor kinase genes. *J Exp Bot.* 64(17):5323-33.

Bernard P., Couturier M. (1992): Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *J Mol Biol.* 226(3):735-45.

Bi G., Zhou Z., Wang W., Li L., Rao S., Wu Y., Zhang X., Menke F. L. H, Chen S., Zhou J. M. (2018): Receptor-Like Cytoplasmic Kinases Directly Link Diverse Pattern Recognition Receptors to the Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase Cascades in Arabidopsis. *Plant Cell.* 30(7):1543-1561.

Bögge L., Calderini O., Binarova P., Mattauch M., Till S., Kiegerl S., Jonak C., Pollaschek C., Barker P., Huskisson N. S., Hirt H., Heberle-Bors E. (1999): A MAP kinase is activated late in plant mitosis and becomes localized to the plane of cell division. *Plant Cell*. 11(1):101-13.

Boller T., Felix G. (2009): A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu Rev Plant Biol.*; 60:379-406.

Brock A. K., Willmann R., Kolb D., Grefen L., Lajunen H. M., Bethke G., Lee J., Nürnberger 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 Physiol*. 153(3):1098-111.

Buday L., Tompa P. (2010): Functional classification of scaffold proteins and related molecules. *FEBS J*. 277(21):4348-55.

Bushman W., Thompson J. F., Vargas L., Landy A. (1985): Control of directionality in lambda site specific recombination. *Science*. 230(4728):906-11.

Canagarajah B. J., Khokhlatchev A., Cobb M. H., Goldsmith E. J. (1997): Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell*. 90(5):859-69.

Cardinale F., Meskiene I., Ouaked F., Hirt H. (2002): Convergence and divergence of stress-induced mitogen-activated protein kinase signaling pathways at the level of two distinct mitogen-activated protein kinase kinases. *Plant Cell*. 14(3):703-11.

Cardinale F., Meskiene I., Ouaked F., Hirt H. (2002): Convergence and divergence of stress-induced mitogen-activated protein kinase signaling pathways at the level of two distinct mitogen-activated protein kinase kinases. *Plant Cell*. 14(3):703-11.

Danquah A., de Zelicourt A., Colcombet J., Hirt H. (2014): The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses. *Biotechnol Adv*. 32(1):40-52.

Duke J. A. (1981): *Handbook of LEGUMES of World Economic Importance*. Boston, MA: Springer US.

FAO, IFAD, UNICEF, WFP, WHO (2019): *The State of Food Security and Nutrition in the World 2019. Safeguarding against economic slowdowns and downturns*. Rome, FAO. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Frei dit Frey N., Garcia A. V., Bigeard J., Zaag R., Bueso E., Garmier M., Pateyron S., de Tauzia-Moreau M. L., Brunaud V., Balzergue S., Colcombet J., Aubourg S., Martin-Magniette M. L., Hirt H. (2014): Functional analysis of Arabidopsis immune-related MAPKs uncovers a role for MPK3 as negative regulator of inducible defences. *Genome Biol*. 15(6):R87.

Guan Y., Meng X., Khanna R., LaMontagne E., Liu Y., Zhang S. (2014): Phosphorylation of a WRKY transcription factor by MAPKs is required for pollen development and function in Arabidopsis. *PLoS Genet.* 10(5):e1004384.

Hammad J., Hussain W., Kunwar R., Busmann R., Zambrana N. (2021): *Medicago sativa* L. Fabaceae. 10.1007/978-3-030-57408-6_150.

Hartley J. L., Temple G. F., Brasch M. A. (2000): DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res.* 10(11):1788-95.

Hrbáčková M., Luptovčíak I., Hlaváčková K., Dvořák P., Tichá M., Šamajová O., Novák D., Bednarz H., Niehaus K., Ovečka M., Šamaj J. (2020): Overexpression of alfalfa SIMK promotes root hair growth, nodule clustering and shoot biomass production. *Plant Biotechnology Journal* 19(4):767-784.

Hwarari D., Guan Y., Ahmad B., Movahedi A., Min T., Hao Z., Lu Y., Chen J., Yang L. (2022): ICE-CBF-COR Signaling Cascade and Its Regulation in Plants Responding to Cold Stress. *Int J Mol Sci.* 23(3):1549.

Chardin C., Schenk S. T., Hirt H., Colcombet J., Krapp A. (2017): Review: Mitogen-Activated Protein Kinases in nutritional signaling in Arabidopsis. *Plant Sci.* 260:101-108.

Chen T., Zhou B., Duan L., Zhu H., Zhang Z. (2017): MtMAPKK4 is an essential gene for growth and reproduction of *Medicago truncatula*. *Physiol Plant.* 159(4):492-503.

Cheo D. L., Titus S. A., Byrd D. R., Hartley J. L., Temple G. F., Brasch M. A. (2004): Concerted assembly and cloning of multiple DNA segments using in vitro site-specific recombination: functional analysis of multi-segment expression clones. *Genome Res.* 14(10B):2111-20.

Cho R. (2022): How Climate Change Will Affect Plants. News from the Columbia Climate School. Columbia University in the city of New York

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

Invitrogen by life technologies (2007): User Manual. MultiSite Gateway® ThreeFragment Vector Construction Kit Using Gateway® Technology to simultaneously clone multiple DNA fragments. Catalog no. 12537-023. Version D. 7 March 2007. 25-0541

Invitrogen by life technologies (2012): User Guide. Gateway® Technology with Clonase®. II A universal technology to clone DNA sequences for functional analysis and expression in multiple systems. Catalog no. 12535-029 and 12535-037.

- Jagodzik P., Tajdel-Zielinska M., Ciesla A., Marczak M., Ludwikow A. (2018): Mitogen-Activated Protein Kinase Cascades in Plant Hormone Signaling. *Front Plant Sci*; 9:1387.
- Jonak C., Nakagami H., Hirt H. (2004): Heavy metal stress. Activation of distinct mitogen-activated protein kinase pathways by copper and cadmium. *Plant Physiol.*; 136(2):3276-83.
- Katzen F. (2007): Gateway(®) recombinational cloning: a biological operating system. *Expert Opin Drug Discov.* 2(4):571-89.
- Keshet Y., Seger R. (2010): The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions. *Methods Mol Biol.* 661:3-38.
- Kibbe W. A. (2007): OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res.* 35 (webservice issue): May 25. URL: <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html> (navštíveno 30. 10. 2023)
- Kiegerl S., Cardinale F., Siligan C., Gross A., Baudouin E., Liwosz A., Eklöf S., Till S., Bögre L., Hirt H., Meskiene I. (2000): SIMKK, a mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase, is a specific activator of the salt stress-induced MAPK, SIMK. *Plant Cell.* 12(11):2247-58.
- Kosetsu K., Matsunaga S., Nakagami H., Colcombet J., Sasabe M., Soyano T., Takahashi Y., Hirt H., Machida Y. (2010): The MAP kinase MPK4 is required for cytokinesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell.* 22(11):3778-90.
- Krysan P. J., Jester P. J., Gottwald J. R., Sussman M. R. (2010): An *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinase kinase gene family encodes essential positive regulators of cytokinesis. *Plant Cell.* 14(5):1109-20.
- Lampard G. R., Macalister C. A., Bergmann D.C. (2008): *Arabidopsis* stomatal initiation is controlled by MAPK-mediated regulation of the bHLH SPEECHLESS. *Science.* 322(5904):1113-6.
- Landy A. (1989): Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annu Rev Biochem.* 1989;58:913-49.
- Lee J. S., Hnilova M., Maes M., Lin Y. C., Putarjunan A., Han S. K., Avila J., Torii K. U. (2015): Competitive binding of antagonistic peptides fine-tunes stomatal patterning. *Nature.* 522(7557):439-43.
- Lee J. S., Kuroha T., Hnilova M., Khatayevich D., Kanaoka M. M., McAbee J. M., Sarikaya M., Tamerler C., Torii K. U. (2012): Direct interaction of ligand-receptor pairs specifying stomatal patterning. *Genes Dev.* 26(2):126-36.

Li B., Jiang S., Yu X., Cheng C., Chen S., Cheng Y., Yuan J. S., Jiang D., He P., Shan L. (2015a): Phosphorylation of trihelix transcriptional repressor ASR3 by MAP KINASE4 negatively regulates Arabidopsis immunity. *Plant Cell*. 27(3):839-56.

Li G., Meng X., Wang R., Mao G., Han L., Liu Y., Zhang S. (2012): Dual-level regulation of ACC synthase activity by MPK3/MPK6 cascade and its downstream WRKY transcription factor during ethylene induction in Arabidopsis. *PLoS Genet*. 8(6):e1002767.

Li H., Ding Y., Shi Y., Zhang X., Zhang S., Gong Z., Yang S. (2017): MPK3- and MPK6-Mediated ICE1 Phosphorylation Negatively Regulates ICE1 Stability and Freezing Tolerance in Arabidopsis. *Dev Cell*. 43(5):630-642.e4.

Li X., Kapos P., Zhang Y. (2015b): NLRs in plants. *Curr Opin Immunol*. 32:114-21.

Lian K., Gao F., Sun T., van Wersch R., Ao K., Kong Q., Nitta Y., Wu D., Krysan P., Zhang Y. (2018): MKK6 Functions in Two Parallel MAP Kinase Cascades in Immune Signaling. *Plant Physiol*. 178(3):1284-1295.

Lokajová J. (2024): Štúdium MMK3 proteínu v lucerne siatej a jeho ortológu MPK13 v arábkovke Thalovej. Bakalárská práca, Katedra biotechnológií, PŘF, Univerzita Palackého v Olomouci.

Lu X., Shi H., Ou Y., Cui Y., Chang J., Peng L., Gou X., He K., Li J. (2020): RGF1-RGI1, a Peptide-Receptor Complex, Regulates Arabidopsis Root Meristem Development via a MAPK Signaling Cascade. *Mol Plant*. 13(11):1594-1607.

MacAlister C. A., Ohashi-Ito K., Bergmann D. C. (2007): Transcription factor control of asymmetric cell divisions that establish the stomatal lineage. *Nature*. 445(7127):537-40.

Mao G., Meng X., Liu Y., Zheng Z., Chen Z., Zhang S. (2011): Phosphorylation of a WRKY transcription factor by two pathogen-responsive MAPKs drives phytoalexin biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell*. 23(4):1639-53.

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. *Plant Cell*. 24(12):4948-60.

Meng X., Xu J., He Y., Yang K. Y., Mordorski B., Liu Y., Zhang S. (2013): Phosphorylation of an ERF transcription factor by Arabidopsis MPK3/MPK6 regulates plant defense gene induction and fungal resistance. *Plant Cell*. 25(3):1126-42.

Mizoguchi T., Ichimura K., Irie K., Morris P., Giraudat J., Matsumoto K., Shinozaki K. (1998): Identification of a possible MAP kinase cascade in Arabidopsis thaliana based on pairwise yeast two-hybrid analysis and functional complementation tests of yeast mutants. *FEBS Lett*. 437(1-2):56-60.

Munnik T., Ligterink W., Meskiene I. I., Calderini O., Beyerly J., Musgrave A., Hirt H. (1999): Distinct osmo-sensing protein kinase pathways are involved in signalling moderate and severe hyper-osmotic stress. *Plant J.* 20(4):381-8.

Nakagami H., Kiegerl S., Hirt H. (2004): OMTK1, a novel MAPKKK, channels oxidative stress signaling through direct MAPK interaction. *J Biol Chem.* 279(26):26959-66.

Nishihama R., Soyano T., Ishikawa M., Araki S., Tanaka H., Asada T., Irie K., Ito M., Terada M., Banno H., Yamazaki Y., Machida Y. (2002): Expansion of the cell plate in plant cytokinesis requires a kinesin-like protein/MAPKKK complex. *Cell.* 109(1):87-99.

Ouaked F., Rozhon W., Lecourieux D., Hirt H. (2003): A MAPK pathway mediates ethylene signaling in plants. *EMBO J.* 22(6):1282-8.

Ovečka M., Takáč T., Komis G., Vadovič P., Bekešová S., Doskočilová A., Šamajová V., Luptovčíak I., Samajová O., Schweighofer A., Meskiene I., Jonak C., Křenek P., Lichtscheidl I., Škultéty L., Hirt H., Šamaj J. (2014): Salt-induced subcellular kinase relocation and seedling susceptibility caused by overexpression of *Medicago* SIMKK in *Arabidopsis*. *J Exp Bot.* 65(9):2335-50.

Pavlíková M. (2022): Úlohy vybraných MAPK proteinů u vojtěšky *Medicago sativa*. Bakalářská práce, Katedra biotechnologií, PřF, Univerzita Palackého v Olomouci.

Prelich G. (2012): Gene overexpression: uses, mechanisms, and interpretation. *Genetics.* 190(3):841-54.

Priyam A., Woodcroft B. J., Rai V., Moghul I., Munagala A., Ter F., Chowdhary H., Pieniak I., Maynard L. J., Gibbins M. A., Moon H., Davis-Richardson A., Uludag M., Watson-Haigh N. S., Challis R., Nakamura H., Favreau E., Gómez E. A., Pluskal T., Leonard G., Rumpf W., Wurm Y. (2019): Sequenceserver: A Modern Graphical User Interface for Custom BLAST Databases. *Mol Biol Evol.* 1;36(12):2922-2924.

Ptashne, M. (1992): *A Genetic Switch: Phage (Lambda) and Higher Organisms*, Cell Press, Cambridge, MA

Pullaiah, T. (2021): *Encyclopaedia of World Medicinal Plants 2nd Revised and Enlarged Edn in 7 Vols.* 2021. ISBN 9789352220274.

Qiu J. L., Zhou L., Yun B. W., Nielsen H. B., Fiil B. K., Petersen K., Mackinlay J., Loake G. J., Mundy J., Morris P. C. (2008): *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinases MKK1 and MKK2 have overlapping functions in defense signaling mediated by MEKK1, MPK4, and MKS1. *Plant Physiol.* 148(1):212-22.

Ritchie H., Rosado P., Roser M. (2022): Environmental Impacts of Food Production. Published online at OurWorldInData.org. Retrieved from: 'https://ourworldindata.org/environmental-impacts-of-food' [Online Resource]

Roux M. E., Rasmussen M. W., Palma K., Lolle S., Regué À. M., Bethke G., Glazebrook J., Zhang W., Sieburth L., Larsen M. R., Mundy J., Petersen M. (2015): The mRNA decay factor PAT1 functions in a pathway including MAP kinase 4 and immune receptor SUMM2. *EMBO J.* 34(5):593-608.

Sasabe M., Soyano T., Takahashi Y., Sonobe S., Igarashi H., Itoh T. J., Hidaka M., Machida Y. (2006): Phosphorylation of NtMAP65-1 by a MAP kinase down-regulates its activity of microtubule bundling and stimulates progression of cytokinesis of tobacco cells. *Genes Dev.* 20(8):1004-14.

Sasaki Y., Sone T., Yoshida S., Yahata K., Hotta J., Chesnut J. D., Honda T., Imamoto F. (2004): Evidence for high specificity and efficiency of multiple recombination signals in mixed DNA cloning by the Multisite Gateway system. *J Biotechnol.* 107(3):233-43.

Shan L., He P., Li J., Heese A., Peck S. C., Nürnberger T., Martin G. B., Sheen J. (2008): Bacterial effectors target the common signaling partner BAK1 to disrupt multiple MAMP receptor-signaling complexes and impede plant immunity. *Cell Host Microbe.* 4(1):17-27.

Sharma D., Verma N., Pandey Ch., Verma D., Bhagat K. P., Noryang S., Singh K., Tayyeba S., Banerjee G., Sinha K. A. (2020): MAP Kinase as Regulators for Stress Responses in Plants, National Institute of Plant Genome Research (NIPGR), New Delhi, India,

Schipper-Krom S., Sanz A. S., van Bodegraven E. J., Speijer D., Florea B. I., Ovaas H., Reits E. A. (2019): Visualizing Proteasome Activity and Intracellular Localization Using Fluorescent Proteins and Activity-Based Probes. *Front Mol Biosci.* 6:56.

Schweighofer A., Kazanaviciute V., Scheikl E., Teige M., Doczi R., Hirt H., Schwanninger M., Kant M., Schuurink R., Mauch F., Buchala A., Cardinale F., Meskiene I. (2007): The PP2C-type phosphatase AP2C1, which negatively regulates MPK4 and MPK6, modulates innate immunity, jasmonic acid, and ethylene levels in Arabidopsis. *Plant Cell.* 19(7):2213-24.

Sinha A. K., Jaggi M., Raghuram B., Tuteja N. (2011): Mitogen-activated protein kinase signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signal Behav.* 6(2):196-203.

Sone T., Yahata K., Sasaki Y., Hotta J., Kishine H., Chesnut J. D., Imamoto F. (2008): Multi-gene gateway clone design for expression of multiple heterologous genes in living cells: modular construction of multiple cDNA expression elements using recombinant cloning. *J Biotechnol.* 136(3-4):113-21.

Soyano T., Nishihama R., Morikiyo K., Ishikawa M., Machida Y. (2003): NQK1/NtMEK1 is a MAPKK that acts in the NPK1 MAPKKK-mediated MAPK cascade and is required for plant cytokinesis. *Genes Dev.* 17(8):1055-67.

Sun T., Nitta Y., Zhang Q., Wu D., Tian H., Lee J. S., Zhang Y. (2018): Antagonistic interactions between two MAP kinase cascades in plant development and immune signaling. *EMBO Rep.* 19(7):e45324.

Sun T., Zhang Y. (2022): MAP kinase cascades in plant development and immune signaling. *EMBO Rep.* 23(2):e53817.

Uchida N., Lee J. S., Horst R. J., Lai H. H., Kajita R., Kakimoto T., Tasaka M., Torii K. U. (2012): Regulation of inflorescence architecture by intertissue layer ligand-receptor communication between endodermis and phloem. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109(16):6337-42.

Wang H., Bian X., Xia L., Ding X., Müller R., Zhang Y., Fu J., Stewart A. F. (2013): Improved seamless mutagenesis by recombineering using *ccdB* for counterselection. *Nucleic Acids Res.* 42(5):e37.

Whitmarsh A. J., Davis R. J. (1998): Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals. *Trends Biochem Sci.* 23(12):481-5.

Widmann C., Gibson S., Jarpe M. B., Johnson G. L. (1999): Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev.* 79(1):143-80.

Xu J., Meng J., Meng X., Zhao Y., Liu J., Sun T., Liu Y., Wang Q., Zhang S. (2016): Pathogen-Responsive MPK3 and MPK6 Reprogram the Biosynthesis of Indole Glucosinolates and Their Derivatives in Arabidopsis Immunity. *Plant Cell.* 28(5):1144-62.

Xu J., Zhang S. (2015): Mitogen-activated protein kinase cascades in signaling plant growth and development. *Trends Plant Sci.* 20(1):56-64.

Yan Z., Wang J., Wang F., Xie C., Lv B., Yu Z., Dai S., Liu X., Xia G., Tian H., Li C., Ding Z. (2021): MPK3/6-induced degradation of ARR1/10/12 promotes salt tolerance in Arabidopsis. *EMBO Rep.* 22(10):e52457.

Zhang M., Zhang S. (2022): Mitogen-activated protein kinase cascades in plant signaling. *J Integr Plant Biol.* 64(2):301-341.

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. *Dev Cell.* 33(2):136-49.

Zhang Z., Liu Y., Huang H., Gao M., Wu D., Kong Q., Zhang Y. (2017): The NLR protein SUMM2 senses the disruption of an immune signaling MAP kinase cascade via CRCK3. *EMBO Rep.* 18(2):292-302.

Zhang Z., Schwartz S., Wagner L., Miller W. (2000): A greedy algorithm for aligning DNA sequences, *J Comput Biol*; 7(1-2):203-14.

Zhang Z., Wu Y., Gao M., Zhang J., Kong Q., Liu Y., Ba H., Zhou J., Zhang Y. (2012): Disruption of PAMP-induced MAP kinase cascade by a *Pseudomonas syringae* effector activates plant immunity mediated by the NB-LRR protein SUMM2. *Cell Host Microbe*. 11(3):253-63.

Zhao C., Wang P., Si T., Hsu C. C., Wang L., Zayed O., Yu Z., Zhu Y., Dong J., Tao W. A., Zhu J. K. (2017): MAP Kinase Cascades Regulate the Cold Response by Modulating ICE1 Protein Stability. *Dev Cell*. 43(5):618-629.e5.

8.2 Hypertextové odkazy

Ref. 1: <https://www.snapgene.com/guides/gateway-cloning> (navštíveno 19. 2. 2024)

Ref. 2: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_116919.4 (navštíveno 10. 4. 2023)

Ref. 3: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/32400273> (navštíveno 10. 4. 2023)

Ref. 4: <https://tmcaculator.neb.com/#!/main> (navštíveno 10. 4. 2023)

Ref. 5: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html> (navštíveno 10. 4. 2023)

Ref. 6: <https://eu.idtdna.com/calc/analyzer> (navštíveno 10. 4. 2023)

Ref. 7: <https://www.thermofisher.com/search/browse/category/us/en/90226288>
(navštíveno 10. 6. 2023)

Ref. 8: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/thermo-scientific-restriction-modifying-enzymes/restriction-enzymes-thermo-scientific/double-digest-calculator-thermo-scientific.html> (navštíveno 10. 6. 2023)

Ref. 9:

https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_SPEC=GeoBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch (navštíveno 20. 4. 2023)

Ref. 10: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>
(navštíveno 20. 4. 2023)

9 Přílohy

Příloha 1: Tabulky použitých primerů pro MultiSite Gateway klonování a Sangerovo sekvenování.

Příloha 2: Protokoly dle manuálů výrobce.

Příloha 3: Sekvence použité pro *in silico* analýzy.

Příloha 4: Sekvence cDNA, promotoru a gDNA genu *OMTK1* získané Sangerovým sekvenováním.

Příloha 5: Western blot analýza.

Příloha 1: Tabulky použitých primerů pro MultiSite Gateway klonování a Sangerovo sekvenování:

Sekvence primerů pro MultiSite Gateway klonování s příslušnými attB místy.

Název primeru	Sekvence nukleotidů
OMTK1_Afr_Fw1	5'-GGGGACAAC TTTGTATAGAAAAGTTGTT CCGGCTACAAGATTCACT 3'
OMTK1_Afr_Rev1	5'-GGGGACTGCTTTTTTTGTACAAACTTGA TTAAAGGTGATAAGTCCATTTA 3'
OMTK1_Bfr_Fw1	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAT ATGAATCACTTACCACGAAT - 3'
OMTK1_Bfr_Rev1	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTT ACCTCTTCTCGGAATATG-3'
OMTK1_Cfr_Fw1	5'-GGGG ACAGCTTTCTTGTACAAAGTGGTT ATGAATCACTTACCACGAAT - 3'
OMTK1_Cfr_Rev1	5'-GGGGACAAC TTTGTATAATAAAGTTGA TTAACCTCTTCTCGGAATATG -3'

Sekvence primerů navržené pro Sangerovo sekvenování entry klonů.

Název primeru	Sekvence nukleotidů
OMTK1_I4_Fw1	5'-GTCAGCTTGTCATTGCATCC-3'
OMTK1_I5_Fw1	5'-GAGGTAAAGATGTTGAATTTGAA-3'
OMTK1_E4_Rev1	5'-GTTCAAAC T GACTCAGAAGTGC-3'
OMTK1_I2_Rev1	5'-GCCAACATCAAAC TATTTTTC-3'

Primery použité pro Sangerovo sekvenování entry klonů a MultiSite Gateway klonování.

Název primeru	Sekvence nukleotidů
SeqMe_M13Fw	5'-TG TAAAACGACGGCCAGT-3'
pDONR207_seq_Fw	5'-TCGCGTTAACGCTAGCATGGATCTC-3'
SeqMe_M13rev	5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'
pDONR207_seq_Rev	5'-GTAACATCAGAGATTTT GAGACAC-3'

Příloha 2: Protokoly dle manuálů výrobce:

1. Přečištění PCR produktů

Byl použit kit Nucleospin gel and PCR clean-up (Macherey-Nagel). PCR amplikony byly v 1,5ml mikrozkuhavce naředěny PCR vodou na 50 μ l, bylo přidáno 100 μ l Buffer NTI a obsah mikrozkuhavky byl promíchán automatickou pipetou.

Do jímacích jamek byly vloženy kolonky, na které bylo nanášeno 150 μ l připraveného vzorku, kolonky byly centrifugovány po dobu 30 s při 11 000 g, supernatant byl odlit. Na kolonky bylo nanášeno 700 μ l promývacího Buffer NT3 a byly centrifugovány po dobu 30 s při 11 000 g, supernatant byl odlit. Promytí 700 μ l Buffer NT3 bylo zopakováno, aby došlo k maximálnímu vymytí chaotropních solí a zlepšení čistoty vzorku, supernatant byl opět odlit. Prázdné kolonky v jímacích jamkách byly centrifugovány po dobu 1 minuty při 11 000 g, aby byl kompletně odstraněn ethanol obsažený v Buffer NT3, který by mohl inhibovat enzymatické reakce. Pro úplné odstranění ethanolu byly kolonky před elucí zahřáty v thermobloku přehřátém na 70 °C po dobu 3 minut.

Následně byly kolonky umístěny do 1,5ml mikrozkuhovek a DNA bylo eluována 30 μ l Bufferu NE.

2. Přečištění plazmidové DNA QIAprep Spin Miniprep Kit

Kitem QIAprep Spin Miniprep kitem byla přečištěna plazmidová DNA. Do 1,5ml mikrozkuhovek byl připraven aktivační pufr přidáním 200 μ l P1 pufru, 200 μ l P2 pufru a 350 μ l P3 pufru. Mikrozkuhavky byly umístěny na stolní centrifugu po dobu 10 minut při 15 600 g. Supernatant byl po centrifugaci automatickou pipetou přemístěn do nových 1,5ml mikrozkuhovek a bylo přidáno 20 μ l plazmidové DNA.

Kolonky v jímacích jamkách byly promyty 500 μ l Column preparation solution a byly umístěny na stolní centrifugu po dobu 60 s při 12 000 g, supernatant byl odlit. Na kolonky byl nanášen aktivační pufr s plazmidovou DNA a byly umístěny na stolní centrifugu po dobu 60 s při 12 000 g, supernatant byl odlit. Na kolonky bylo automatickou pipetou nanášeno 750 μ l Wash solution s přídavkem ethanolu, kterou byly vymyty proteiny a jiné nečistoty. Kolonky byly umístěny na stolní centrifugu po dobu 60 s při 12 000 g, supernatant byl odlit. Pro úplné odstranění ethanolu byly kolonky znovu centrifugovány po dobu 1 minuty při 15 600 g.

Kolonky byly umístěny do nové jímací jamky, bylo přidáno 50 μ l PCR vody a byly centrifugovány po dobu 1 minuty při 12 000 g. V kapalině v jímací jamce byla zachycena eluovaná DNA.

3. Izolace entry klonů kitem Sigma Aldrich

Do 2ml mikrozkušavek bylo napipetováno po 2 ml LB tekutého média s narostlými bakteriemi, mikrozkušavky byly stočeny při 12 000 g po dobu 1 minuty, tento krok byl zopakován s dalšími 2 ml LB tekutého média s narostlými bakteriemi za účelem většího výtěžku. Přebytný supernatant byl vylit a k peletu bylo napipetováno 200 µl Resuspension solution, obsah byl důsledně zvortexován, aby došlo k úplnému rozpuštění peletu. Bylo přidáno 200 µl Lysis solution, zkumavky byly okamžitě osmkrát jemně převráceny, dokud směs nenabyla průhledné viskózní podoby. Následně bylo přidáno 350 µl Neutralization/Binding solution, načež byla mikrozkušavka šestkrát jemně převrácena a zcentrifugována při 12 000 g po dobu 10 minut.

Do jímacích jamek byly vloženy kolonky, na které bylo napipetováno 500 µl Column preparation solution, kolonky byly centrifugovány při 12 000 g po dobu 1 minuty. Supernatant byl vylit. Na kolonky byl nanesen čistý lyzát a byly centrifugovány při 12 000 g po dobu 1 minuty, supernatant byl odlit. Na kolonky bylo nanесeno 750 µl Wash solution s přídavkem ethanolu a byly centrifugovány při 12 000 g po dobu 1 minuty, supernatant byl odlit. Kolonky byly znovu centrifugovány při 12 000 g po dobu 1 minuty pro odstranění zbytkového ethanolu. Následně byly kolonky přemístěny do nových jímacích jamek a eluovány přidáním 100 µl PCR vody a centrifugací při 12 000 g po dobu 1 minuty.

Příloha 3: Sekvence použité pro *in silico* analýzy:

>AJ575100.1 *Medicago sativa* mRNA for putative mitogen-activated protein kinase 1 (mekk1 gene)

CTTTTTAAATGGACTTATCACCTTTAAATGAATCACTTACCACGAATTTTCGGTTA
TAGAAACAAATCAACTACGGAAATGAACTCCAAGAAGAAGAAACAACCCAAGCT
ACAACGTCGTAATGCGGTGAAGAATTTCAACTACGATGCTCAACCGTCTTCGTCG
TCGCCGGAATCTTCCGAGTCGGCGTCGTCGTCGGCGTCGATTCTCTGTACTCGATC
GATGGATTTTCATGATCGGAAAAGCTTTAGAGTTGAAGGTGTTGACGGAGAATTT
GATATTATTTGTCGGAGTTTAGGGTTGAATGGACCGGAGGATTTCTCGATTCCGG
CGGCGGCTTGGGAGGCGATGAAGTTTCGGTCTTCTTCGGATGTTTTGCCGCGGTTG
AATGTTTCAGAATTTGATGAAACGAAGACGAGCGGTGAAATTGATCAAGTTGGA
GTAGTTGATTGTGATGATAGAGTTTGGTTAGAGATTCTCCGGCGGAGAGTAGTG
GTGGAGAAGTTAATGTTTCAATTAGAGATTCTCCGGCGAAGAGTAGTGGTTGCTG
CACCGGCGGTGAAATTAGGGTTCCGGTTAGGGGTTTTGATGAGACAAGTAATTGT
TCAACCGGCAGCGGTGGTATTAAGGAATTAGACCGCCGATGCTTAAGCCGCCGC
CAGGGGTTCCGGGTTTCTGTTGTGGATGACACGTGTTCCACTTGGGATATTCTGAGG
GATTTTGCTCCGGAAGGCGAAGGAAAAGAGAGAGAAGAACAAGAAGAAGAGGA
AGAGAAGGTAGATGAAGTAGAAGAAAAGAGGAAGTTGGTGAATTGGAATTGA
AGGTAGAAGAAGAGGAAAATGGTGACATTATTGGTGAGTTTTTCGAGGTCGTGTT
GTTCACTACTTCGCAAGAAGATGATTCATCTAGCACGACGACGGATACTAGGTCG
AATAGTATATCTCCTAATGTGAGATTGAAGCCTGTTATTACTCCTGGGAGTTGGCA
AAAGGGCGAGCTTTTGGGTCGTGGTTCATTTGGAAGTGTATATGAAGGAATTTCT
GAAGATGGATTCTTTTTTGTCTGTAAAACAAGTTTCACTGCTTGATCAAGGGAGTC
AGGGAAAGCAAAGTGTCGTTCAACTGGAGCACGAAATTGCACTTCTGAGTCAGTT
TGAACATGAGAATATTGTTTCGATACATTGGCACTGAAATGGATGAATCAAATCTA
TATATCTTTATCGAGTTTGTAAACCAAAGGTTCCCTTTTAAGCCTATAACCGGAGGTA
TAACTTCGAGATTCCCAAGTATCTGCTTATACGAGACAGATTCTGCATGGTTTGA
AGTATCTTCATGATCGCAATATTGTTACAGGGATATTAATGTGCAAATATATTG
GTTGATGCAAATGGGTCTGTCAAGGTTGCAGATTTTGGATTGGCAAAGGCAATTA
AACTGAATGATGTTAAATCATGCCAAGGAACAGCATTCTGGATGGCACCAGAGGT
TGTAAGAGGAAAAGTTAAAGGTTATGGACTTCCGGCTGATATATGGAGTCTAGGA
TGCCTGTGTTGGAGATGTTAACTGGGAAAATCCATACTCTCCTATGGAATGTA
TCAGCGCCATGTTTAGAATTGGAAAAGGTGAACTACCTCCAGTGCCTGATACTCT
TTCAAGAGATGCACGCGATTTTATTCTGCAGTGTCTTAAAGTTAATCCAGATGATC

GTCCCCTGCGGCTCAACTCTTAGACCACAAATTTGTCCAGAGGTCATTCTCCCAG
TCCTCTGGCTCAGCATCTCCACATATTCCGAGAAGAGGTTAAACTTGTCTTCTCCA
ACTATGGAACATAATTAAGG

>NM_116919.4 *Arabidopsis thaliana* MAPK/ERK kinase kinase 1 (MEKK1), mRNA

AAACAATGCTTCGTCTCCGATTATTCCACGAAACACCGCGTTTTTGTTTACATTTC
TTCTCTTTCTCTCTCTCTTCTCTCATATCTCTCTTTCGCCGTCAGGTTTTGCCCA
AATTTCTCGGTCTTCTTCACTCCCAGGAGTTTTTTTTCTCGGGAAAATTTCCAATT
CCAAGCTCCATTGAAGCCAAGTAAGAGGTGCGATTCTCTTCAATTTTGAAGTTGGA
ACTTGTAATAGCGTATGGATTTGAGCTGGTTATGGACAGAATTCTAGCTCGTAT
GAAGAAATCAACTGGACGAAGAGGAGGAGATAAGAATATTACTCCGGTACGGCG
GTTAGAGCGTCGCGATGCGGCGAGGAATATCAATTACGACGCAGCTTCATGTTCT
AGTTCGTCAGCTGAAGATCTTCCGTTTCGACTTCTTCGTTGATGACTCGCTCTTTG
GAGTTTCCGGAGCCTACTAGTTTCCGAATCGGTGGTGGTGGTGGAGAGATGGATC
GGATTTATCGGTCTCTTGGTGTCTTGGTCCTGATGATTTGGCTATTTCTTTTGATG
CTTGGGAAGCTTGTAAGAAACGTTCTTCTTTCAGATGTTGTTAATAGGTTAAGTCT
TTGATCTTGATAAGGTTTCGTGATCAGGATTTGAGTGAAGAAGGTCCTAGTGGTG
TTGTTGTTGGTTCTGATTCAATGAATCATAAGGTTTCAGGGTCAGGATTTGAGTGAA
GCAGGTCCTAGTGGTGGAAATTGTTACTGAGTTGAGTGAGATTGGGAATTTAATCA
CTCCTGTGGATAGGTTAGTAGCTGATGGTGTGGTAGAGAATAGGCGTGTTATGGA
AAGAACACCAACTATTGTGAAGTCGAAAGGGTATCTTGTACCAAATAATGTAGTG
GCTGTTGGTGTGGTGTGGTGGTGGTATTAAGGGGCTAAGACCACCAGTACTTA
AGCCTCCTCCGGCTATGAAACGACCCCCTATTGATCATCGGGGATCGTCTTGGGA
TTTCTGACGCATTTTCGCTCCAAGTGAAACAGTTAAGCGGCCGAGTTCCTCTTCTT
CTTCTTCCGAGGATGGATGCGATGAAGAGGAAGGCAAGGAAGAGGAAGCGGAAG
CGGAAGAGATGGGAGCTAGGTTTATCCAGTTGGGGGATACGGCTGACGAGACGT
GCTCATTCACTACAAATGAGGGTGACTCCTCAAGCACAGTATCCAATACTTCGCC
TATCTATCCAGATGGAGGAGCTATCATAACGTCTTGGCAAAGGGTCAACTTTTG
GGACGAGGATCATTGTTCTGTGTATGAAGGCATTTCTGGAGATGGGGACTTCT
TTGCTGTCAAGGAAGTTTCACTTCTTGATCAGGGAAGTCAGGCACAAGAATGCAT
ACAACAATTGAGGGGGAGATTAACTACTTAGTCAGCTTCAGCATCAGAATATT
GTGAGATATCGTGGCACAGCCAAGGATGGGTCAAACCTTGACATTTTTCTTGAGC
TTGTAACCCAAGGGTCCCTTCTAAACTCTACCAAAGATAACCAGCTTCGGGACTC
TGTAGTCTCCTTGTACACTAGACAGATTCTTGACGGTTTGAAATATCTCCACGATA
AAGGTTTTATTACAGGGACATCAAATGTGCAAATATATTGGTGGACGCTAATGG

CGCCGTCAAACCTTGCAGATTTTGGATTGGCAAAGGTTTCAAAGTTTAACGACATT
AAGTCCTGCAAGGGAAGTCCATTTTGGATGGCTCCAGAGGTTATTAACCGAAAGG
ATAGTGATGGCTATGGAAGTCCAGCTGATATATGGAGCCTCGGGTGCCTGTGCT
GGAAATGTGTACTGGTCAGATCCCCTACTCTGATCTCGAACCCGTTCAAGCCCTGT
TTAGGATCGGAAGGGGTACTCTTCCGGAAGTACCTGATACGTTATCACTAGATGC
TCGGCTTTTCATACTTAAGTGTCTTAAAGTGAACCCGGAAGAGCGGCCAACTGCA
GCTGAACTGCTGAACCATCCATTTGTGAGAAGACCCTTACCATCCGTGGGTTTCAG
GAGGCTCGGGATCAGCATCTCCCCTTCTCCGTAGATGAGGCTAATTTTAGTAAATT
TCCTCAATAGGCATAACCCGAAGATTTATGAGAGATTAGATCCCAGAGAACTAT
TGGGAGACACGAGACATGATTCTTCGACACACACACACGTGCGGTCGGGTTGCGC
AGCAAGAGCCAAACTTACTTAGTTTCTGTGTCATTCGTTGGTTATTTGTTGCAAGT
TATGTGTTGGGCTTGATTTTAAAAGTGAAGAGCCTTATTTTCTAGGAATTAGAAA
TGTCGACCTTGGGGTTTTTGGGTGTATAGGTTTTGTTTAGTTTTTTTTGTTAAATTA
TAGTGTATGTATGTCTGTATCTATATCATGTAATGTATAATTATAGTTGGTTCTTAT
AGTTCCTGGCTTGTGTAAGTGTGTACACACATCGATGGGTTTAAAGTTCTATTTGT
CTCATATTTTAAAGAAATCTGCTGCTCTAATCATCTATTA AAAAGTATAGTCAAGA
TATTTTCTATAATTCAGGTCAAAGCCACTTTAATTGAAGT

>CAE00640.1 putative mitogen-activated protein kinase 1 [*Medicago sativa*]

MNHLPRIFGYRNKSTTEMNSKKKKQPKLQRRNAVKNFNYDAQPSSSSPESSESASSA
SILCTRSMDFHDRKSFRVEGVDGEFDIICRSLGLNGPEDFSIPAAAWEAMKFRSSSDVL
PRLNVSEFDETKTSGEIDQVGVVDCDDRVLVRDSPAESSGGEVNVSIRDSPAKSSGCC
TGGEIRVPVRGFDETSNCSTGSGGIKIRPPMLKPPPGRVRSVVDDTCSTWDILRDFAP
EGEGKEREQEEEEKVVDEVEEKEEVGELELKVEEEEENGGIIGEFSSRSCSFTTSQEDDS
SSTTTDTRSNSISPNVRLKPVITPGSWQKGELLGRGSFGTVYEGISEDGFFFAVKQVSL
LDQGSQGKQSVVQLEHEIALLSQFEHENIVRYIGTEMDESPLYIFIEFVTKGSLLSLYR
RYKLRDSQVSAAYTRQILHGLKYLHDRNIVHRDIKCANILVDANGSVKVADDFGLAKAI
KLNDVKSCQGTAFWMAPEVVRGKVKGYGLPADIWSLGCTVLEMLTGKIPYSPMECI
SAMFRIGKGELPPVPTLSRDARDFILQCLKVNPDDRPTAAQLLDHKFVQRSFSQSSG
SASPHIPRRG

>OAO97072.1 MEKK1 [*Arabidopsis thaliana*]

MDRILARMKKSAGRRGGDKNITPVRRLERRDAARNINYDAASCSSSSAEDLSVSTSSL
MTRSLEFPEPTFRIGGGVEMDRIYRSLGVS GPDDLAI SFDAWEACKKRSSSDVVNR
FKSFDLKDVRDQDLSEEGPSGVVVGSDSMNHKVQGQDLSEAGPSGGIVTELSEIGNLI
TPVDRLVADGVVENRRVMERTPTIVKSKGYLVPNNVAVGVGVGGGIKGLRPPVLK

PPPAMKRPPIDHRGSSWDFLTHFAPSETVKRPSSSSSSSEDCDEEEGKEEEAEAEEMG
ARFIQLGDTADETCSFTTNEGDSSSTVSNTSPIYPDGGAIITSWQKGQLLGRGSFGSVY
EGISGDGDFFAVKEVSLLDQGSQAQECIQQLEREIALLSQLQHQNIVRYRGTAKDGSN
LYIFLELVTQGSLLKLYQRYQLRDSVVSLEYTRQILDGLKYLHDKGFIHRDIKCANILV
DANGAVKLADFGGLAKVSKFNDIKSCKGTPFWMAPEVINRKDSGDYGGSPADIWSLGC
TVLEMCTGQIPYSDLEPVQALFRIGRGTLPEVPDTLSLDARLFILKCLKVNPEERPTAA
ELLNHPFVRRPLPSVGSGGSGSASPLLRR

Příloha 4: Sekvence cDNA, promotoru a gDNA genu OMTK1 získané Sangerovým sekvenováním:

>*Medicago sativa* OMTK1 mRNA

ATGAATCACTTACCACGAATTTTCGGTTATAGAAACAAATCAACTACGGAAAT
GAACTCCAAGAAGAAGAAACAACCCAAGCTACAACGTCGTAATGCGGTGAAGAA
TTTCAACTACGATGCTCAACCGTCTTCGTCGTCGCCGGAATCTTCTGACTTGTCGT
CGTCGTCGGCGTCGATTCTCTGTACTCGATCGATGGATTTTCATGATCGGAAAAGC
TTTAGAGTTGAAGGTGTTGACGGAGAATTTGATATTATTTGTCGGAGTTTAGGGTT
GAATGGACCGGAGGATTTCTCGATTCCGGCGGGCGGCTTGGGAGGCGATGAAGTTT
CGGTCTTCTTCGGATGTTTTGCTGCGGTTGAATGTTTCGGAATTTGATGAAACGAA
GACGAGCGGTGAAATTGATCAAGTTGGAGTAGTTGATTGTGATGATAGAGTTTTG
GTTAGAGATTCTCCGGCGGAGAGTAGTGGTGGAGAAGTTAATGTTTCAATTAGAG
ATTCTCCGGCGGAGAGTAGTGGTGGAGAAGTTAATGTTTCAATTAGAGATTCTCC
GGCGAAGAGTAGTGGTTGCTGCACGGGCGGTGAAATTAGGGTTCCGGTTAGGGG
TTTTGATGAGACAAGTAATTGTTCAACCGGCAGCGGTGGTATTAAGGAATTAGA
CCGCCGATGCTTAAGCCGCCGCCAGGGGTTCCGGGTTTCTGTTGTGGATGACACGT
GTTCCACTTGGGATATTCTGAGGGATTTTGCTCCGGAAGGCGAAGGAAAAGAGAG
AGAAGAAGAAGAAGAGGAAGAGAAGGTAGATGAAGTAGAAGAAAAAGAGGAA
GTTGGTGAATTGGAATTGAAGGTAGAAGAAGAGGAAAATGGTGACATTATTGGT
GAGTTTTCGAGATCGTGTTTCGTTCACTACTTCACAAGAAGATGATTCATCTAGCAC
GACGACGGATACTAGGTCGAATAGTATATCTCCTAATGTGAGATTGAAGCCTTTT
ATTACTCCCGGAGTTGGCAAAGGGGCGAGCTTTTGGGTTCGTGGTTTCGTTTGGAA
CTGTATATGAAGGAATTTCTGAAGATGGATTCTTTTTTTGCTGTAAAACAAGTTTCA
CTGCTTGATCAAGGGAGTCAGGGAAAGCAAAGTGTCGTTCAACTGGAGCACGAA
ATTGCACTTCTGAGTCAGTTTGAACATGAGAATATTGTTTCGATACATTGGCACTGA
AATGGATGAATCAAATCTATATATCTTTATCGAGTTTGTAAACCAAAGGTTCCCTTT
TAAGCCTATACCGGAGGTATAAACTTCGAGATTCCCAAGTATCTGCTTATACGAG
ACAGATTCTGCATGGTTTGAAGTATCTTCATGATCGAAATATTGTTACAGGGAT
ATTAAATGTGCCAATATATTGGTTGATGCAAATGGGTCTGTCAAGGTTGCAGATT
TTGGATTGGCAAAGGCAATTAAACTGAATGATGTTAAATCATGCCAAGGAACAGC
ATTCTGGATGGCACCAGAGGTTGTAAGAGGAAAAGTTAAAGGTTATGGACTTCCG
GCTGATATATGGAGTCTTGGATGCACTGTGTTGGAGATGTTAACTGGGAAAATTC
CGTACTCTCCTATGGAATGTATCAGCGCAATGTTTAGAATTGGAAAAGGTGAACT
ACCTCCAGTGCCCGATACTCTTTCAAGAGATGCACGCGATTTTATTCTGCAGTGTC

TTAAAGTTAATCCAGATGATCGTCCCCTGCGGCTCAACTCTTAGACCACAAATTT
GTCCAGAGGTTATTCTCCCAGTCTCTGGCTCAGCGTCTCCACATATTCGAGAAG
AGGTTAA

>*Medicago sativa* promotor genu *OMTK1*

CCGGCTACAAGATTCCTCTAAAAACACACGATCCCCAACTTGAACTCAAT
ATCCTTTCTCATCTTATCATGATATCTTTCTGCCTACTCTGAGACGCTTTCATCTT
TTCCTGAATCATTTCACCTTCTCTGTAGTCTCTTGCACAAATTCCAGTCCTAACA
AAGCACTTTCTCCTAACCCATACCAACACAACAATGTTCTAAATCTCCTTCTATAC
AAAGCACTTTTTGTGTTCTACACCTCTAAGAACGAACCTGGTATTCATATTTAGCG
TCCGATTGCCACACATGTATGACAATTATTGTTAATATTTGTTAAAAAAGTTGTTT
ATGAATTTTCAATTGATAAGACAATATAATATCATAAGACTTTTAATCTTGAGGTG
ATTTTCTTCAATGAATAATTCTAGCCAACAAAATCCACCATTCACTACCAATCACA
ACCTACTAATCATGTAATGCAAAAAACACCAGCGCACCGAGTCACATGCCTTTTC
AAAATCCACCTTAAAGATCATAACATTGGCTAGATAAATTACTTCATTCACCACAA
CACTCCATAAACCAGGCGCCTCCCGTTGATAAAAGGCGACAAATTGGCTGAAAT
GATTTTCTTCGCAACTTCCGCCAACCTTCCAACCTTACACCTTTGCTAACAACTTCT
AAAGAGAACCTAGACGAGAGATCAGACGGAACCTCATCGAGATGGAGAGAGGAA
TCTACTTTTGGAATTGAGGTAACAAAATAGGACGCAAAGTTATGAGTGAGACTAA
CATGAGTGAAAAATTGATCACAAGTTTAATTTTCTCGTTTCAATTTTAATGGATT
AGTTTGACTTATTAATAATTTCTATCAACCTATTTTGATATAAAAAATTTCAATTTA
AAAAATAAGTTGACACATTGTTTTTTGACTAAAGTCTAATAAGTTGTGACATTTTT
TTTAGAGGAAATAAGTTGAGACATTTTTTTTTTTTTTTGAGTTTAATTGAAATGCTC
TGATAGTGTAAGTTCACTTTACACAGTCATCCAATAGAATTCCGACACATCCAT
CATACCCTCTCTCAAATATGTTAATTGAATTGAATTAGTTAATTCTGAAAACCAC
CTTTCTCACTTCTCAGTTCTCTTGCTCGCTTGTTCTCTCTGTTGTAGCATTTC
ATCTCTTCAATTGCAGTCTCTATGATCGTTCTCGGCGCTTGACGGAAAATGACACT
GTTTTAAAGCACCGTAGGTAATTGAGGAACAGAAGGCCAAGTAGTTGAAGGAGC
GGTTGATTGCTTGAAACAGATAAAATAAGATGGTGGTTGATATTGACGTCATTGG
AACAAAGTATAGTAGAAGACCCACCGTTTTCTTTCCACACATCATACTTTGAAATT
GATATCCCCGATATCTAATACAAGCATGTTGATGCTCGTCATGTAACAATAAC
AAGTACCTCAATAATATCAACCAATTCCAAAGTCTCACATCTCTCTGTGAAGGAC
GCCATGATTGTAGTGCGTTGTCGGTTGTCATGAAATTCTGGTAGAGGATGGTTTGC
ATTTTCGCACGACATGCACAATTACTTGTTTCTAGAATTAATTTAAATTCAATTTAA
GAGATATGACGTGACTGAGTTTTATTGGATGACCGTGTAAGTGAACCTTACACT

GTCAGAGCACTACAATTAACCTTTTTTTTTTTTTTTTTGAAAGATGATTTAGCCTACA
AAATATATTTATGCGCGTGGACATAGAAAAATGTAAGAAGGAAAAAGTACAAAG
CTCCACATAAGCAGTCAACGTGGTACCGCGTTTTTTGTATCCTTTCCTTTCCTCCTT
TCTTTGATAAGATTTTTATCTCTCCTTTAAACAAAATCGTTTACCATCTCCAACCTTA
GTCTGACTTCCATTTTTAATTTCCCAGTCTCTTAAACCATTTCTAAAAGCGCTTATT
TTCAAAGCGCGGTAGCAGCCAGCGCTTTTTAAATGGACTTATCACCTTTAA

>*Medicago sativa* gDNA genu *OMTK1*

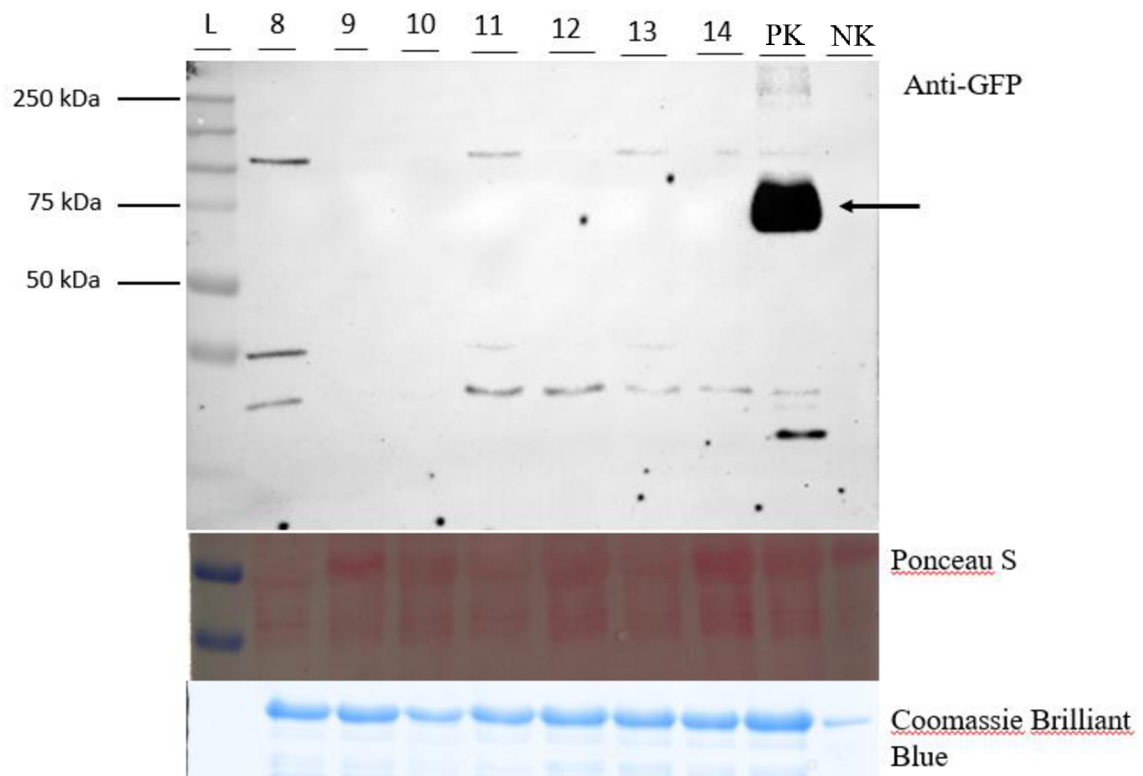
ATGAAATCACTTACCACGAATTTTCGGTTATAGAAACAAATCAACTACGGAAATGA
ACTCCAAGAAGAAGAAACAACCCAAGCTACAACGTCGTAATGCGGTGAAGAATT
TCAACTACGATGCTCAACCGTCTTCGTCTGTCGCCGGAATCTTCTGACTTGTCGTCTG
TCGTCCGGCGTCGATTCTCTGTACTCGATCGATGGATTTTCATGATCGGAAAAGCTT
TAGAGTTGAAGGTGTTGACGGAGAATTTGATATTATTTGTCGGAGTTTAGGGTTG
AATGGACCGGAGGATTTCTCGATTCCGGCGGGCGGCTTGGGAGGGCGATGAAGTTTC
GGTCTTCTTCGGATGTTTTGCTGCGGTTGAATGTTTCGGAATTTGATGAAACGAAG
ACGAGCGGTGAAATTGATCAAGTTGGAGTAGTTGATTGTGATGATAGAGTTTTGG
TTAGAGATTCTCCGGCGGAGAGTAGTGGTGGAGAAGTTAATGTTTCAATTAGAGA
TTCTCCGGCGGAGAGTAGTGGTGGAGAAGTTAATGTTTCAATTAGAGATTCTCCG
GCGAAGAGTAGTGGTTGCTGCACGGGCGGTGAAATTAGGGTTCCGGTTAGGGGTT
TTGATGAGACAAGTAATTGTTCAACCGGCAGCGGTGGTATTAAGGAATTAGACC
GCCGATGCTTAAGCCGCCGCCAGGGGTTCCGGGTTTCTGTTGTGGATGACACGTGT
TCCACTTGGGATATTCTGAGGGATTTTGCTCCGGAAGGCGAAGGAAAAGAGAGA
GAAGAAGAAGAAGAGGAAGAGAAGGTAGATGAAGTAGAAGAAAAAGAGGAAGT
TGGTGAATTGGAATTGAAGGTAGAAGAAGAGGAAAATGGTGACATTATTGGTGA
GTTTTCGAGATCGTGTTTCGTTCACTACTTCACAAGAAGATGATTCATCTAGCACGA
CGACGGATACTAGGTCTGAATAGTATATCTCCTAATGTGAGATTGAAGCCTTTTATT
ACTCCCGGGAGTTGGCAAAGGGCGAGCTTTTGGGTCGTGGTTCGTTTGGAACTG
TATATGAAGGAATTTCTGAGTAAGTGCTGTTTCTATTGATAGCCTGTTAATTGAAT
TTGAGTCTTGATAACGAGTGCATCGGGAGCACAATTTTAAGCATTCTAAATTAAG
TAATTACATAGACTTTCTTAAAACTTACCTTTTAAAATCCTTAAAAAATCCCCGG
GGCACTCGTTAGCATTTCCTTAAATTTTGTAGTTTGGTAGTATATGTGTTACTA
TGTATGGGGAAGTAGTTAATGAAGGTTGGAAAGATTAGTTTGGAAATGACGGTGA
GTTTGATAAATTACGGCGACAATGCCAGTGGTACTTGGTTTATATTAATTATTA
AATTCAAAGTGTTAGCCAGGAGATAGGGGAACATTTTGTATTGCTAAACTCACCGCC
AATACAAACATTTGAAGATAAAATAAAAGGGGTCTGCATTAGGTAGAGTGTTTAG

CGGAGTGAAATTGAGGGAGAGAATGATTTAAACTTTTATTGCTCAGTTATCTTTTT
GGAAAAGAAGGGGAGGAAAATCTTGAATCAATTTTGGCTCTCTACGATATTTTAG
GTGCTTATAAAAATTTATACATTAGTGATTTACTAAACTGTTTTTCTAATAAAAATC
TTTCTACTTTTTATTTACTTGGCCATTGCTCCAAGTTAGGGAACCTATTAAGTCTTG
CCAAGTAGAAAATTGCTCTTGGCTGCCACGTAATGTCAATGTATTTCGTATCCTTTC
CTATTAATTAGTGCAAATATTTTACCGAACATGAGCAAAAGAGCTCTAGAACCC
TTTTGTGTTTTTGGTCAATTGCTGAAAAATAGTTTGATGTTGGCACCCCTTTGTTGC
ATCTGTCAGAATGATTCCTTTTTTTTTTCTCTTCTAGGCTGTCCATTTTGGCGCTA
TATGAAAACACGGTTTTGAAATGCCTTACCTTGCTTTTTTTTTCTTCTTTTTTCTCT
TGGGAAAATATTCTAGATTATTTTTAACCTTTGATAGCTTTTTTAAAGTCTGGGTTT
TCCTCTATTATTAAGCCTCTTCATTTGGGTTTCTATAAACTGATAGTTTTTCCCTCT
GTGGCAAGAGTATAAAAATACATAGTCTCGCCACAGAGGCACAACTGTCAATTT
ACAGGAAGAGAAAAAATACATTTATTCTGTGCCGCAAGACTGCTAAAATTTGTT
TCTCAAATGCCACTACGTATTTGTTCTGTTGCTCGTCATATTTGGAAAATTAATGT
GAATTATTAGCATTATACAAGTAATCTTGTTTTTCTCATAATTTATTGGTGAAATT
AAGTTGTTCTTGGTGAAATTATCGTCCAATATTCAGCATGCTTCATCTTTTGGGTT
TGTTTCACTTTGCTACTATGCTCATGAACAAAGCCCTAAATAAATAAATAGCCAT
TTACAAAATTTGATGTTTATAAATGTTAGATAAGTTGCTAACTATCGTTTTTTATTC
CCTTTCTGTTTACCATTGTAGAGATGGATTCTTTTTTGGCTGTAAAACAAGTTTCACT
GCTTGATCAAGGGAGTCAGGGAAAGCAAAGTGTCGTTCAACTGGAGCACGTAAG
ACTTGCTTTCTCTTTCTATTGCTTCATAATTATTGTACACTTCAATTTTCCATTAAT
CGAAATCCTTTTATAACGATAAATGTTTTCTTATAAATACTTCACTGTCTTGTGCA
ATATCTTTTCATCCATTTATGTTCTCATTATTTTTTCATCTATTTCTTTTCTCACTTT
ACTTCTACCTCCTCTCAGGAAATTGCACTTCTGAGTCAGTTTGAACATGAGAATAT
TGTTTCGATACATTGGCACTGAAATGGTACTTTTCTTGTTATCTCTTGTCTTCTCCTT
TTCCTTTTATGTTCAATTTTCATTTGAGCCCATGCTGAAAAATCGGTTACATATATTG
CTATTCATGTGCTTTCATTGAACAACCTTTGGCTTTACAGAGTTGTTGGTTCGTGAC
ATCTTCAATTTTTTTGCCCCTATTCTTTTAGATAAAATATAAAAATTTATATTGGTG
GGGCCTATGCATCTCTCATGGCCTAATGGTTAATCTTTTGTGGTAGTTGTTTGT
ACAGATTGACAGCTTCCATTGACTCGAAAGAGATTGAAGGATAGTTTTCTAACTA
GTATTCACTAAACATGATACTTGATTGATTTTACACTATAACAGACAAGTCTATTTA
CAATCCTAATAAATGCTAGCCTAGAATTACTGGGAATGTATCTGTTCTAAATGAC
AGACATGAAGAAAACATTAATCTATGCCAAATAATATCAAATAATAAAGGAAAA
TAATCAAGAGGTAATTGTGCAGCACACACATTTCAAATTTATGTAATAATGTAAT

ATGTCCTTTTTTCATCTGAAATATTTTTACTCAATGCTTTCAATGTATTGGAGAAGTT
GTAGCCAAAACACTGTATATTGTGTAGTTTGAGGTATTGCTAACTTCACCTTTTCTTG
TCACACTACGAAGCTAGGAACTGGTTTTGAATATAACTTTTAGCATATAAAGTAG
AACTCATGTTATATTTTCAGGTTGCATGTTAAGACAATTGGATGGATACCATACAA
TTCCTTCAATTATTTTTCTTTAGTTACGCTGCAGTATTTTGTGAGCTATAAACAAGAT
TATCTTCTAACAGCCATTTATTGTTGTTGTCAGCTTGTGATTGCATCCTATAATTAC
TATCTTAACTGTAGTTCATTATTTACATTCTGCTTGTTTATTGCAGGATGAATCAA
ATCTATATATCTTTATCGAGTTTGTAAACCAAAGGTTCCCTTTTAAGCCTATACCGG
AGGTATAAACTTCGAGATTCCCAAGTATCTGCTTATACGAGACAGATTCTGCATG
GTTTGAAGTATCTTCATGATCGAAATATTGTTACAGGTGATCCCTAAATTTATTT
ATTTATTTATTTTGCTATCCTTTGAGGTATAAAAAAGAGATGAATCCTTGTATTCT
GGCATGCCTATGTTCTTGCTTTCATTGCATGAAAGAACTTCTACTTGCTGTCACA
TAATTGCAATATAAATATTGTTTTAAAATGACTTAGTAATAGTACTGTTTCTTTTC
CTTCTTGTTAATTGGTTATTTAGAACATCTTCATTTTCATAGTTTGGGATGTGTTTT
ACATATTCCTGAGGACCGTGAATGGTCCATATATCGGGCAATATAGGAAAGGGG
ATTGGAAAAGAGAAAATTATTATTGGGATAAAAGGATTTATCATCCAATTATTGT
CCTTCCTGTTCTCTTTGGATTTATCATCCAATTATATATAACCTTTGATAATGGCTT
GTTGTGACAGGGCCTAGAAGAATAAATGAGTACGGGGTTAGATTAGAGTGAGTT
ATACAGTTGGATATCTGTCTTGTTTGTAGTTGAAATCTATCATGGGGATGGGT
AGTTAGGCAGAAAGGTTTTAAAATAAAAGGACTTTGAGAGATGAGAAGCATTAG
TAATTTCAATGTGTGAACTGTGCAAAGGCTCTGATGTAGGGGGGAATCCTTGGTG
ATTGTTTCTATCAATTTACATTTCTCTCCCTGGGATCCTAAACAACCTTGTGTTTT
CGCGGCATTTGATACCTTGTGGATGTGAATTTTCACAGAAAAGAGATGTCCTTCT
CATTGATATCAGACTAAGTTGAGGTTAAAGATGTTGAATTTGAATATTTTCCGAA
ACCATAAGCAGATATGATATTTAGATTTTAGCCTTAGAAACAACCTTAGTATATAA
GCTTTAGATGTAGAGCATAAGAATCATTTCAACTTGTTCTTGGAACCTGAAACTAT
AGAAACAGCTATGTCACATAAGGGTTTCAGTGTGAGAAATTCTAATTGGTACAAT
TTTGTCTTTTTTGGTTTATGGTGTGATAGTTTCTTTAGCATATTTGTTTTCTGTATT
TCTGTAACAGTTATGTAGTGCTACGAAGTAATATTTGTGAATATGACCTAACTATT
TTCCCTCGTAATTAAGGGATATTAATGTGCCAATATATTGGTTGATGCAAATG
GGTCTGTCAAGGTTGCAGATTTTGGATTGGCAAAGGTGACCTTTCTACTCTACTTC
AGTTTCTATCTAACTTTAACTTCAGTCGCGGAATCTGTACTTCCTTCAGTTGCATA
AAATATAATTTCCATTTACTAATTTTACTTTGTGGCTGTTGTTTTTTCAGGCAATTA
ACTGAATGATGTTAAATCATGCCAAGGAACAGCATTCTGGATGGCACCAGAGGTT

TGTTTTCAATCTTTGAAAGAGAATTATTGAATAAATGATGGTTCAACATATTCAAT
AAGTGGTTGGATCTACATTGTTTGTAACTTCTTAATAATGGTCTTCTTCTTTTGCCT
GCTGAATGAAATTAATTTTCATAAAGATACAGTTAGATTTAACGTTCTACTGGTT
CAAATGCTTGCTTTGATTGTCTCTGAAGTTATTGGGACTAGGTTGATATAGTTATA
CAATTACAACGACTAAATTGTGTATTTCCCTATATAATGACAAGAAGTGTTTTGGCT
TTAATGGGTTTCATATTTTGGATCGGCCTAATAGTTACACCTCTATCTTTTTTCATATG
TCCCATTTATTCATCATATATCTTTAAGTAATCCAGAGGGGAAGAGGGCCCTATA
ATCCAGAGTTCGGCCGGGAGGTAAGTAATGCCTAGCCAAGAATTGTTTCACCCAG
GATCACAATCGGGTTCTCCCGAACTATTCGTTCTCAGGGAGAGCTCGTTAACCAC
TTGAGACCAATCACTTGGTTAAAAAGGCTTCAGAGGGAGTCAATCCCTCAACCAA
TAAGCAGCCAAATCTATGTTTTACCAGTGTCAGCATGCAACAAATGATTAATGAT
AATGGTGTGTACATATTTGTTGGATTACAAACCTTGAACCTTGCTGGACTTCGTC
GCCTCCTTAGCGATCCCCTCCCCTTAGATACACACCTACAAAAAAGATGTTTCAT
TTTACGATTCTTATTAGGTTAAGTAGTGATTCTGAAGCTTTGCTGTTGTAATTAAT
GTGCAGGTTGTAAGAGGAAAAGTTAAAGGTTATGGACTTCCGGCTGATATATGGA
GTCTTGGATGCACTGTGTTGGAGATGTTAACTGGGAAAATTCCGTA CTCTCCTATG
GAATGTGTATGTAGCATATTACCATTTCAATCCA ACTGTTTCTTCTTTTTACCACG
CTATTAACATGAGATTAACTTAAGTGCCTTTTTGAAGTGTTACGTGGCTATGATT
TGATCCCTATCTCTCGATATAAAAATTTATATGAAACATTGCATTACTGCTAGTTTT
GATTTCCAAGCTTTGTTGAATCTCTTATGACAACAGTTGCGCTGATTGTTTAGAAT
TGAAAAGGTGAACTACCTCCAGTGCCCGATACTCTTCAAGAGATGCACGCGAT
TTTATTCTGCAGTGTCTTAAAGTTAATCCAGATGATCGTCCC ACTGCGGCTCAACT
CTTAGACCACAAATTTGTCCAGAGGTTATTCTCCCAGTCCTCTGGCTCAGCGTCTC
CACATATTCCGAGAAGAGGT **TAA**

Příloha 5: Western blot analýza:



Imunodetekce fúzního proteinu OMTK1-YFP v tranzientně transformovaných listech *N. benthamiana*. Pro imunodetekci proteinů byla použita primární protilátka anti-GFP; L-proteinový standard (Precision Plus Protein Dual Colour Standards); vzorky jsou označeny čísly 8-14; PK-fúzní protein MMK3-YFP; NK-negativní kontrola. PVDF membrána byla obarvena roztokem Ponceau S pro kontrolu přenosu proteinů, roztok Coomassie Brilliant Blue byl použit pro vizualizaci proteinů, které nebyly přeneseny z gelu. Šipka značí zachycený signál.