

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2023

Zuzana Turnová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Úlohy PRKK a SIMKK proteinů při regulaci
SIMK v tolici vojtěšce**

Bakalářská práce

Zuzana Turnová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2023

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

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Zuzana TURNOVÁ
Osobní číslo: R20730
Studijní program: B1501 Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Téma práce: Úlohy PRKK a SIMKK proteinů při regulaci SIMK v tolici vojtěšce
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 provedení pokročilých *in silico* analýz zaměřených na proteiny PRKK, SIMKK a SIMK v tolici vojtěšce (*Medicago sativa* L.). Dále se bakalářská práce bude zabývat experimenty zaměřenými na jejich vývinové úlohy při buněčné signalizaci.

V rámci teoretické části bude vypracována rešerše zaměřená na problematiku:

1. Přehled publikací o mitogen aktivovaných protein kinasach v *M. sativa* a jejich ortologích v *M. truncatula*, *A. thaliana* a také jiných rostlinných druzích, podle dostupné literatury.
2. Přehled signálních drah MAPK se zaměřením na PRKK, SIMKK a SIMK 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. Pokročilé *in silico* analýzy – predikce struktury, funkce, interakce, transkripční regulace (a jiné) proteinů AtMKK1 a AtMKKS v *A. thaliana* (ortology SIMK a PRKK v *M. sativa*). Pokračování ve výsledcích (metodologicky podle vzoru) bakalářské práce Malíšková (2021) – následné analýzy v souladu s konzultacemi se školitelem.
2. Transientní (ko-)transformace listů *Nicotiana benthamiana* s fluorescenčně značenými MAPK- mikroskopické studie (life cell imaging).
3. Rozmnožení transgenní linie *M. sativa* metodou somatické embryogeneze (příprava somatických klonů).
4. Porovnávání fenotypu transgenních rostlin oproti divokému typu – zpracováním mikroskopických obrázků pomocí programu ZEN lite, dále využitím programu ImageJ pro samotné měření a následné vyhodnocení výsledků pomocí t-testu nebo ANOVA testu.

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 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. Malíšková 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, Směkalová 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. Směkalová V, Doskočilová A, Komis G, Šamaj J (2014) Crosstalk between secondary messengers, hormones and MAPK modules during abiotic stress signalling in plants. *Biotechnology Advances* 32, 2–11.
12. Suarez-Rodriguez MC, Petersen M, Mundy J (2010) Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling in Plants. *Annual Review of Plant Biology* 61, 621–49.
13. 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.
14. 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.
15. 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: **8. března 2022**
Termín odevzdání bakalářské práce: **31. července 2023**

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 18. dubna 2023

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora: Zuzana Turnová

Název práce: Úlohy PRKK a SIMKK proteinů při regulaci SIMK v tolici vojtěšce

Typ práce: bakalářská

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

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

Rok obhajoby práce: 2023

SOUHRN

Tato bakalářské práci se blíže zabývá problematikou mitogen aktivovaných protein kinas (MAPK) v tolici vojtěšce (*Medicago sativa* L.), přičemž se konkrétně specializuje na tři vybrané kinasy, tedy patogen responzivní MAP kinasu kinasu PRKK a solným stresem indukovanou MAP kinasu kinasu SIMKK. Tyto dvě kinasy mohou působit za odlišných podmínek v rozdílných signalizačních dráhách jako upstream regulátory pro aktivaci SIMK reprezentující solným stresem indukovanou protein kinasu. Tyto interakce byly studovány pomocí metody koexprese, a to na subcelulární úrovni prostřednictvím mikroskopie transientně transformovaných rostlin *Nicotiana benthamiana* s fluorescenčně značenými MAP kinasami a dále také fenotypicky. Hladiny výše uvedených kinas rovněž ovlivňují fenotyp rostlin. Z tohoto důvodu byl u transgenních rostlin se sníženou expresí genů *SIMK* a *SIMKK* u linie *SIMKKi* a u rostlin linie GFP-*SIMK* charakterizované nadměrnou expresí *SIMK* značené za využití zeleného fluorescenčního proteinu studován fenotyp se zaměřením na zjištění velikosti ploch průtoku xylémových buněk, pro což byla vyvinuta a optimalizována metoda automatického měření softwarem za použití programu ImageJ. Nedílnou součástí bylo rozmnožení rostlin somatickou embryogenezí, přičemž je tato metoda důležitým krokem při produkci a propagaci rostlin regenerovaných somatickou embryogenezí po stabilní transformaci. V neposlední řadě bylo využito *in silico* analýz pro bližší studium MAP kinas kinas u huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* L.) *AtMKK5* a *AtMKK1*, které jsou blízkými ortology vojtěškových MAP kinas kinas *SIMKK* a *PRKK*, díky čemuž můžeme usuzovat obdobné vlastnosti a úlohy při zapojení těchto kinas ve vývoji a regulaci fyziologických pochodů v rostlinách.

Klíčová slova: *Medicago sativa*, SIMK, SIMKK, PRKK, transientní transformace

Počet stran: 73

Počet příloh: 1

Jazyk: český

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Zuzana Turnová

Title: The roles of PRKK and SIMKK proteins in the regulation of SIMK in alfalfa

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: 2023

SUMMARY

This bachelor thesis solves more specifically the subject of mitogen activated protein kinases (MAPK) in Alfalfa (*Medicago sativa* L.), mainly it is specialized in three selected kinases, pathogen responsive MAP kinase kinase PRKK and salt stress induced MAP kinase kinase SIMKK. These two kinases may act under different conditions in different signaling pathways as upstream regulators for the activation of SIMK, which represents a salt stress-induced protein kinase. These interactions were studied by using coexpression at the subcellular level via microscopy of transiently transformed *Nicotiana benthamiana* plants with fluorescently labeled MAP kinases and also phenotypically. Levels of these kinases also affect plant phenotype. This was the reason to study the phenotype in transgenic plants with reduced expression of *SIMK* and *SIMKK* genes in the SIMKKi line and in plants of the GFP-SIMK line characterized by overexpression of *SIMK* labeled by green fluorescent protein. Phenotypical analyses were focused on determining the size of xylem cell flow area, for which it was developed and optimized automatic software-based measurement method by using ImageJ. An integral part was the reproduction of plants by somatic embryogenesis, whereas this method is an important step in the production and propagation of plants regenerated by somatic embryogenesis after stable transformation. Last but not least, *in silico* analyzes were used for a closer study of MAP kinases kinases AtMKK5 and AtMKK1 in *Arabidopsis thaliana*, which are close orthologs of alfalfa MAP kinases SIMKK and PRKK, respectively. Close orthology is reason, why we can infer similar properties and roles in the involvement of these kinases in development and regulation of physiological processes in the plants.

Keywords: *Medicago sativa*, SIMK, SIMKK, PRKK, transient transformation

Number of pages: 73

Number of appendices: 1

Language: czech

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

V Olomouci dne

.....

Zuzana Turnová

Poděkování:

Ráda bych poděkovala panu Mgr. Ivanu Luptovčíakovi, Ph.D. za jeho odborný dohled, rady při práci v laboratoři a vynaložený čas při vedení této bakalářské práce.

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	Tolice <i>Medicago truncatula</i> Gaertn.	3
3.3	Huseníček rolní (<i>Arabidopsis thaliana</i> L.).....	4
3.4	Mitogen aktivované protein kinasy a fosfatasy, jejich nomenklatura a fylogeneze .	6
3.5	Vybrané MAP kinasy v tolici vojtěšce.....	10
3.5.1	MMK3.....	10
3.5.2	SAMK.....	10
3.5.3	SIMK a její nadřazené kinasy SIMKK a PRKK.....	11
3.6	Vybrané MAP kinasy v huseníčku rolním	13
3.6.1	AtMPK3 a AtMPK6	13
3.6.2	AtMPK4 a AtMPK11	14
3.7	Úlohy MAPK při vývinu.....	15
3.8	MAP kinasy při odpovědi na biotický stres	16
3.9	MAP kinasy při odpovědi na abiotický stres	19
3.9.1	MAP kinasy v odpovědi na osmotický stres.....	20
3.9.2	MAP kinasy v odpovědi na teplotní stres	20
3.9.3	MAP kinasy v odpovědi na stres způsobený těžkými kovy	21
3.10	MAP kinasy v tolici <i>Medicago truncatula</i>	21
3.11	MAP kinasy v rýži seté (<i>Oriza sativa</i> L.).....	22
4	MATERIÁL A METODY.....	24
4.1	Biologický materiál	24
4.2	Použité chemikálie, soupravy a roztoky.....	25
4.3	Seznam použitých přístrojů a zařízení	27
4.4	Seznam použitých serverů a databází.....	27
4.5	Seznam použitých programů.....	27
4.6	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy	28
4.6.1	<i>In silico</i> analýzy	28
4.6.2	Rozmnožení transgenní linie <i>M. sativa</i> metodou somatické embryogeneze ...	28
4.6.3	Fenotypové analýzy	29

4.6.4	Transientní (ko-)transformace listů <i>Nicotiana benthamiana</i> s fluorescenčně značenými MAPK	31
4.6.5	Sledování fenotypu transientně transformovaných rostlin <i>Nicotiana benthamiana</i>	32
5	VÝSLEDKY	33
5.1	<i>In silico</i> analýzy AtMKK5 a AtMKK1	33
5.1.1	<i>In silico</i> analýza AtMKK5	33
5.1.2	<i>In silico</i> analýza AtMKK1	40
5.2	Rozmnožení transgenní linie <i>M. sativa</i> metodou somatické embryogeneze	47
5.3	Fenotypové analýzy xylémových buněk stonku	49
5.4	Transientní (ko-)transformace listů <i>Nicotiana benthamiana</i> s fluorescenčně značenými MAPK	52
5.5	Sledování fenotypu transientně transformovaných rostlin <i>Nicotiana benthamiana</i>	54
6	DISKUSE	56
7	ZÁVĚR	59
8	LITERATURA	60
8.1	Odborná literatura	60
8.2	Hypertextové odkazy	72
9	PŘÍLOHY	73

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

ABA	(z angl. abscisic acid, kyselina abscisová)
BWMK1	(z angl. blast-and wound-induced MAP kinase 1, poraněním indukovaná MAP kinasa 1)
CD místo	(z angl. common docking site, obecné dokovací místo)
ERECTA	(ER, z angl. receptor-like protein kinase, receptoru podobná protein kinasa)
ETI	(z angl. effector triggered immunity, imunita spuštěná efektoem)
x DAT	(z angl. x days after transformation, x dní po transformaci)
FLS2	(z angl. receptor kinase flagellin-sensitive 2, receptorová kinasa citlivá na flagellin 2)
GFP	(z angl. green fluorescent protein, zelený fluorescenční protein)
HAMK	(z angl. heat activated MAP kinase, teplem aktivovaná MAP kinasa)
IBF	(z angl. intermediate binding factors, IBF, přechodné můstkové struktury)
KAN	(kanamycin)
MAMPs	(z angl. microbe-associated molecular patterns, molekulární vzory asociované s mikroby)
MAPK	(z angl. mitogen activated protein kinase, mitogen aktivovaná protein kinasa)
MAPKK	(z angl. mitogen activated protein kinase kinase, mitogen aktivovaná protein kinasa kinasa)
MAPKKK	(z angl. mitogen activated protein kinase kinase kinase, mitogen aktivovaná protein kinasa kinasa kinasa)
MMK2	(z angl. <i>Medicago</i> MAP kinasa 2, MAP kinasa 2 u vojtěšky seté)
MMK3	(z angl. <i>Medicago</i> MAP kinasa 3, MAP kinasa 3 u vojtěšky seté)
OMTK1	(z angl. oxidative stress-activated MAP triple-kinase, oxidativním stresem aktivovaná trojitá MAP kinasa)
PRKK	(z angl. pathogen-responsive MAPKK, patogen rezpozivní MAP kinasa kinasa)
PRR	(z angl. pattern recognition receptor, receptor pro rozpoznání vzoru)
PTI	(z angl. pattern triggered immunity, imunita spuštěná vzorem)
RIF	(rifampicin)
ROS	(z angl. reactive oxygen species, rekativní formy kyslíku)
RSY linie	(Regen SY linie <i>Medicago sativa</i>)
SAMK	(z angl. stress activated MAP kinase, stresem aktivovaná MAP kinasa)

SIMK	(z angl. salt stress-induced MAP kinase, solným stresem indukovaná MAP kinasa)
SIMKK	(z angl. salt stress-induced MAP kinase kinase, solným stresem indukovaná MAP kinasa kinasa)
SIPK	(z angl. salicylic acid-induced protein kinasa, kyselinou salicylovou indukovaná protein kinasa)
SPE	spektinomycin
WIPK	(z angl. wound inducible protein kinase, poraněním indukovatelná protein kinasa)
WRKY	(transkripční faktor obsahující vysoce konzervovanou sekvenci aminokyselin tryptofan W, arginin R, lysin K, tyrosin Y)
Y2H	(z angl. yeast two-hybrid system, kvasinkový dvouhybridní test)

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Vegetativní a generativní orgány <i>M. sativa</i> a <i>M. truncatula</i>	4
Obrázek 2: Vegetativní a generativní orgány <i>A. thaliana</i>	5
Obrázek 3: Obecný model signalizační kaskády MAPKs	7
Obrázek 4: Signalizační dráhy MAPKK a MAPK u <i>M. sativa</i> při stresových dějích.	13
Obrázek 5: Zapojení MAPKs v signalizačních dráhách regulujících rostlinnou imunitu u <i>A. thaliana</i> .	18
Obrázek 6 : Schematické znázornění drah řízených MAP kinasami v reakci na vybrané abiotické stresy u <i>A. thaliana</i> a <i>M. sativa</i>	19
Obrázek 7: Transversální řez stonkem <i>M. sativa</i>	29
Obrázek 8: Postup metody automatizovaného měření xylémových buněk stonku <i>M. sativa</i>	30
Obrázek 9: 3D struktura AtMKK5 ze dvou opačných stran	33
Obrázek 10: 3D struktura AtMKK5 s vyznačenými Ser/Thr sekvencemi	34
Obrázek 11: Umístění vazebných míst pro transkripční faktory na promotoru genu <i>AtMKK5</i>	36
Obrázek 12: Znázornění domén a lokalizace možných bodových mutací mitogen-aktivované protein kinasy AtMKK5 ve 2D a 3D	39
Obrázek 13: 3D struktura AtMKK1 ze dvou opačných stran	40
Obrázek 14: 3D struktura AtMKK1 s vyznačenými Ser/Thr sekvencemi	40

Obrázek 15: Umístění vazebných míst pro transkripční faktory na promotoru genu <i>AtMKK1</i>	42
Obrázek 16: Znázornění domén a lokalizace možných bodových mutací mitogen-aktivované protein kinasy <i>AtMKK1</i> ve 2D a 3D	46
Obrázek 17: Diferencované kalusy se somatickými embryi na povrchu B50 média	47
Obrázek 18: Somatická embrya ve svých vývojových fázích	47
Obrázek 19: Mladé vyvíjející se rostliny <i>M. sativa</i> na MS médiu	48
Obrázek 20: Reprezentativní snímky pro měření xylémových buněk u transgenních linií <i>M. sativa</i> SIMKKi a GFP-SIMK a u kontrolní linie RSY	49
Obrázek 21: Výsledek automatizovaného měření xylémových buněk u transgenních linií <i>M. sativa</i> SIMKKi a GFP-SIMK a u kontrolní linie RSY	50
Obrázek 22: Relativní četnosti počtu ploch xylémových buněk v jednotlivých velikostních intervalech u transgenních linií <i>M. sativa</i> SIMKKi a GFP-SIMK a u kontrolní linie RSY	51
Obrázek 23: Studované MAP kinasy exprimované v epidermálních buňkách transientně transformovaných listů <i>N. benthamiana</i>	53
Obrázek 24: Fenotypy transientně transformovaných listů <i>N. benthamiana</i> se studovanými konstrukty	54

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Aplikovaná selekční antibiotika pro používané konstrukty	24
Tabulka 2: Použité kombinace konstruktů při transientní transformaci	31
Tabulka 3: Vazebná místa pro transkripční faktory na promotoru genu <i>AtMKK5</i>	36
Tabulka 4: Polymorfismy genu <i>AtMKK5</i> s koordináty 7445604–7448498 bp na chromozomu 3	38
Tabulka 5: Bodové mutace v AMK sekvenci <i>AtMKK5</i>	38
Tabulka 6: Proteinové domény na proteinu <i>AtMKK5</i>	39
Tabulka 7: Vazebná místa pro transkripční faktory na promotoru genu <i>AtMKK5</i>	42
Tabulka 8: Protein-proteinové interakce <i>AtMKK1</i>	44
Tabulka 9: Polymorfismy genu <i>AtMKK1</i> s koordináty 13217475 – 13219936 bp na chromozomu 4	45
Tabulka 10: Bodové mutace v AMK sekvenci <i>AtMKK1</i>	45
Tabulka 11: Proteinové domény na proteinu <i>AtMKK1</i>	46

1 ÚVOD

Klíčovou rolí při zachycení podnětů z okolí i vnějšího prostředí buňky a poté následném zprostředkování fyziologické odpovědi u rostlin hrají mitogen aktivované protein kinasy. Tyto proteiny fungují ve stupňovitém modulu, kdy jsou jednotlivé stupně propojeny díky přenosu fosfátové skupiny v režimu donor-akceptor, kdy akceptor může být v dalším stupni donorem fosfátu pro další protein. V reakci na solný stres, patří mezi jeden z podstatných faktorů omezující zemědělskou produkci, byla zjištěna v tolici vojtěšce důležitá role stresem indukované mitogen aktivované protein kinasy (SIMK). Rovněž je známo zapojení SIMK při nodulačních procesech, kdy pozitivně ovlivňuje nejen tvorbu nodulů, ale i produkci nadzemní biomasy. Dále pokud je SIMK nadměrně exprimována v transgenních rostlinách, dochází u nich ke zvýšené tvorbě a růstu kořenových vlásků.

Vzpomenuta může být rovněž role jejich upstream aktivátorů, tedy patogen responzivní MAP kinasy kinasy (PRKK) a solným stresem indukovanou MAP kinasu kinasu (SIMKK). Zatímco SIMKK je indukována zvýšenou koncentrací solí a houbovými elicitory, PRKK nezprostředkuje aktivaci SIMK signalizovanou solným stresem, nýbrž aktivuje různé MAP kinasy, včetně SIMK, v reakci na patogenní elicitor.

Z výše uvedeného tedy vyplývá důležitost těchto kinas ve funkci regulátorů stresových signalizací v rostlině. Významné je tedy jejich studium pro následné využití v zemědělství nejen při zvyšování odolnosti vůči patogenům a odolnosti vůči stresu, ale také při zkoumání symbiotických interakcí s bakteriemi fixující vzdušný dusík.

2 CÍLE PRÁCE

- 1 Cílem této bakalářské práce v teoretické části je vypracovat literární rešerši, která bude charakterizovat mitogen aktivované protein kinasy v tolici vojtěšce (*Medicago sativa*) a jejich ortolozích v jiných rostlinných druzích, tedy v huseníčku rolním (*Arabidopsis thaliana*), tolici *Medicago truncatula* a dále dle dostupné literatury. Poté se bude rešerše zabývat signálními drahami MAPK se zaměřením na SIMK, SIMKK a PRKK při vývinu a odpovědi na stres, ale i v souvislosti s regulací cytoskeletu a interakcí rostliny s mikroorganismy.
- 2 V rámci praktické části této bakalářské práce budou provedeny *in silico* analýzy proteinů AtMKK5 a AtMKK1 u *Arabidopsis thaliana* (ortology SIMK a PRKK v *Medicago sativa*) se zaměřením na predikci struktury, funkce, interakce a transkripční regulace. Dále bude provedena transientní (ko-)transformace listů *Nicotiana benthamiana* s fluorescenčně značenými MAPK konkrétně SIMK, SIMKK a PRKK. Budou také studovány fenotypy transientně transformovaných listů. V rámci metody somatické embryogeneze budou rozmnoženy rostliny transgenní linie *Medicago sativa*. V neposlední řadě bude provedeno porovnání fenotypu transgenních rostlin v porovnání s divokým typem. Pomocí programu ZEN lite a následně v programu ImageJ budou zpracovány mikroskopické obrázky, kdy výstupem budou data, která budou sloužit pro statistické vyhodnocení pomocí t-testu nebo ANOVA.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Tolice vojtěška (*Medicago sativa* L.)

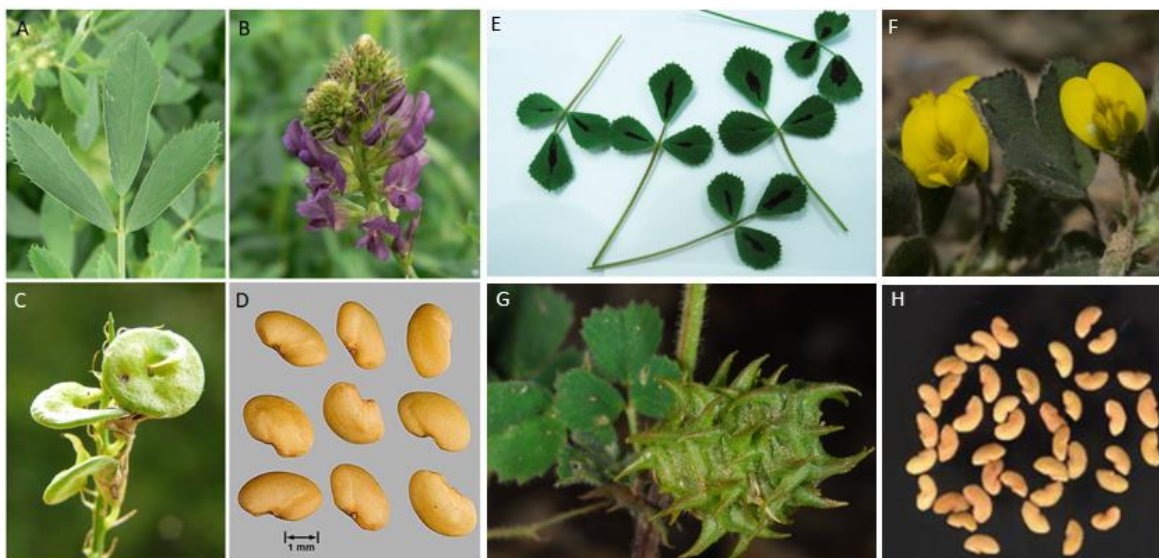
Tolice vojtěška (angl. Alfalfa, lucerne) je vytrvalou rostlinou s téměř lysými 30–100 cm dlouhými lodyhami porostlými čárkovitě kopinatými palisty a trojčetnými, krátce řapíkatými listy (Obr. 1, A), složenými z obvejčitých a olýsalých lístků. Z úžlabí listů vyrůstají hlávkovité hrozny skládající se z modrofialových kvítků. Kvítky jsou 8–11 mm dlouhé a jsou složeny z pěticípého kalichu a z modrofialové koruny (Obr. 1, B). Na největším horním plátku koruny, pavéze, se nachází tmavomodrá kresba. Z celkových deseti tyčinek je devět srostlých svými nitkami, poslední tyčinka zůstává volná. Pestík se svrchním semeníkem se při tvorbě plodu mění v krátký, šnekovitě stočený lusk (Obr. 1, C), který je na povrchu síťkovitě žilkovaný a přitiskle chlupatý (Pilát, 1968; Dostál, 1989).

Pěstuje se v mnoha kultivarech, mnohdy i v křížencích s tolicí srpovitou (Dostál, 1989). Rostlina poměrně dobře snáší sucho, což jí umožňuje dlouhý kořen, jenž vniká hluboko do půdy (Pilát, 1968). Je charakterizována autotetraploidii, kdy $2n=4x=32$, ale existují též diploidní jedinci *M. sativa* (Song *et al.*, 2019). Patří mezi nejstarší kulturní rostliny, v současnosti se rozšířila i do tropů, kde roste ve vyšších polohách. V subtropích je pěstována zpravidla pouze se závlahou (Valíček, 2002).

Pro svůj optimální růst nevyžaduje nebo vyžaduje pouze malé množství dusíkatého hnojiva. Je hojně využívána jako krmivo pro hospodářská zvířata. Další využití nachází jako surovina pro výrobu biopaliva, sena a siláže (McCoy a Bingham, 1988; Hrbáčková *et al.*, 2020a). Je schopna vázat až 200–300 kg vzdušného dusíku na hektar porostu díky aktivitě symbiotických bakterií (Mlíkovský a Stýblo, 2006). Konkrétně jsou mezi tyto bakterie zahrnuty půdní bakterie *Rhizobia* redukující atmosférický dusík na amoniak v kořenových nodulech (Wang *et al.*, 2018; Hrbáčková *et al.*, 2020b). Primárním areálem vojtěšky seté je východ Malé Asie přes Zakavkazí do Střední Asie, odkud se přes oblast východního Středomoří rozšířila do Evropy a následně do celého světa (Mlíkovský a Stýblo, 2006).

3.2 Tolice *Medicago truncatula* Gaertn.

Medicago truncatula (angl. barrel medic) představuje luštěninu středomořského původu blízce příbuznou *M. sativa*, spolu se kterou náleží do čeledi bobovitých (*Fabaceae*). Jedná o samosprašnou jednoletou rostlinu s generační dobou 3–6 měsíců (Küster, 2013). Květ (Obr. 1, F) je tvořen kalichem složeným z pěti zelených kališních lístků a korunou, která se skládá z pěti žlutých okvětních lístků (Bosseno *et al.*, 2019).



Obrázek 1: Vegetativní a generativní orgány *M. sativa* a *M. truncatula*. **A** List *M. sativa*. Převzato z Ref. 1. **B** Květ *M. sativa*. Převzato z Ref. 1. **C** Lusk (plod) *M. sativa*. Převzato z Ref. 2. **D** Semena *M. sativa*. Převzato z Ref. 3. Měřítko 1 mm. **E** Listy *M. truncatula*. Převzato ze Sulieman *et al.* (2013) **F** Květy *M. truncatula*. Převzato z Ref. 4. **G** Lusk (plod) *M. truncatula*. Převzato z Ref. 5. **H** Semena *M. truncatula*. Převzato z Liu *et al.* (2019).

Je charakterizována malými, stočenými ostnatými lusky (Obr. 1, G) soudkovitého tvaru (Küster, 2013). Semena (Obr. 1, H) jsou zhruba dvakrát větší než u vojtěšky seté. Jedná se o diploidní rostlinu ($2n = 4x = 32$) s osmi chromozomy (Barker *et al.*, 1990).

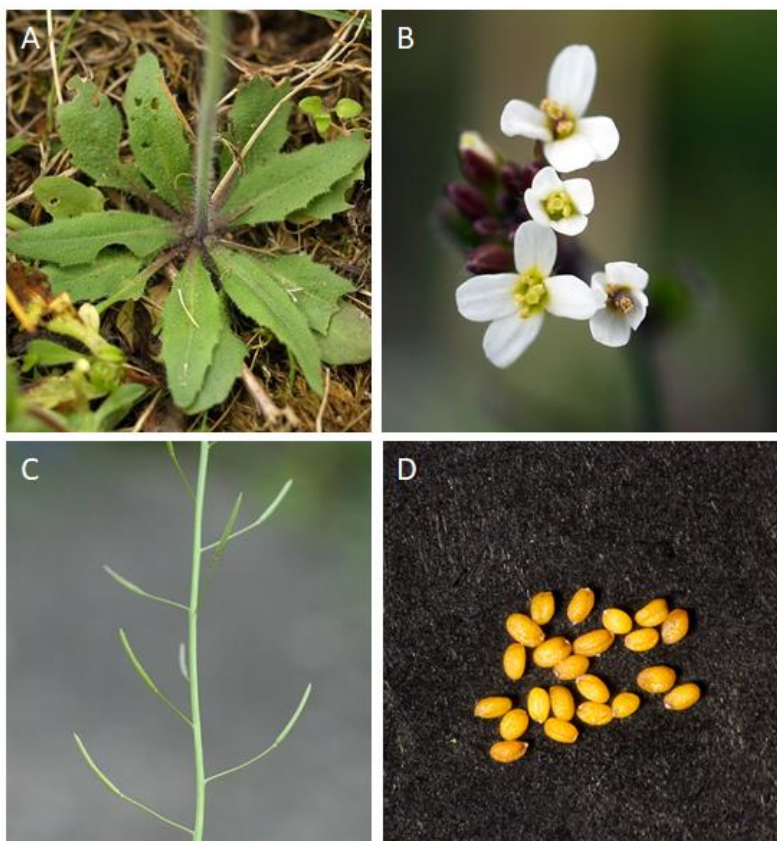
Díky krátké generační době, diploidii a malému genomu slouží jako modelový organismus pro studium symbiotické fixace dusíku, mykorhizy a genomiky (Krishnakumar *et al.*, 2015). Je schopna vykonávat dvě důležité symbiotické interakce, tedy symbiózu s půdními mikroby ústící ve vývoj kořenových nodulů fixujících dusík a také arbuskulární mykorhizu (Küster, 2013). Další oblastí zájmu při zkoumání *M. truncatula* je její značná produkce sekundárních metabolitů, spojených se specifickou odolností vůči chorobám luštěnin (Frugoli a Harris, 2001).

3.3 Huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana* L.)

Huseníček rolní je 5–40 cm vysoká rostlina s jednoduchou či větvenou přímou lodyhou. Lodyha je řídko listnatá. Listy nacházející se v přízemní růžici jsou podlouhlého až kopist'ovitého tvaru, v řapíku náhle zúžené (Obr. 2, A). Jsou celokrajné nebo oddáleně zubaté, vidličnatě chlupaté a na řapíku barvitě. Listy lodyžní jsou přisedlé, kopinatého až čárkovitého tvaru, na bázi jsou zúžené, celokrajné, chlupaté jen na rubu. Rostlina má hustý květní hrozen, který je chocholičnatý. Jednotlivé stopky 2–5 mm dlouhé jsou odstálé. Kalich je vzpřímený a korunní lístky jsou bílé barvy (Obr. 2, B). Zaobleně čtyřhranné šesule o délce 10–20 mm jsou přímo odstálé (Dostál, 1989).

Huseníček rolní roste na polích, pastvinách, úhorech a rumišťích. Daří se mu na

výslunných kamenitých stráních ve výhřevné, mírně vlhké půdě (Pilát, 1968). Nejedná se o hospodářsky významnou rostlinu, avšak své uplatnění našel jako modelový organismus v rostlinné genetice a molekulární biologii, a to především díky jeho malé velikosti, krátké generační době (6 týdnů) a produkci velkého množství semen (Obr. 2, D), kterých dokáže jedna rostlina vyprodukovat více než 5000 (Campbell *et al.*, 2015).



Obrázek 2: Vegetativní a generativní orgány *A. thaliana*. **A** Listy v přízemní růžici *A. thaliana*. Převzato z Ref. 6 **B** Květy *A. thaliana*. Převzato z Ref. 6. **C** Šešule (plody) *A. thaliana*. Převzato z Ref. 7. **D** Semena *A. thaliana*. Převzato z Ref. 8.

Genom *A. thaliana* zahrnuje okolo 27000 genů kódujících proteiny, díky čemuž se řadí mezi nejmenší genomy rostlinné říše. Jedná se o první rostlinu, u které byl osekvenován celý genom. Další významnou vlastností je jeho snadná transformace s transgeny. Nejčastěji je prováděna transformace rostlinných buněk jejich infekcí s geneticky pozměněnými *Agrobacterium tumefaciens* (Campbell *et al.*, 2015).

3.4 Mitogen aktivované protein kinasy a fosfatasy, jejich nomenklatura a fylogeneze

Mitogen aktivované protein kinasy (MAPK) představují třídu serin/threoninových protein kinas, jež jsou zapojeny při kontrole mnoha buněčných funkcí ve všech eukaryotických buňkách (Nakagami *et al.*, 2005). Signální dráhy mitogen aktivovaných protein kinas se podílejí na regulaci buněčného růstu a smrti, buněčného cyklu a též hrají roli při odpovědi na abiotický i biotický stres (Jonak *et al.*, 2002). Popsán je i jejich vliv na působení fytohormonů zahrnujících auxiny, ethylen, kyselinu abscisovou, gibbereliny a na kyseliny jasmonovou a salicylovou (Kiegerl *et al.*, 2000).

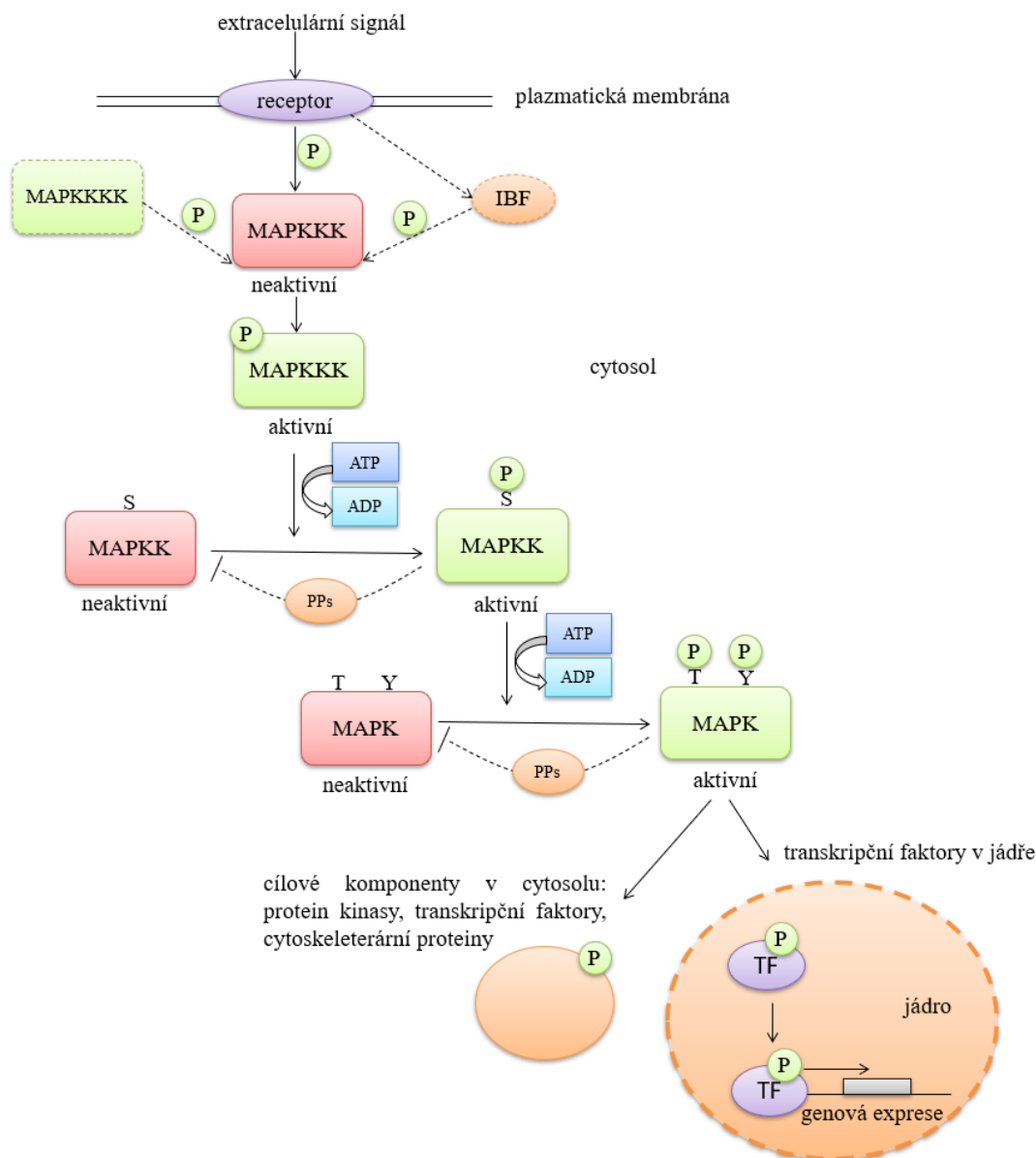
MAPK fosforylují své substráty, přičemž touto modifikací přispívají k regulaci proteinů. Fosforylace pravděpodobně patří mezi jednu z nejpočetnějších posttranslačních modifikací u eukaryot a je regulována prostřednictvím proteinkinasy a proteinfosfatas (Bigeard a Hirt, 2018).

Struktura MAPK je tvořena dvojlaločným systémem, v němž je ve štěrbině mezi dvěma laloky vázáno ATP a na C-terminálním laloku je vázán substrát (Kiegerl *et al.*, 2000). Interagující proteiny se často vážou na MAPK prostřednictvím krátkého aminokyselinového prototypu označovaného jako dokovací místo (CD, common docking site, obecné dokovací místo). CD místo se vyznačuje interakcí s komplementárním vazebným motivem D-místa nacházejícím se na regulačních a substrátových proteinech. CD místo se nachází na C-konci kinasové katalytické domény, zatímco D-místo je nejčastěji lokalizováno v blízkosti N-konce MAPKK (Dóczi *et al.*, 2012).

Kaskády MAPK se sestávají z minimálně tří dílčích kinasových jednotek, mezi které patří mitogen aktivované protein kinasy kinasy kinasy (MAPKKKs/MEKK/MAP3K), mitogen aktivované protein kinasy kinasy (MAPKKs/MKK/MEK/MAP2K) a mitogen aktivované protein kinasy (MAPKs/MPK), napojených na jejich upstream receptory a downstream cíle (Jonak *et al.*, 2002), jak lze vidět na obr. 3. Tyto stupně jsou vzájemně propojeny tak, že koncová komponenta kaskády MAPK je prostřednictvím dvojité fosforylace zbytků threoninu a tyrosinu motivu TxY umístěného v aktivační smyčce (T-loop) aktivována působením MAPKK. Samotné MAPKK se stávají aktivními fosforylací serinových či threoninových zbytků v T-smyčce (Ichimura *et al.*, 2002).

Aktivace MAPKKK je zprostředkována receptorem a může nastat buď pomocí fyzické interakce, a/nebo díky fosforylaci. K fosforylaci dochází buď přímo prostřednictvím samotného receptoru, nebo se uplatňují tzv. intermediate bridging factors (IBF) či může nastat aktivací upstream komponentou MAPKKKK (MAP4K) (Nakagami *et al.*, 2005).

Cílem MAPK mohou být mnohé transkripční faktory, proteinkinasy či komponenty MAPK kaskády (MAPKK, MAPKKK) nebo receptory samotné (Karin, 1998; Whitmarsh a Davis, 1998; Cardinale *et al.*, 2002). Fosforylací může být také modulována aktivita cytoskeletárních proteinů, fosfolipáz či proteinů asociovaných s mikrotubuly a exprese specifických souborů genů v reakci na podněty v prostředí (Danquah *et al.*, 2014).



Obrázek 3: Obecný model signální kaskády MAPKs. Extracelulární signál je přijat membránovým receptorem. Následuje aktivace MAPK modulu: (MAPKKKK)→MAPKKK→MAPKK→MAPK. Aktivní MAPK může fosforylovat cytoskeletární komponenty či aktivovat další protein kinasy nebo se translokovat do jádra a zde fosforylovat transkripční faktory, čímž je regulována genová exprese. Genová exprese může být zvýšena nebo naopak potlačena díky tomu, že fosforylované substráty mění vazebnou afinitu k promotoru. IBF – intermediate bridging factors, PPs – fosfatasy. Upraveno podle Jonak *et al.*, 1999, Meskiene *et al.*, 2003; Danquah *et al.*, 2014; Jiang *et al.*, 2022.

Specifitu a rychlost aktivace MAPK mohou zvyšovat scaffold proteiny. Tato proteinová „lešení“ byla potvrzena pro oxidativním stresem aktivovanou trojitou MAP kinasa (OMTK1, **oxidative stress-activated MAP triple-kinase 1**), jejíž interakce s MMK3 (*Medicago* **MAP kinasa 3**) byla pozorována v protoplastech v reakci na H₂O₂ (Nakagami *et al.*, 2004). Funkci lešení může rovněž nabývat MEKK1 díky své schopnosti vázat se na MKK2 a downstream MPK4 (Rodriguez *et al.*, 2010).

Při aktivaci dráhy MAPK často dochází k transkripční aktivaci fosfatasy, které mohou tuto dráhu inaktivovat, čímž je umožněna kontrola prostřednictvím negativní zpětné vazby (Tena *et al.*, 2001). Tedy součástí signalizačních kaskád jsou i proteinfosfatasy, které umožňují defosforylaci threoninových a tyrosinových zbytků na TxY motivu v aktivační smyčce. Jako příklad může být uvedena AtDsPTP1 (*Arabidopsis thaliana* **dual specifity protein tyrosine phosphatase**, *Arabidopsis thaliana* dvojité specifická protein tyrosin fosfatasa) podílející se na inaktivaci AtMPK4 *in vitro* (Mishra *et al.*, 2006).

Jedná se o různorodou rodinu enzymů, která je rozdělena do dvou hlavních tříd, tedy na protein serin/threonin fosfatasy a protein tyrosin fosfatasy. První skupina je členěna do čtyř kategorií PP1, PP2A, PP2B, PP2C. PP2C proteiny nevykazují žádnou evidentní podobnost s ostatními třídami fosfatasy, které sdílejí 40% identitu ve svých katalytických doménách. PP2C se liší od ostatních tříd serin/threonin fosfatasy, které jsou lokalizovány v komplexech s regulačními podjednotkami ovlivňujícími substrátovou specifitu, aktivitu či buněčnou lokalizaci, fungují jako monomery. PP2C jsou hojně zastoupeny u *A. thaliana*, kde se podílejí na regulaci různorodých signálních drah (Meskiene *et al.*, 2003).

Pro bližší pochopení MAPK kaskád je nutné analyzovat jejich aktivitu a lokalizaci na jejich celulární a subcelulární úrovni. Tyto lokalizace jsou nejdříve predikovány za využití bioinformatických postupů a následně jsou ověřeny experimentálně. Některé MAPK jsou lokalizovány v subcelulárních kompartmentech, například v jádře (AtMPK3, AtMPK6) nebo cytoskeletu (AtMPK4, AtMPK6). Zde jsou též lokalizované jejich substráty (transkripční faktory, proteiny asociované s cytoskeletem) a jejich fosfatasy (Šamajová *et al.*, 2013).

Při sekvenování genomu *Arabidopsis thaliana* bylo zjištěno 20 genů, které mohou kódovat MAPK (Ichimura *et al.*, 2002). Za využití fylogenetických metod byly rostlinné MAPK klasifikovány do čtyř skupin (A-D). Pro rozdělení bylo klíčové srovnání sekvencí TxY motivu v aktivační smyčce. Tento motiv po dvojité fosforylaci MAPKK na threoninových a tyrosinových zbytcích aktivuje MAPK. Tímto srovnáním bylo umožněno rozdělení MAPK do dvou podtypů. Podtyp TEY zahrnuje skupiny A, B, C a podtyp TDY

utváří skupinu D (Bigeard a Hirt, 2018). Kinasy náležící skupině A jsou zapojeny v odpovědi na environmentální a hormonální podněty (Ichimura *et al.*, 2002). Ke skupině A patří například MPK3, MPK6 a jejich ortology v tabáku, vojtěšce, rýži a topolu (Rodriguez *et al.*, 2010).

Při reakci na stres z prostředí hrají též roli MAPK skupiny B, které se účastní i pochodů probíhajících při buněčném dělení (Ichimura *et al.*, 2002). Do této skupiny může být zařazena MAPK4 podílející se na obraně proti patogenům a abiotickému stresu (Rodriguez *et al.*, 2010).

U skupiny C nebylo dosud charakterizováno mnoho kinas, avšak je detekována OsMPK7 v rýži s její upstream MAPKK OsMKK3, kdy pozitivně regulují odolnost vůči infekci *Xanthomonas oryzae* (Bigeard a Hirt, 2018). Skupina D čítající 8 zástupců MAPK v *Arabidopsis thaliana* je specifická svým TDY motivem v T-smyčce a skutečností, že postrádá CD domény (Ichimura *et al.*, 2002). C-terminální dokovací doména může sloužit jako dokovací místo pro MAPKK (Rodriguez *et al.*, 2010).

Z genomu *Arabidopsis thaliana*, zahrnujícího 10 MAPKK, je patrný fakt, že MAPKK nejspíše aktivují více MAPK přes signál přenášený mezi navzájem křížícími se dráhami. Rostlinné MAPKK byly též za využití sekvenčních metod rozčleněny do 4 skupin. Skupina A pojímá kinasy MKK1 a MKK2, patřící mezi aktivátory MAPK4. MKK1 je aktivována mnoha abiotickými stresy (Ichimura *et al.*, 2002). MKK2 hraje roli v reakcích na chlad a slanost a spolu s MKK1 zprostředkují vrozenou imunitní odpověď (Rodriguez *et al.*, 2010).

Dalším členem je patogen responsivní MAPKK (MsPRKK), nacházející se u vojtěšky. AtMKK6 u *Arabidopsis* a NtMEK1 u tabáku jsou zapojeny v buněčném dělení. AtMKK3 patřící do skupiny B se sestává z domény nukleárního transportního faktoru 2 (NTF2 z angl. Nuclear Transport Factor 2) nacházejícího se v rozšířené C-koncové oblasti. Tento protein NTF2 zprostředkuje jaderný import ran-GDP (Ichimura *et al.*, 2002). MKK3 se také účastní reakčních kaskád vyvolaných patogeny a závislých na signalizaci kyseliny jasmonové (Rodriguez *et al.*, 2010). MAPKK náležící skupině C jsou aktivačními faktory pro skupiny A MAPK, jež reagují na stresy. U *Medicago sativa* exprese SIMKK vede k činnosti SIMK (Ichimura *et al.*, 2002).

V porovnání s předchozími kinasami soubor MAPKKK u *Arabidopsis* skýtá více zástupců charakterizovaných větší variabilitou v primární struktuře a stavbě domény. MAPKKK mohou být rozčleněny do dvou skupin. Skupina A sdružuje kinasy mající signifikantní podobnost v kinasových doménách a je členěna do čtyř podskupin. Například v podskupině A1 se nachází proteinkinasy AtMAPKKK1-4. Exprese AtMAPKKK1 je

zvýšena při suchu, vysoké salinitě a při reakci na dotyk. Ačkoli AtMAPKKK1-AtMAPKKK4 vykazují společnou strukturu v N-terminální oblasti, u AtMAPKKK4 rozeznáváme jedinečnou strukturu s několika funkčními doménami lokalizovanými na N-konci. Příkladem může být doména WRKY, jež pravděpodobně vykazuje schopnost vázat DNA. V N-koncové oblasti byly nalezeny sekvence vykazující strukturní podobnost s geny rezistence. Tato skutečnost může naznačovat spojení s obrannou signální reakcí v rostlině. Vysvětlení této jedinečné struktury MAPKKK4 můžeme podložit faktem, že došlo k rekombinaci mezi genem rezistence vůči onemocnění a genem MAPKKK4 v důsledku jejich vzájemné lokalizace v oblasti sousedního chromozomu (Ichimura *et al.*, 2002).

3.5 Vybrané MAP kinasy v tolici vojtěšce

3.5.1 MMK3

U MMK3 neboli *Medicago* MAP kinasy 3 byla stanovena její nejvyšší hladina a aktivita v mladých orgánech, nejnižší byla pozorována během vývoje listů a květů, což naznačuje roli MMK3 v regulaci buněčného cyklu, kde je přechodně aktivována během mitózy. Je přítomna v dělicích se buňkách pouze v průběhu buněčného cyklu, kdy je aktivována až po metafázi. Její aktivita je spojena s načasováním tvorby fragmoplastu (Bögge *et al.*, 1999; Mishra *et al.*, 2006).

Funkci jejího upstream aktivátoru plní OMTK1, se kterou koexistuje v komplexu v protoplastech. OMTK1 je aktivována pouze v reakci na tvorbu H₂O₂ vyvolanou buněčnou smrtí v rostlině (Nakagami *et al.*, 2004). Ethylenový prekurzor ACC může rovněž spustit kinasovou aktivitu MKK3, ale i SIMK, tedy je naznačen vliv těchto dvou MAPK při přenosu ethylenu v signálních drahách (Ouaked *et al.*, 2003).

Jejím ortologem v *Arabidopsis thaliana* je AtMPK13 (Ichimura *et al.*, 2002). Co se dále týká její sekvence, nejvíce je podobná tabákové MAPK NTF6 (*Nicotiana tabacum* F6), která je též aktivní během mitózy, avšak není jasné, zda se jedná o ortolog. Sdílí taktéž podobnost s MMK2 (*Medicago* MAP kinase 2) (Bögge *et al.*, 1999)

3.5.2 SAMK

SAMK (stresem aktivovaná MAP kinasa, stress activated MAP kinase,) taktéž označovaná MMK4 představuje protein, nacházející své uplatnění při signalizaci stresem aktivovaných drah při suchu, chladu, poranění a dotyku, a jejímž homologem v *Arabidopsis thaliana* je AtMPK3 (Meskiene *et al.*, 1998, Mishra *et al.*, 2006). Po poranění dochází k rychlé a

přechodné expresi genu *MP2C* jež kóduje fosfatasy MP2C (*Medicago* protein phosphatase 2C, poraněním indukovaná fosfatasa z vojtěšky typu 2C) defosforylující SAMK, čímž se stává negativním regulátorem dráhy SAMK. Tvorbu genu *MP2C* usměřňuje samotná SAMK prostřednictvím negativní zpětnovazebné smyčky. Tento postranlační mechanismus zabraňuje trvalé aktivaci SAMK při poranění (Meskiene *et al.*, 1998).

3.5.3 SIMK a její nadřazené kinasy SIMKK a PRKK

SIMK (salt stress-induced MAPK), rovněž označovaná MsK7 (*Medicago sativa* cDNA clone) či MMK1 (*Medicago* MAP kinase 1), reprezentuje solným stresem indukovanou MAPK, která se nachází převážně v jádře, odkud se při aktivaci šíří do špiček kořenových vlásků, a jejímž homologem je AtMPK6 u *Arabidopsis* (Mishra *et al.*, 2006; Hrbáčková *et al.*, 2020b).

Byla studována role SIMK při tvorbě kořenových vlásků, kdy je spolu s F-aktinovými vlákny lokalizována ve špičkách kořenových vlásků v rostoucím kořenovém vlášení. Její aktivita a změny v subcelulární lokalizaci jsou spjaty se změnami v aktinovém cytoskeletu. Při nadměrné expresi SIMK v transgenních rostlinách dochází k vyšší tvorbě a růstu kořenových vlásků (Šamaj *et al.*, 2002).

SIMK je aktivována koncentracemi soli nad 125 mM NaCl, avšak při vyšší koncentraci (od 750 mM do 1M) je indukována jiná kinasa, což může být způsobeno toxicitou sodíku, jež je zodpovědná za inhibici aktivace SIMK. Může být rovněž indukována KCl a sorbitolem, což signalizuje její zapojení v hyperosmotickém stresu (Mishra *et al.*, 2006). Mimo to je aktivována houbovými elicitory (Cardinale *et al.*, 2002).

Během dělení buněk kořene *M. sativa* při solném stresu byla pozorována indukce SIMK, která byla lokalizována do preprofázních svazků a fragmoplastů. V dělicích se buňkách vojtěšky při ošetření chladem a oryzalinem, herbicidem narušujícím mikrotubulární cytoskelet, byla aktivována SAMK. Další MAPK lokalizovanou do fragmoplastů je MMK3 (Šamaj *et al.*, 2004).

Jedním z upstream regulátorů SIMK je stresem indukovaná MAP kinasa kinasa SIMKK (stress induced MAP kinase kinase), jež byla identifikována pomocí kvasinkového dvouhybridního testu (yeast two-hybrid system, Y2H) jako ortolog AtMKK4/5 (Tena *et al.*, 2001). SIMKK sdílí 88% podobnost v aminokyselinové sekvenci s LjSIP2 v *Lotus japonicus*, taktéž s MtMKK4 v tolici *Medicago truncatula* byla zjištěna velmi podobná aminokyselinová sekvence. (Hrbáčková *et al.*, 2020b). V neaktivním stavu se SIMKK a SIMK nacházejí společně v cytoplazmě a jádře (Ovečka *et al.*, 2014). Byla zjištěna

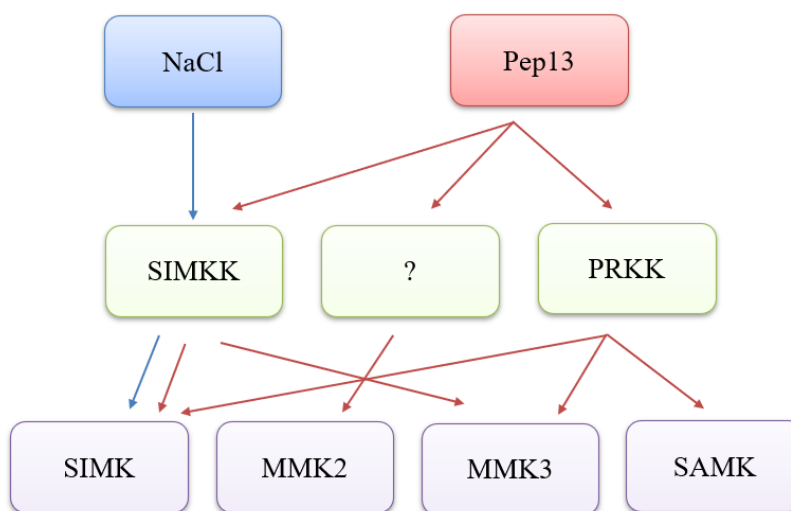
specifická interakce mezi SIMK a SIMKK. Testovala se interakce SIMKK s dalšími MAPK vojtěšky, tedy MMK2, MMK3 a SAMK. Byla provedena fúze s GAL4 vazebnou doménou pGBT9 a tento konstrukt byl zaveden do kmene kvasinek s již obsaženým SIMKK-pGAD424. Tyto kolonie byly testovány na jejich schopnost růstu na selektivním médiu Ade⁻ a na interakci v β -galaktosidázovém filter lift testu (Beta-galactosidase filter lift assay), kde byly schopné růstu a interakce pouze buňky kotransformované za využití SIMK-pGBT9 a SIMKK-pGAD424. Koexprese *SIMKK* a *SIMK* vede k zřetelně vyšší aktivaci SIMK než u samotné SIMKK, což potvrzuje skutečnost, že je SIMKK specifickým aktivátorem MAPK indukovatelné přítomností soli (Kiegerl *et al.*, 2000).

Po vytvoření transgenních rostlin GFP-SIMK vyznačujících se nadměrnou expresí *SIMK*, značené za využití zeleného fluorescenčního proteinu (GFP, **g**reen **f**luorescent **p**rotein), bylo možné pozorovat nárůst nadzemní biomasy rostliny a delší kořenové vlásky. Delší kořenové vlásky byly pravděpodobně pozorovány v důsledku opožděného zastavení růstu kořenové špičky v porovnání s rostlinami divokého typu linie **Regen SY(RSY)**. Tyto linie GFP-SIMK taktéž vykazují větší množství infekčních vláken a seskupených nodulů. Další připravenou linií byla SIMKKi, u které byly downregulovány geny *SIMK* a *SIMKK*. Linie SIMKKi i předchozí GFP-SIMK byly připraveny za použití linie RSY a konstitutivního promotoru 35S. Rostliny v linii SIMKKi mají kratší kořenové vlášení oproti RSY a GFP-SIMK. V důsledku snížené exprese genů *SIMKK* a *SIMK* u linie SIMKKi dochází u transgenních rostlin k nejnižší tvorbě nadzemní biomasy a nodulů v porovnání s oběma liniemi RSY i GFP-SIMK. Další znak, který lze porovnávat, je tvar listů vyrostlých na nových výhoncích. Linie GFP-SIMK se vyznačuje delšími, širšími a více oválnými listy oproti RSY linii. Naopak SIMKKi linie je charakterizována užšími, kratšími listy s méně vlnitými okraji. V neposlední řadě je zajímavé sledovat množství nodulů v klastrech. V průměru nejvíce nodulů oproti oběma liniím je vytvořeno v linii GFP-SIMK. Veškerá tato zjištění nasvědčují důležitosti SIMK v mnoha zemědělsky významných vlastnostech, ale i nodulačních procesech, kdy je SIMK spjata s interakcemi se symbiotickými bakteriemi (Hrbáčková *et al.*, 2020b).

V *Arabidopsis* s nadměrnou expresí SIMKK značenou žlutým fluorescenčním proteinem (YFP, **y**ellow **f**luorescent **p**rotein) byla studována role SIMKK, přičemž takto modifikované rostliny se po ošetření solí vyznačují zvýšenou aktivací AtMPK3 a AtMPK6, MAP kinas, jejichž funkce tkví v regulaci odpovědi rostliny na solný stres. U rostlin s nadměrnou expresí SIMKK-YFP lze sledovat snížené množství proteinů asociovaných s antioxidační obranou spojenou s tolerancí vůči slanosti, například kataláz, glutathion S-transferáz a

peroxiredoxinu (Ovečka *et al.*, 2014).

Další MAPKK interagující se SIMK je PRKK (patogen responzivní MAP kinasa kinasa, pathogen-responsive MAP kinase kinase), která představuje neaktivní formu MAPKK. Požaduje tedy pro svoji aktivaci příslušnou MAPKKK. Pokud je přítomen elicitor stejně jako SIMKK, PRKK cílí na SIMK a MMK3, navíc může cílit i na SAMK (Obr. 4) (Cardinale *et al.*, 2002).



Obrázek 4: Signalizační dráhy MAPKK a MAPK u *M. sativa* při stresových dějích. Ošetření NaCl a elicitem odvozeným z houbového patogena *Phytophthora sojae* probíhalo po dobu deseti minut. Po ošetření Pep13 byla pozorována aktivace SIMK a MMK3 zprostředkovaná SIMKK. Tytéž MAPK spolu se SAMK byly aktivovány prostřednictvím PRKK. Elicitem indukovanou aktivaci MMK2 nezprostředkuje PRKK ani SIMKK, ale podílí se na ní dosud nezjištěná MAPKK. NaCl indukovala pouze SIMK prostřednictvím SIMKK. Upraveno podle Cardinale *et al.*, 2002.

3.6 Vybrané MAP kinasy v huseníčku rolním

3.6.1 AtMPK3 a AtMPK6

AtMPK6 a AtMPK3 jsou si blízké příbuzné MAPK, kdy jsou klíčovými regulátory mnoha procesů zahrnujících vývoj stomat, abscisi listů či plodů, signalizaci abiotických stresů a obranných reakcí na bakteriální a houbové patogeny (Pitzschke *et al.*, 2009). Tyto MAPK spolu s AtANP1 negativně regulují ranou signalizaci auxinu (Tena *et al.*, 2001). AtMPK6 vykazuje velkou strukturní podobnost se kyselinou salicylovou indukovanou protein kinasou (SIPK, salicylic acid-induced protein kinase,) v tabáku. SIPK je také strukturně velmi podobná SIMK ve vojtěšce (Ichimura *et al.*, 2000). AtMPK3 a AtMPK6 jsou substráty pro fosforylaci AtMKK7, kdy kaskáda AtMKK7→AtMPK6 je zodpovědná za regulaci větvení výhonků, hypokotylový gravitropismus, prodlužování filamentů a tvorbu laterálních kořenů, zatímco AtMKK7→AtMPK3 se podílí převážně na

morfologii listů (Jia *et al.*, 2016).

Jiný modul AtMKK9→AtMPK6 nachází zapojení při senescenci, což je prokázáno schopností MKK9 fosforylovat MPK6 *in vitro* i v protoplastech a opožděným stárnutím v listech mutantů *mpk6-2* a *mkk9-1*. Nadměrná exprese *MKK9* má za následek předčasnou senescenci, přesto je AtMKK9 aktivována taktéž zraněním a oxidačními činidly, proto je pro průkaz role AtMKK9 a AtMPK6 v senescenci klíčové studium fenotypů mutantů. Dalším rozšířením souvisejícím s procesy stárnutí v rostlině je kaskáda MKK9→MPK3/6 podílející se na signalizaci ethylenu (Jagodzic *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2009).

3.6.2 AtMPK4 a AtMPK11

AtMPK4 je potřebná pro tvorbu buněčné destičky při cytokinezi, kdy mutace v AtMPK4 způsobuje různé defekty cytokineze, jako jsou nedostatečně zralé buněčné destičky a poruchy růstu. Dále byla u mutantů *mpk4-2* měřena hladina transkriptů *AtMPK11*, kdy bylo zjištěno, že v děložních lístcích byla hladina 12krát vyšší a ve vrcholcích nadzemní biomasy až 40krát vyšší oproti rostlinám divokého typu. Defekty při tvorbě buněčné destičky u *mpk4-2* ve srovnání s ostatními mutacemi nejsou tak výrazné, což můžeme vysvětlit zvýšenou hladinou transkriptů *AtMPK11*, jež může být způsobena transkripční kompenzací. AtMPK4 může negativně kontrolovat transkripci genu *AtMPK11* závisle i nezávisle na cytokinezi (Kosetsu *et al.*, 2010). AtMPK4 může být aktivována prostřednictvím svých upstream kinas, AtMEKK1, MEK1 a AtMKK2 (Ichimura *et al.*, 2000).

Dále byla studována role AtMPK4 v obranných reakcích, kdy se mutant *mpk4* vyprodukovaný transpozonovou inaktivací *AtMPK4* vyznačuje konstitutivní získanou systémovou rezistencí (SAR, systemic acquired resistance) zahrnující zvýšené hladiny kyseliny salicylové, dále zvýšenou odolnost vůči virulentním patogenům a také konstitutivní genovou expresí související s patogenezí. (Petersen *et al.*, 2000).

Taktéž je nastíněna úloha AtMPK11 při cytokinezi, kdy dvojitý mutant *mk4-2 mpk11*, tedy *mpk4-2* se zavedenou mutací *mpk11*, vykazuje zvýšenou pravděpodobnost vzniku defektu při tvorbě buněčné destičky a růstu rostliny oproti samostatným jednoduchým mutantům. Dvojitý mutant *mpk4-2 mpk11* nevytváří stonky květenství a poté uhyne. Toto zjištění může naznačovat alespoň určitou míru účasti AtMPK11 na cytokinezi v pozadí AtMPK4 (Kosetsu *et al.*, 2010).

3.7 Úlohy MAPK při vývinu

Embryogeneze a následný růst a vývoj rostlin jsou řízeny signalizací MAPK. Ty hrají roli při vývoji gametofytů, produkci gamet spolu se specifikací orgánů v průběhu embryogeneze a kontrole vegetativního růstu a vývoje orgánů (Komis *et al.*, 2018). Po oplození v časném vývoji embrya u *Arabidopsis thaliana* hraje esenciální roli MAPKKK4 neboli YODA (Taj *et al.*, 2010). Ta funguje v kaskádě MAP kinas jako první molekulární spínač při regulaci počátečního osudu buněk v zygote (Lukowitz *et al.*, 2004). Signalizace zprostředkovaná YDA je nezbytná pro asymetrické dělení zygoty a časný vývoj embrya (Wang a Gou, 2020). Zygota *Arabidopsis* je třikrát prodloužena a poté se asymetricky dělí na malou embryonální apikální buňku a na větší bazální buňku. YODA podporuje prodlužování zygoty a vývoj její bazální dceřiné buňky (Lukowitz *et al.*, 2004). Cílem této dráhy je transkripční faktor WRKY2 (WRKY je transkripční faktor obsahující vysoce konzervovanou sekvenci aminokyselin WRKY-tryptofan **W**, arginin **R**, lysin **K**, tyrosin **Y**), který upreguluje transkripci WOX8, transkripčního faktoru v zygote (Lukowitz *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007; Bayer *et al.*, 2009; Ueda *et al.*, 2017).

Při vývoji u *Arabidopsis* je dalším důležitým článkem kinasa ERECTA neboli receptoru podobná protein kinasa (ER, receptor-like protein kinase) určující architekturu květenství, tvar orgánu a velikost. Bylo zjištěno, že MPK3 a MPK6 jsou důležité nejen při obranných reakcích na stres, ale svoji roli zastávají i při vývojových procesech zahrnujících vzorování průduchů a vývoj vajíčka. Členové modulu sestávajícího se z YODA→MKK4/MKK5→MPK3/MPK6 slouží jako komponenty downstreamové signalizace pro ER receptor při regulaci architektury květenství (Meng *et al.*, 2012).

Dále byla zjištěna role MKK7 a MKK9 jako pozitivních a negativních regulátorů v různých fázích vývoje. Do raného vývoje kořenů je zapojena MPK6, jejíž exprese je vysoká ve většině apikálních části kořenového meristému a v přechodové zóně kořenů *Arabidopsis thaliana* (Taj *et al.*, 2010). MKKK20, známá též jako AIK1 (ABA-insensitive protein kinase), je nezbytnou součástí pro řízení buněčného dělení a prodlužování během primárního vývoje kořenů. Může interagovat fosforylací s MKK3 a MPK18, což naznačuje, že kaskáda MKKK20→MKK3→MPK18 je nutná pro funkci mikrotubulů v kořenech (Wang a Gou, 2020).

V modulu AIK1→MKK5→MPK6 nabývá AIK funkce regulátoru kyseliny abscisové při růstu primárních kořenů a též při stomatální odpovědi (Li *et al.*, 2017). Při regulaci listové senescence je zapojen modul AtMKK9→AtMPK6, kdy u mutantů *mkk9* nebo *mpk6* je senescence opožděná. Další kinasou zapojenou při stárnutí listů je MEKK1, která může

fungovat jako DNA vazebný protein, kdy cílí přímo na transkripční faktor WRKY53 zapojený v signalizaci při senescenci. (Xu a Zhang, 2015).

3.8 MAP kinasy při odpovědi na biotický stres

Při napadení rostliny patogenem dochází k aktivaci vícestupňové obranné reakce rostlinou. Mezi odpovědi na tento biotický stres je zahrnuta tvorba reaktivních forem kyslíku (ROS, reactive oxygen species) posílení buněčné stěny a hypersenzitivní reakce charakterizovaná lokální buněčnou smrtí v místě infekce. Obranné reakce se vyznačují syntézou proteinů a fytoalexinů. S těmito obrannými reakcemi je také spojeno mnoho MAPK kaskád, jak je uvedeno na obrázku č. 6 (Nakagami *et al.*, 2005).

Imunitní systém u rostlin se sestává ze dvou úrovní, tedy imunity spuštěné vzorem (PTI, **p**attern **t**riggered **i**mmunity) a imunity spuštěné efektozem (ETI, **e**ffector **t**riggered **i**mmunity). V PTI rovině jsou prostřednictvím receptorů pro rozpoznání vzorů (PRR, **p**attern **r**ecognition **r**eceptors) v plazmatické membráně rozpoznány molekulární vzory asociované s mikroby (MAMPs, **m**icrobe-**a**ssociated **m**olecular **p**atterns), což vybudí downstream signální transdukční dráhy k obranné reakci a aktivaci obranných genů. Patogeny, jež se adaptovaly na obranné reakce, využívají efektozy, které vnášejí do hostitele, čímž inhibují PTI (Nitta *et al.*, 2020).

Po ošetření *A. thaliana* bakteriálním flagelinem byla pozorována aktivita MPK3, AtMPK4 a MPK6 spolu s jejich upstream kinasami MKK1, MKK4 a MKK5 a jejich upstream kinasou MEKK1 (Obr. 5). Aktivace tohoto modulu je zprostředkována receptorovou kinasou citlivou na flagellin 2 (FLS2, receptor kinase **flagellin-sensitive 2**). Cílem aktivovaných MPK3 a MPK6 jsou WRKY transkripční faktory (Ovečka *et al.*, 2008).

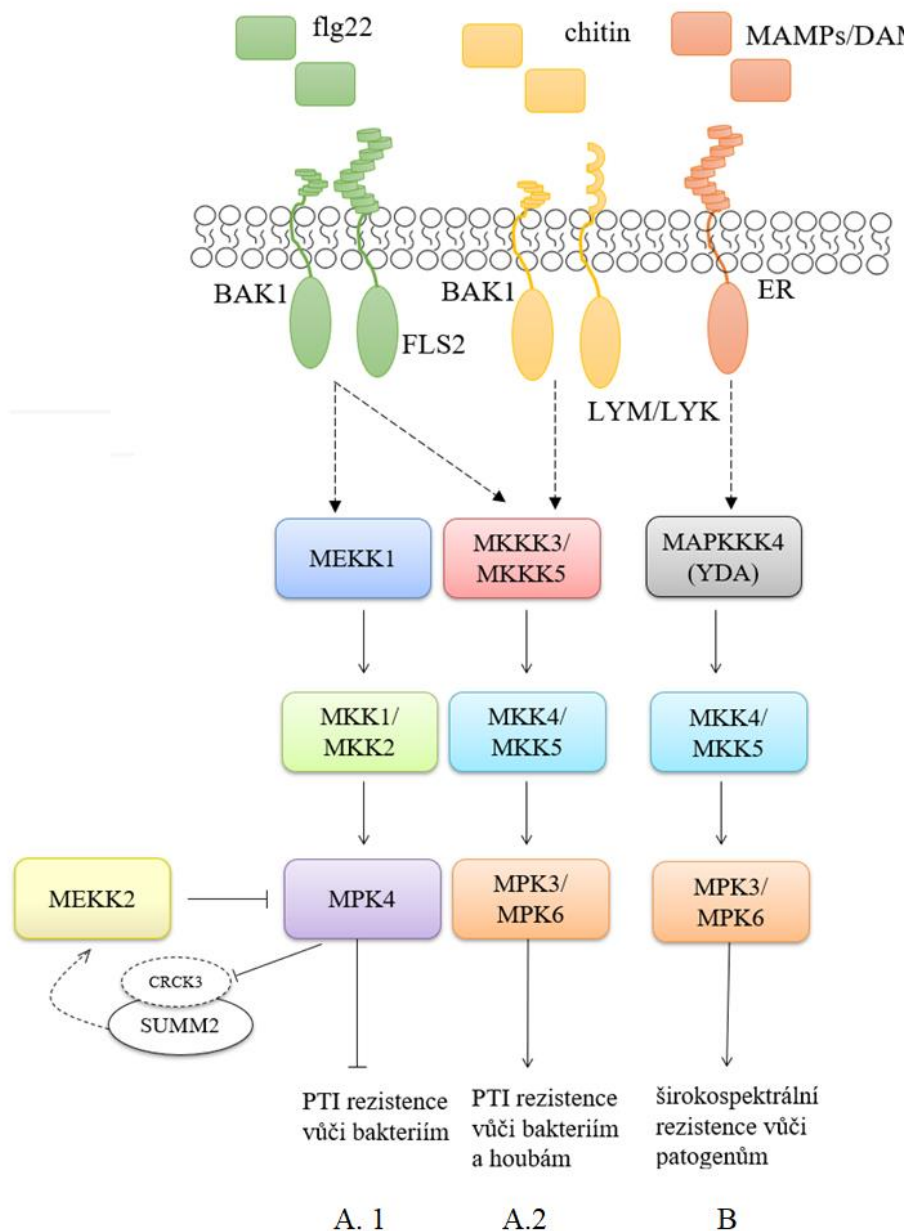
Kaskáda MEKK1→MKK1/MKK2→MPK4 je kontrolována imunitním receptorem supresorem *mkk1* a *mkk2*, 2(SUMM2, **S**uppressor of *mkk1 mkk2*, **2**) patřícím do rodiny NLR proteinů [NOD (nucleotide-binding oligomerization domain) like receptors)]. SUMM2 interaguje s receptorem podobnou cytoplazmatickou kinasou 3 vázající kalmodulin (CRCK3, calmodulin-binding receptor-like cytoplasmatic kinase 3), která je substrátovým proteinem MPK4 (Zhang *et al.*, 2017). Při aktivaci obranných reakcí zprostředkovaných SUMM2 je indukována exprese MEKK2, jež blokuje fosforylaci MPK4 mechanismem přímé vazby na MPK4, aby došlo k inhibici fosforylace upstream kinas MKK1/2. MEKK2 je blízkým paralogem MEKK1, ale i přes svoji příbuznost mají zcela opačné funkce v signalizaci, kdy MEKK2 funguje jako negativní regulátor MAP kinas. (Nitta *et al.*, 2020). Dvojitý mutant *mkk1-1,2 mkk2-1* a mutanty *mekk1*, *mpk4-3* a *mpk4-4* jsou charakterizovány buněčnou smrtí

a upregulací genů spojených s patogenezí a genů zvyšujících odolnost vůči patogenům (Gao *et al.*, 2008; Pitzschke *et al.*, 2009).

Druhá kaskáda je složena ze dvou MKK, tedy MKK4 a MKK5, a dvou MAPK, MPK3 a MPK6. MKK4 a MKK5 jsou aktivovány prostřednictvím MKKK3 nebo MKKK5 (Liu *et al.*, 2022). Oproti předchozí dráze hraje mnohem důležitější roli v imunitě rostlin, a to díky aktivaci exprese obranných genů, biosyntézy fytoalexinu a ethylenu (Bi *et al.*, 2018). Další imunitní dráhou, jež je ovšem nezávislá na obranných reakcích spojených s FLS2 a CERK1 receptory (chitin elicitor receptor kinase 1), rozpoznávající flagelinové a chitinové MAMPs, je dráha ERECTA–YDA. (Sopeña-Torres *et al.*, 2018). Na FLS2 se váže flg22, což je fragment pocházející z bakteriálního flagelinu, hlavním proteinu bakteriálního bičíku (Gómez-Gómez a Boller, 2000).

YODA (YDA, MAPKKK4) je MAP3K kinasou představující první příklad rostlinné kinasy, jejíž konstitutivní aktivace vede k širokospektrální rezistenci vůči patogenům, včetně hub, oomycet a bakterií prostřednictvím různých způsobů infekce. Její specifita tkví ve specifické N-koncové doméně, která obsahuje vícero domnělých fosforylačních míst, na která mohou být cíleny různé kinasy (Sopeña-Torres *et al.*, 2018). Aktivuje tedy imunitu nezávislou na kanonických receptorech pro rozpoznávání vzorů (PRR) a obranných hormonech. Sekvenčně identické kinasy YDA jsou kinasy MKKK3 a MKKK5 a je u nich naznačena funkční redundance. Jejich pravděpodobný funkční antagonismus v imunitních reakcích, ale i v úlohách při vývinu, tkví v konkurenční interakci s MKK5 (Sun *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2022).

Po infekci *Pseudomonas syringae* byla indukována exprese AtMKK3, což naznačuje její roli v patogenní signalizaci. Pro identifikaci cílů AtMKK3 byly provedeny Y2H s různými MPK a jako nejvýznačnější byla zjištěna interakce s AtMPK7, v menší míře s AtMPK1 a AtMPK2 (Dóczi *et al.*, 2007).

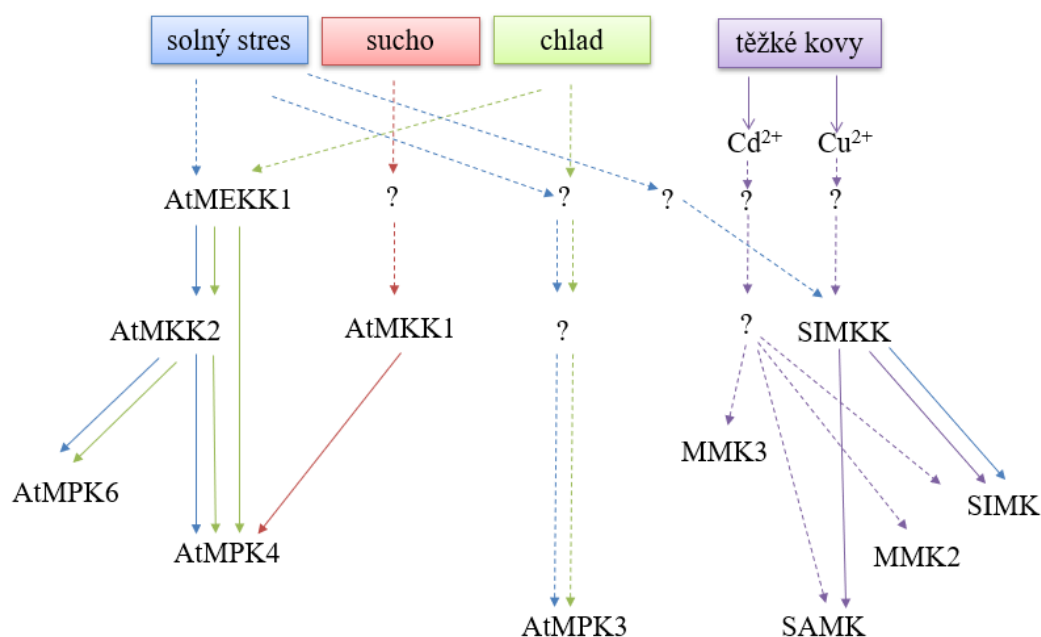


Obrázek 5: Zapojení MAPKs v signalizačních dráhách regulujících rostlinnou imunitu u *A. thaliana*. **A** Imunitní dráhy závislé na odpovědi regulované PRR, které rozeznávají flagelinové a chitinové MAMPs. V těchto dráhách jsou zapojeny dva moduly, tedy **A. 1** MEKK1→MKK1/MKK2→MPK4, kde MEKK2 slouží jako negativní regulátor MPK4 vázící se na MPK4, aby přímo inhiboval jeho fosforylaci upstream MKK. Tato dráha je pod kontrolou imunitního receptoru SUMM2. **A. 2** Dalším modulem MKKK3/MKKK5→MKK4/MKK5→MPK3/MPK6. **B** Imunitní dráha ERECTA-YDA regulující širokospektrální odolnost vůči patogenům sestává z modulu ER→YDA→MKK4/5 → MPK3/6. YDA. DAMPs – damage-associated molecular patterns, molekulární vzory asociované s poraněním; flg22 – peptidový fragment bakteriálního flagelinu; BAK1 – brassinosteroid insensitive 1-associated kinase 1; LYM/LYK – lysin motif receptor-like kinases; SUMM2 – suppressor of *mkk1 mkk2*, 2; CRCK3 – calmodulin-binding receptor-like cytoplasmatic kinase 3 (Upraveno podle Pitzschke *et al.*, 2009, Sopenña-Torres *et al.*, 2018, Nitta *et al.*, 2020 a Liu *et al.*, 2022).

3.9 MAP kinasy při odpovědi na abiotický stres

Pro své přežití si rostliny vyvinuly specifické mechanismy pro odolání abiotického stresu, mezi které řadíme syntézu stresových hormonů, například kyseliny abscisové (ABA) (Zhang *et al.*, 2006). Při vystavení rostlin abiotickému stresu (chlad, dotyk, salinita, UV záření, komunikují (Obr. 6). Pokud různé signální cesty sdílí jeden nebo více intermediátů, používá se termín cross-talk, pro který je jedním z největších důkazů právě signalizace během abiotického stresu prostřednictvím MAPK drah u rostlin (Sinha *et al.*, 2011).

U *A. thaliana* tvoří nejucelenější funkční kaskádu při abiotickém stresu modul MEKK1→MKK2→MPK4/MPK6 (Danquah *et al.*, 2014). Při reakci na stres z chladu, dotyku a slanosti u *A. thaliana* byla prokázána zvýšená exprese MPK3. Nízkou teplotou, suchem, osmolytickým stresem a poraněním byly též aktivovány MAPK4 a MAPK6, avšak tyto MAPK se podílejí na odlišných signálních drahách reagujících na tyto environmentální střezy. V signalizaci abiotického stresu byla též potvrzena úloha MKK1, která je aktivována mnoha abiotickými střezy (Zhang *et al.*, 2006).



Obrázek 6 : Schematické znázornění drah řízených MAP kinasami v reakci na vybrané abiotické střezy u *A. thaliana* a *M. sativa*. Plné šipky značí potvrzené interakce a přerušované předpokládané interakce. Otazníky zastupují neznámé komponenty MAP kaskád. Upraveno podle Cardinale *et al.*, 2002 a Sinha *et al.*, 2011.

3.9.1 MAP kinasy v odpovědi na osmotický stres

Hyperosmotický stres má za následek změny v objemu a turgorovém tlaku rostlinné buňky. Reakcí buněk na tento stres je produkce stabilizačních osmolytů, které umožňují zvýšit toleranci k soli. Předpokládá se, že jako receptor pro signalizaci osmotického stresu v rostlinách figuruje *Arabidopsis thaliana* histidinkinasa **1** (AtHK1). Transkript této kinasy vykazuje akumulaci za vysoké či nízké osmolarity (Jonak *et al.*, 2002). U *A. thaliana* dochází za vysoké salinity k akumulaci MEKK1, u které byla prokázána interakce s AtMKK2. Tento solí indukovaný modul poté aktivuje dvě různé MAPK, AtMPK4 a AtMPK6 (Sharma *et al.*, 2020).

U dvojitého mutanta *mk3 mpk6* je snížena tolerance vůči soli (Zhang a Zhang, 2022). V reakci na osmotický stres byla identifikována role MKKK20 jako regulátoru aktivity MPK6, kdy mutanti *mkkk20* vykazují citlivost na vysokou koncentraci soli a vyšší ztráty vody na rozdíl od divokého typu (Kim *et al.*, 2012). Při signalizaci osmotického stresu hrají roli také SIMKK a SIMKK ve vojtěšce, u tabáku jsou zapojeny NtMEK2, SIPK a poraněním indukovatelná protein kinasa (WIPK, wound-inducible protein kinase) (Taj *et al.*, 2010).

3.9.2 MAP kinasy v odpovědi na teplotní stres

Chlad a teplo jsou spojeny se strukturálními změnami v plazmatické membráně, která prostřednictvím cytoskeletu převede signál toku vápenatých iontů a CDPK (calcium dependent protein kinase, kalcium dependentní protein kinasa) do míst aktivace kaskád MAPK (Song *et al.*, 2019). Při teple je zvýšena tekutost membrány, zatímco při chladu jsou více rigidní (Mittler *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2003)

V reakci na chlad u *A. thaliana* hrají podstatnou roli MPK4 a MPK6. MPK4 vykazuje nejvyšší aktivitu po 60 minutách od počátečního chladového impulzu, kdežto aktivita MPK6 stoupá rychlejším tempem a dosahuje svého vrcholu již během 10 minut. Dalším důležitým signalizačním enzymem u *A. thaliana*, který je zapojen v reakci na chladový stres, je MKK2 fungující na principu jeho aktivace prostřednictvím MEKK1 (Smékalová *et al.*, 2014). Pomocí Y2H a testu kinasové aktivity bylo zjištěno, že MPK4 a MPK6 jsou přímými a specifickými substráty MKK2, čímž byla potvrzena funkce uceleného modulu MEKK1 → MKK2 → MPK4/6 (Sinha *et al.*, 2011). MEKK1 může fungovat ve dvou signalizačních režimech, v prvním MEKK1 přímo aktivuje MPK4, v druhém využívá MKK2 přenášející fosfát na MPK4 a MPK6 (Smékalová *et al.*, 2014).

U *M. sativa* byly zjištěny 2 druhy MAPK, které hrají roli v odpovědi na teplotu, konkrétně SAMK a HAMK (**heat activated MAP kinase**, teplem aktivovaná MAP kinasa). Oba ze zmíněných proteinů nevyžadují konkrétní teplotu, nýbrž relativní teplotní posun. Bylo zjištěno, že k aktivaci SAMK dochází při přesunu ze 37 °C do 25 °C, naopak HAMK je aktivována při přemístění z 4°C na 25°C (Sangwan a Dhindsa, 2002).

3.9.3 MAP kinasy v odpovědi na stres způsobený těžkými kovy

Pro růst, metabolismus a vývoj rostlin jsou sice těžké kovy nezbytné, avšak při vyšších koncentracích jsou vysoce toxické, čímž mohou způsobit vážná poškození buněk v důsledku blokace funkčních skupin nebo vytěsněním esenciálních kovů z biomolekul. Taktéž je prokázána toxicita při autooxidaci redoxně aktivních těžkých kovů, kdy jsou Fentonovou reakcí produkovány ROS (Nakagami *et al.*, 2005). Rostliny v reakci na stres způsobený těžkými kovy indukují různé MAPK dráhy. Při vystavení *M. sativa* vysokým hladinám Cu nebo Cd ve formě iontů jsou do odpovědi zapojeny SIMK, MMK2, MMK3 a SAMK. Tyto MAPK jsou rychle aktivovány měďnatými ionty, avšak kademnaté ionty způsobují opoždění v jejich aktivaci. SIMKK aktivuje SIMK a SAMK pouze v přítomnosti měďnatých iontů, nikoliv však kademnatých (Song *et al.*, 2019). U *A. thaliana* Cd způsobuje akumulaci ROS, což stimuluje aktivaci MPK3 a MPK6 zejména v kořenech (Liu *et al.*, 2010; Smékalová *et al.*, 2014).

3.10 MAP kinasy v tolici *Medicago truncatula*

U tolice *M. truncatula* je znám modul zprostředkovaný stresovou signalizací MtMKK5→MtMPK3/6, který potlačuje ranou tvorbu symbiotických nodulů v kořenech. Nadměrná exprese MtMKK5 stimuluje stresové a obranné signální dráhy, avšak snižuje vývoj nodulů v kořenech tím, že přímo aktivuje MtMPK3/6, které následně interagují s časnými transkripčními faktory souvisejícími s nodulací jako je Pro nodulaci nezbytný ethylen-responzivní faktor 1 (ERN1, **E**thylen response factor (ERF) required for **n**odulation **1**) a Nodulační signální dráha 1 (NSP1, **N**odulation signalling **p**athway **1**) (Smith *et al.*, 2005; Soyano a Hayashi, 2014; Ryu *et al.*, 2017). MtMPK3 i MtMPK6 jsou lokalizovány v cytosolu, jádře a membránách a jejich ortology v *A. thaliana* jsou AtMPK3 pro MtMPK3 a AtMPK6 pro MtMPK6 (Bigeard a Hirt, 2018).

Zásadní roli v růstu a vývoji rostliny hraje MtMAPKK4. Heterozygotní mutanti *mapkk4^{+/-}* se vyznačují opožděným růstem, chlorózou a sníženými počtem infekčních vláken a nodulů. Byla identifikována fyzická interakce mezi MtMAPKK4 a MtMAPK3/6. Tyto proteiny jsou exprimovány v téměř všech tkáních jako jsou listy, kořeny, květy, noduly

a lusky, ve kterých ovšem nebyl detekován MtMAPKK4 (Chen *et al.*, 2017). Pomocí BLAST bylo provedeno porovnání sekvencí pro určení genů MAPKK v *M. truncatula* použitím 80 genů MAPKKK *Arabidopsis*, čímž bylo identifikováno 73 genů popsanych jako MtMAPKKK01–73, které byly následně rozděleny do tří podrodin MEKK, RAF (**R**apidly **A**ccelerated **F**ibrosarcoma) a ZIK (**Z**R1-interacting **k**inase). Při reakci na abiotické stresy jsou například MtMAPKKK66, 71 a 72 indukovány při stresu z chladu, MtMAPKKK33 při solném stresu (Li *et al.*, 2016).

3.11 MAP kinasy v rýži seté (*Oriza sativa* L.)

OsBWMK1 (*Oriza sativa* **b**last-and **w**ound-induced **M**AP **k**inase **1**, poraněním indukovaná MAP kinasa 1, OsMPK12) představuje MAPK, která je lokalizovaná v jádře a fosforyluje transkripční faktor OsEREBP1 (*Oriza* **e**thylene-**r**esponsive **e**lement-**b**inding **p**rotein **1**, ethylen responzivní vazebný protein 1), který se váže na element GCC boxu několika základních promotorů genů souvisejících s patogenezi. Na základě porovnávání sekvencí aminokyselin je OsBWMK1 řazena do rodiny zahrnující AtMPK8 a AtMPK9 v *A. thaliana* a TDY1, MAPK v *M. sativa*. Jelikož bylo zjištěno, že se TDY1 exprimuje v listovém mezofylu v oblastech mechanického poranění a proniknutí patogenů, je naznačena možnost zapojení při signalizaci poranění. Jejím ortologem je AtMPK6 v *A. thaliana* (Cheong *et al.*, 2003; Singh a Jwa, 2013).

Transkripční analýzy prokazují indukci MAPK genu rýže *OsBWMK1* po 4 hodinách od infekce houbovým patogenem *Magnaporthe grisea* (původce choroby rýže „rice blast“) a 30 minut po mechanickém poranění (Agrawal *et al.*, 2003). U vytvořených transgenních rostlin tabáku (*Nicotiana tabacum*), jenž konstitutivně exprimují BWMK1 pod kontrolou promotoru genu viru mozaiky květáku, byly zvýšené hladiny transkriptů všech genů souvisejících s patogenezi oproti rostlinám divokého typu. Transgenní rostliny byly schopné lépe odolat houbovým a bakteriálním patogenům (Cheong *et al.*, 2003).

U OsMAPK3 (OsMPK5, OsBIMK – *Oriza sativa* **b**enzothiadiazole induced **M**APK**1**, OsMAP1, OsMSRMK2 – *Oryza sativa* **m**ultiple **s**tress **r**esponsive **M**AP **k**inase **2**) byla charakterizována kinasová aktivita indukovaná mnoha abiotickými stresy zahrnujícími sucho, solný stres, chlad i zavodnění. U rostlin, které nadměrně exprimují OsMAPK3, je zjištěna zvýšená odolnost vůči těmto stresovým podnětům. Také se podílí na rezistenci vůči půdní bakterii *Burkholderia glumae*. Jejími funkčními ortology jsou AtMPK3 v *Arabidopsis* a WIPK v tabáku (Chen *et al.*, 2021; Yoo *et al.*, 2014). Byly identifikovány interakce mezi OsMPK5 a dvěma MAPKK, konkrétně OsMEK1 a OsMEK6 (Singh a Jwa, 2013).

OsMAPK7 (OsMSRMK3) je další MAPK zapojenou při regulaci multiplicitních stresů, přičemž exprimována je konstitutivně ve zdravých listech. Po 15 minutách od různých podnětů (poranění, sůl, těžké kovy, jasmonová kyselina, salicylová kyselina, abscisová, ethylen, peroxid vodíků atd.) dochází ke zvýšení hladin jejích transkriptů. Oproti OsBWMK1 a OsMSRMK2 je však indukce zraněním a kyselinou jasmonovou mnohem slabší. Zajímavé je, že sucho, teplotní stresy a UV-C záření výrazně snižují konstitutivní hladinu mRNA této kinasy (Agrawal *et al.*, 2003).

Během infekce *Xanthomonas oryzae* dochází k indukci OsMPK7 a OsMKK3, její upstream kinasu, se kterou fyzicky interaguje. Při jednotlivé i kombinované nadměrné expresi těchto proteinů dochází k inhibici symptomů onemocnění způsobených *X. oryzae*. Cílem dráhy OsMKK3→OsMPK7 je OsWRKY30 (Jalmi a Sinha, 2016).

Další MAPK identifikovanou v rýži je OsMPK1. Je aktivována během 10 minut po poranění a také při houbové infekci. Funkčními ortology u OsMPK1 (OsSIPK, OsMPK6) jsou SIPK v *Nicotiana benthamiana* a AtMPK6 v *Arabidopsis* (Yoo *et al.*, 2014). U OsMPK1 bylo prokázáno doposud největší množství interagujících MAPKK, konkrétně se jedná o OsMEK1, OsMEK2, OsMEK3, OsMWK6, OsMEK7b a OsMEK8a (Singh a Jwa, 2013).

Salinitou je indukována kinasová aktivita OsMAPKK1, která následně aktivuje OsMAPK4, tedy kaskáda OsMAPKKK63→OsMAPKK1→OsMAPK4 pozitivně napomáhá toleranci rýže vůči solnému stresu (Wang *et al.*, 2014; Na *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2021). Architekturu květenství u rýže reguluje kaskáda OsMKKK10→OsMKK4→OsMPK6 (Guo *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2018; Guo *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2021). OsMKK4 a OsMKK6 mají vliv na vývoj semen, kdy mutace v OsMKK4 a OsMPK6 způsobují menší velikost zrna (Zhang a Zhang, 2022).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

- Pro fenotypové analýzy byla použita Tolice vojtěška (*Medicago sativa* L.) linií RSY, *35S::GFP:SIMK* a *35S::SIMKKi*, rostoucí v hlíně ve skleníku
- Pro rozmnožení transgenních rostlin somatickou embryogenezi byla použita Tolice vojtěška (*Medicago sativa* L.) transgenní linie *35S:tagRFP-TUA6*. Tato linie vznikla transformací konstruktů *35S:tagRFP-TUA6* v plazmidu pBI121Hm (opublikovaný konstrukt; Murata *et al.*, 2013) do *M. sativa* divokého typu RSY vykonanou školitelem. Materiál pro somatickou embryogenezi byl odebrán z rostlin ve fytotronu (*in vivo*, 70% vlhkost vzduchu, teplota 21 °C, světelný režim 16 hodin/8 hodin, osvětlení 60 až 80 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)
- Pro transientní transformaci byly použity *Agrobacterium tumefaciens* kmen GV3101, nesoucí tyto konstrukty:
 - *35S::GFP:SIMK* (opublikovaný konstrukt; Hrbáčková *et al.*, 2021) v plazmidu pB7m34GW,0
 - *35S::tagRFP:SIMKK* (neopublikovaný konstrukt; poskytnuté paní Mgr. Miroslavou Hrbáčkovou, Ph.D.) v plazmidu pB7m34GW,0
 - *35S::mRFP:PRKK* (poskytnuto panem Mgr. Jiřím Sojkou) v plazmidu pGWB454
 - konstrukt *P19* využívaný k supresi RNAi (poskytnuto školitelem)

Selekční antibiotika byla přidána podle tabulky č. 1.

Tabulka 1: Aplikovaná selekční antibiotika pro používané konstrukty. Selekční antibiotika: KAN – kanamycin, SPE – spektinomycin a RIF – rifampicin

Konstrukt	Selekční antibiotika	Zásobní koncentrace ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$)	Finální koncentrace ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)
<i>P19</i>	KAN/RIF	50/50	25/100
<i>35S::GFP:SIMK</i>	SPE/RIF	50/50	100/100
<i>35S::tagRFP:SIMKK</i>	SPE/RIF	50/50	100/100
<i>35S::mRFP:PRKK</i>	SPE/RIF	50/50	100/100

- Pro transientní transformaci s *A. tumefaciens* byly použity rostliny *Nicotiana benthamiana* (cca 6 týdnů staré optimálně vyvinuté rostliny)

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

Použité chemikálie

- 70% ethanol (Penta, kat. č. 280311)
- 10% hypochlorid sodný (Sigma-Aldrich, kat. č. 71696)
- Acetosyringon
- Aminostock (Duchefa biochemie)
- Chlorid hořečnatý (Sigma-Aldrich, kat. č. M8266)
- Destilovaná voda
- Dusičnan draselný (KNO_3) (Sigma-Aldrich, kat. č. P6030)
- Fosfátový pufr (PBS buffer)
- Gamborg B5 basal salt mixture (Duchefa Biochemie, kat. č. G0209.0050)
- Gamborg B5 medium vitamin mixture (Duchefa Biochemie, kat. č. 60415.0250)
- Gellan Gum (Alfa Aesar, kat. č. Y28C036)
- Kanamycin (KAN)
- Kinetin (KIN) (Duchefa Biochemie)
- Kyselina dichlorfenoxyoctová (2,4-D) (Duchefa Biochemie, kat. č. D0911.0100)
- L-Proline (Sigma-Aldrich, kat. č. 81709)
- LB (lysogeny broth) prášek (MO BIO laboratories, kat. č. LB10L21)
- LB (lysogeny broth) prášek s agarem (Sigma Aldrich, kat. č. L3147)
- MES (Sigma-Aldrich, kat. č. M3671)
- MiliQ voda (připravená Simplicity Water Purification Systém, Merk)
- Murashige and Skoog (MS) basal salt mixture (Dufeta Biochemie, kat. č. M0221.0050)
- M40-Inositol (Sigma-Aldrich)
- Rifampicin (RIF)
- Sacharóza ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$) (Sigma-Aldrich)
- Síran hořečnatý ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) (Sigma-Aldrich, kat. č. 63136)
- Spektinomycin (SPE)
- Toluidinová modř (Sigma-Aldrich, kat. č. 89640)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, kat. č. P1379)

Použité roztoky a jejich příprava

- Sterilizační roztok: smíchat 4 ml 10% hypochloridu a doplnit 36 ml MiliQ vody a dále přidat 40 µl Tweeni 20.
- B5H médium (na přípravu 1 l): naplnit laboratorní kádinku do 3/4 MiliQ vodou; přidat 30 g sacharózy; 0,5 g L-prolin; 3,1 g Gamborg B5 basal; 0,5 g KNO₃; 0,25 g MgSO₄ · 7 H₂O; rozmíchat na elektromagnetické míchačce; přidat 4,5 g Gellan Gum; doplnit MiliQ vodou do 1 l a upravit pH na 5,7 pomocí 1M KOH a 10M KOH; sterilizovat autoklávováním a ve sterilním prostředí přidat 29 ml Aminostock (finální koncentrace 29 ml/l), 1 ml Gambor vitamíny (finální koncentrace 1 ml/l), 1 ml kinetin (finální koncentrace 1 ml/l) a 1 ml kyseliny dichlorfenoxyoctové (finální koncentrace 1 ml/l); rozlít do Petriho misek a nechat ztuhnout.
- B50 médium (na přípravu 1 l): naplnit laboratorní kádinku do 3/4 MiliQ vodou; přidat 30 g sacharózy; 0,5 g L-prolin; 3,1 g Gamborg B5 basal; 0,5 g KNO₃; 0,25 g MgSO₄ · 7 H₂O; rozmíchat na elektromagnetické míchačce; přidat 4,5 g Gellan Gum; doplnit MiliQ vodou do 1 l a upravit pH na 5,7 pomocí 1M KOH a 10M KOH; sterilizovat autoklávováním a ve sterilním prostředí přidat 29 ml Aminostock (finální koncentrace 1 ml/l) a 1 ml Gambor vitamíny (finální koncentrace 1 ml/l); rozlít do Petriho misek a nechat ztuhnout.
- MMS médium (na přípravu 1 l): naplnit laboratorní kádinku do 3/4 MiliQ vodou; přidat 4,3 g MS basal salt mixture; 0,1 g M40-inositolu; 30 g sacharózy; rozmíchat na elektromagnetické míchačce; přidat 4,5 g Gellan Gum; doplnit MiliQ vodou do 1 l a upravit pH na 5,7 pomocí 1M KOH a 10M KOH; sterilizovat autoklávováním; rozlít do Petriho misek a nechat ztuhnout.
- MS médium: (na přípravu 1 l): naplnit laboratorní kádinku do 3/4 MiliQ vodou; přidat 4,3 g MS basal salt mixture; 30 g sacharóza; rozmíchat na elektromagnetické míchačce; přidat 4,5 g Gellan Gum; doplnit MiliQ vodou do 1 l a upravit pH na 5,7 pomocí 1M KOH a 10M KOH; sterilizovat autoklávováním; rozlít do Petriho misek nebo hranatých či válcových nádob a nechat ztuhnout.
- LB médium, tuhé (na přípravu 1 l): 40 g LB prášku s agarem rozpustit v 1 l MiliQ vody; sterilizovat autoklávováním.
- LB médium, tekuté (na přípravu 1 l): 25 g LB prášku rozpustit v 1 l MiliQ vody; upravit pH na 7,2 pomocí 1M KOH; sterilizovat autoklávováním.
- Infiltrační médium (na přípravu 50 ml): Ve sterilním prostředí ke 49 ml MiliQ vody přidat 0,5 ml 1M MES pH 5,6; 0,5 ml 1M MgCl₂ a 50 µl acetosyringon (v DMSO).

- 0,1% toluidinová modrá: Navážit 0,1 g barviva v prášku a rozpustit v 10 ml PBS.

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- Analytické váhy XA 110/2X (RADWAG)
- Autokláv Sterrivap HP IL (MMM Group)
- Automatické pipety (Eppendorf)
- Centrifuga Allegra 64 R (Beckman Coulter)
- Elektromagnetická míchačka MSH-420 (BOECO)
- Epifluorescenční mikroskop Axio Imager.M2 (Zeiss)
- Fytotronová komora (Weiss Gallenkamp)
- Hlubokomrazicí box MDF-U500VX-PE (Panasonic)
- Image Scanner III (GE Healthcare)
- Laminární box (Merci)
- Mikrovlnná trouba MHE21 (HITACHI)
- Mraznička LIE G 5216 513L (Liebherr Comfort)
- pH metr PC 2700 (Eutech Instruments)
- Spektrofotometr Infinite M Nano (Tecan)
- Stereo zoom mikroskop Axio Zoom.V16 (Zeiss)
- Výrobník deionizované vody Simplicity water purification system (Merck Millipore)

4.4 Seznam použitých serverů a databází

- Databáze Agris
- Databáze TAIR
- Databáze SUBA
- Databáze IntAct EMBL-EBI
- Databáze UniProt
- Server NCBI
- Server SWISS-MODEL

4.5 Seznam použitých programů

- DOG 2.0
- ImageJ 1.53t
- Zen 3.5

4.6 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.6.1 *In silico* analýzy

In silico analýzy byly provedeny u kinas AtMKK5 (locus tag AT3G21220; accession number NM_001338511.1, NP_001319606.1) a AtMKK1 (locus tag AT4G26070; accession number NM_202890.2, NP_974619.1) metodologicky podle bakalářské práce Malíšková 2021 (kde byly studovány AtMKK4 a AtMKK2). Navíce bylo provedeno studium mutagenese, k čemuž byla využívána databáze UniProt (Ref. 10). Do vyhledávacího okna je napsán název proteinu, který chceme studovat. Po vybrání požadovaného proteinu v sekci Features lze najít bodové mutace (mutagenesis). Tyto bodové mutace byly přidány do 2D a 3D modelu s doménami u proteinů AtMKK5 a AtMKK1 pomocí programu DOG. 2. 0 a pomocí serveru SWISS-MODEL (Ref. 9). Navíc byla databáze UniProt využita pro získání 3D obrázku se strukturami α -helix a β -skládaný list, kdy v sekci Structure vygenerujeme obrázek 3D struktury proteinu a vyznačíme Ser/Thr sekvence (Obr. 10, Obr. 14).

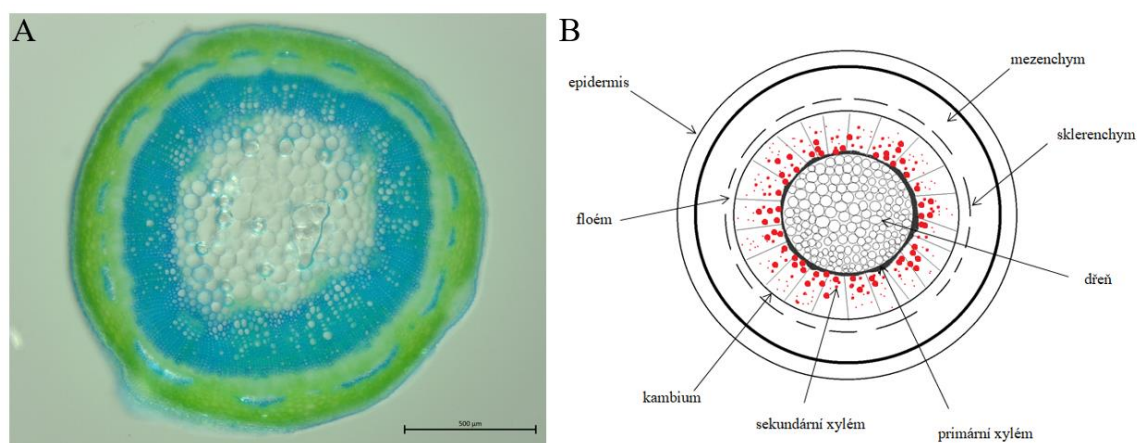
4.6.2 Rozmnožení transgenní linie *M. sativa* metodou somatické embryogeneze

Nejdříve jsou odebrány zelené a zdravé listy z mladých výhonků rostliny. Ty jsou následně umístěny do 50 ml Falkonovy zkumavky, do které se přidá 30 ml kohoutkové vody, aby nedocházelo k vadnutí rostlin. Ve sterilním prostředí laminárního boxu je prováděna sterilizace, kdy jsou listy nejdříve sterilizovány po dobu 10 s v 70% ethanolu a poté po dobu 90 s ve sterilizačním roztoku. Listy se vymyjí od zbytků sterilizačního roztoku sterilní destilovanou vodou alespoň třikrát po dobu tří minut. Listy jsou přemístěny na sterilní filtrační papír, kde jsou pomocí sterilního skalpelu odřezány z listů jednotlivé segmenty následně označované jako explantáty, přičemž z jednoho listu vzniknou dva až tři. Získané explantáty jsou přeneseny na povrch Petriho misky s obsahem B5H média.

Po dobu tří týdnů jsou Petriho misky inkubovány ve fytotronu, kde dochází k indikaci tvorby kalusů. Kalusy jsou následně přeneseny na povrch B50 média, kde dochází k tvorbě embryí. Po čtyřech týdnech jsou vzniklá embrya přenesena na misky obsahující MMS médium. Postupně se formují výhonky a kořeny. Somatická embrya s narostlými kořínky se přesadí do misek s MS médiem. Veškerá manipulace s listy, kalusy i embryi probíhá ve sterilních podmínkách laminárního boxu. Získané rostliny jsou udržovány ve fytotronu a lze je využít pro mikroskopická pozorování cytoskeletárního markeru tagRFP-TUA6. Celý postup vychází z protokolu Samac a Austin-Phillips, 2006.

4.6.3 Fenotypové analýzy

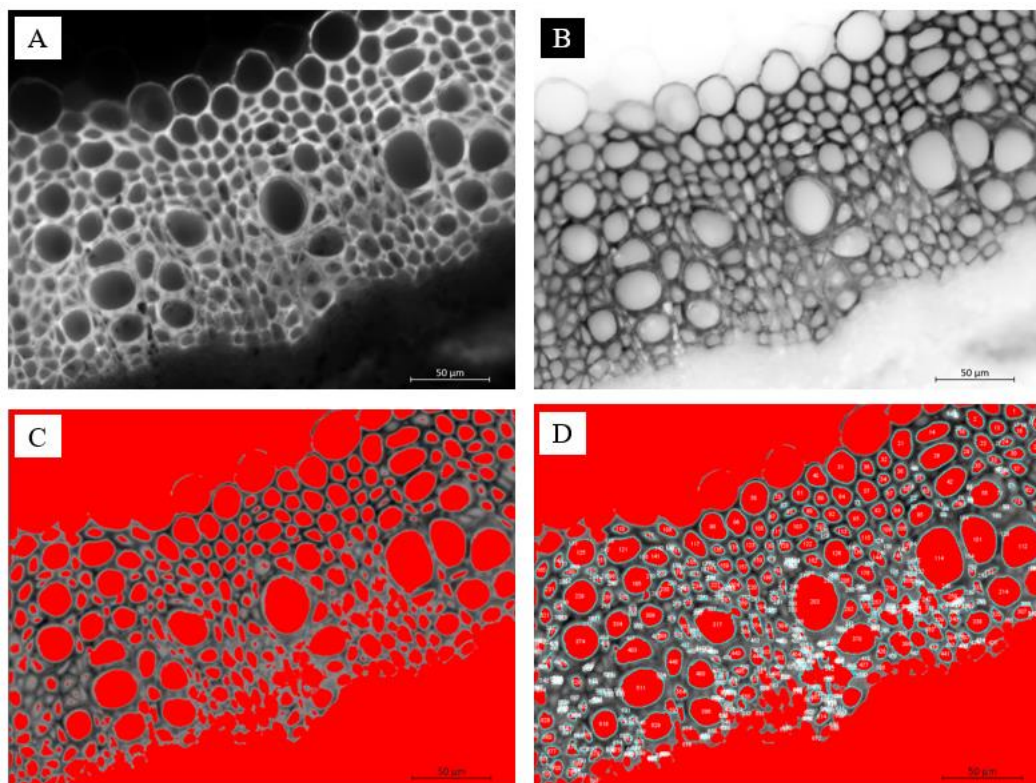
Fenotypovou analýzou je měření velikosti ploch buněk xylému, schematicky zobrazených jako obsah červených ploch na obrázku č. 7, B, kdy jsou měřené xylémové buňky studovaných linií (RSY, GFP-SIMK a SIMKKi) *M. sativa*. Pro experiment byly náhodně vybrány tři rostliny od každé linie. Pomocí žiletky byly zhotoveny transversální řezy stonku rostliny. Získané řezy byly odebrány pinzetou do kohoutkové vody v Petriho misce. Následně byly vyselektovány nejlepší a nepoškozené řezy, které byly přemístěny do kapky barviva toluidinové modři (0,05% w/v). Po uplynutí doby potřebné pro barvení (cca 1 min) byly řezy přemístěny do kapky vody, kde byly odbarveny. Odbarvování bylo prováděno, dokud se voda nepřestala zabarvovat. Řezy byly přeneseny do kapky vody na podložním skle a následně byly přikryty sklem krycím.



Obrázek 7: Transversální řez stonkem *M. sativa*. **A** Linie RSY, barveno toluidinovou modří. Pozorováno mikroskopem Axio Zoom.V16. Objektiv PlanNeoFLuar Z 1,0x. Viditelné světlo Měřítka 500 µm. **B** Schematické znázornění řezu, kde červené plochy zjednodušeně znázorňují měřené buňky.

Získané preparáty byly mikroskopovány a fotografovány pod epifluorescenčním mikroskopem ZEISS Axio Imager.M2 (objektiv LD Plan-Neofluar 20x/0,4 Korr M27). Využíván byl kanál DAPI (excitační vlnová délka 353, emisní vlnová délka 465 nm). Pro zvýšení kontrastu pro následné měření byla využita funkce pseudo coloring, kdy byla použita bílá barva, následně bylo přidáno měřítko (Obr. 8, A). Obrázek byl exportován do JPG a otevřen v programu ImageJ, kde byl převeden do negativu (cesta Image→Color→Invert LUTs) (Obr. 8, B). Bylo nastaveno měřítko pro získání přesné jednotky měření (cesta Analyze→Set Scale). Pro detekci hran v obrázku bylo využito metody prahování (thresholding), kdy jsou prahovány barevné složky pixelů obrazu (cesta Image→Adjust→Color Threshold) (Obr. 8, C). Když byl obrázek co nejpřesněji vyprahován, bylo spuštěno měření buněk (cesta Analyze→Analyze Particles) (Obr. 8, D).

Získaná data jsou převedena do programu Excel, kde jsou seřazena sestupně podle velikosti plochy (Area) a malé plochy vzniklé chybou měření programu jsou vyřazeny ze statistického vzorku (stanovení dolní hranice thresholdu). Také je na základě obrázků provedena kontrola nesprávně prahovaných buněk, které jsou rovněž ze statistiky vyřazeny. Z každého obrázku je tedy vybrán soubor reprezentativních dat o velikosti N, která jsou vyhodnocena.



Obrázek 8: Postup metody automatizovaného měření xylémových buněk stonku *M. sativa*. Linie GFP-SIMK. **A** Xylémové buňky pod epifluorescenčním mikroskopem ZEISS Axio Imager.M2; objektiv LD Plan-Neofluar 20x/0,4 Korr M27; kanál DAPI; pseudo coloring bílá. **B** Převedení do negativu v programu ImageJ. **C** Práhování (thresholding) v programu ImageJ. **D** Měření buněk (analýza particles) v programu ImageJ. **A-D** měřítko 50 µm.

4.6.4 Transientní (ko-)transformace listů *Nicotiana benthamiana* s fluorescenčně značenými MAPK

Zásobní bakteriální kultura *A. tumefaciens* obsahující studované konstrukty v plazmidu, ve kterém se nachází gen rezistence specifický pro určitý konstrukt, byla bakteriologickou kličkou naočkována na povrch tuhého LB média s příslušným selekčním antibiotikem (viz 4.1). Po dobu 2 nocí v inkubátoru (temné prostředí, 28°C) došlo k nárustu kolonií bakterií. Pomocí párátko byl umístěn stěr single kolonie do 50 ml Falkonovy zkumavky s 10 ml tekutého LB média a příslušnými selekčními antibiotiky. Zkumavky byly přemístěny na třepáčku, kde byly při teplotě 28°C a 180 RPM ponechány ke kultivaci přes noc.

Následující den byly zkumavky s narostlými bakteriemi centrifugovány při 4°C po dobu 10 minut. Získaný pelet byl resuspendován v 1 ml infiltračního média a byla provedena centrifugace za stejných podmínek. Pelet byl opět resuspendován v 1 ml infiltračního média a směs byla ponechána k inkubaci po dobu 2 hodin. Pomocí spektrofotometru byla při 600 nm (OD_{600}) změřena optická hustota 10x zředěných kultur získaných smísením vždy 50 μ l koncentrované kultury a 450 μ l infiltračního média. Jako blank bylo do spektrofotometrické kyvety pipetováno 500 μ l infiltračního média. Získané hodnoty sloužily pro výpočet objemu bakteriální kultury, kterou bylo nutno pipetovat do celkového objemu 2ml mikrozkušavky tak, aby výsledná hodnota OD_{600} byla 0,7. Ke spočtenému množství bakteriální kultury byla mikrozkušavka doplněna do objemu 2 ml infiltračním médiem. Pokud bylo kokultivováno více kultur, byly sečteny dílčí objemy kultur a mikrozkušavka byla následně doplněna infiltračním médiem do objemu 2 ml. Použité kombinace studovaných konstruktů jsou uvedeny v tabulce č. 2.

Tabulka 2: Použité kombinace konstruktů při transientní transformaci

Kombinace	Konstrukty použité pro kombinaci
1	<i>P19</i>
2	<i>SIMK+P19</i>
3	<i>SIMKK+P19</i>
4	<i>PRKK+P19</i>
5	<i>SIMK+SIMKK+P19</i>
6	<i>SIMK+PRKK+P19</i>

Po dvouhodinové inkubaci se kultura pomocí plastové injekční stříkačky infiltruje vtlačáním přes stomata do spodní strany listů do předem zalitých rostlin *N. benthamiana* a zóna infiltrace je označena.

Po 3 dnech od provedení transformace (3 DAT, 3 days after transformation) byl připraven mikroskopický preparát odštíhnutím trojúhelníkovitého útvaru s oblastí zóny infiltrace na špičce trojúhelníku a poté přemístěním abaxiální stranou nahoru na podložní sklíčko. Na list byla napipetována kapka kohoutkové vody a preparát byl překryt krycím sklem, které bylo následně přelepeno parafilmem. Preparáty byly pozorovány pod epifluorescenčním mikroskopem.

4.6.5 Sledování fenotypu transientně transformovaných rostlin *Nicotiana*

benthamiana

V intervalech 7 DAT, 14 DAT a 21 DAT byly mobilním telefonem fotografovány transformované listy *N. benthamiana* se všemi použitými kombinacemi studovaných konstruktů. Na listech transformovaných rostlin byly sledovány projevy chlorózy a nekrózy.

5 VÝSLEDKY

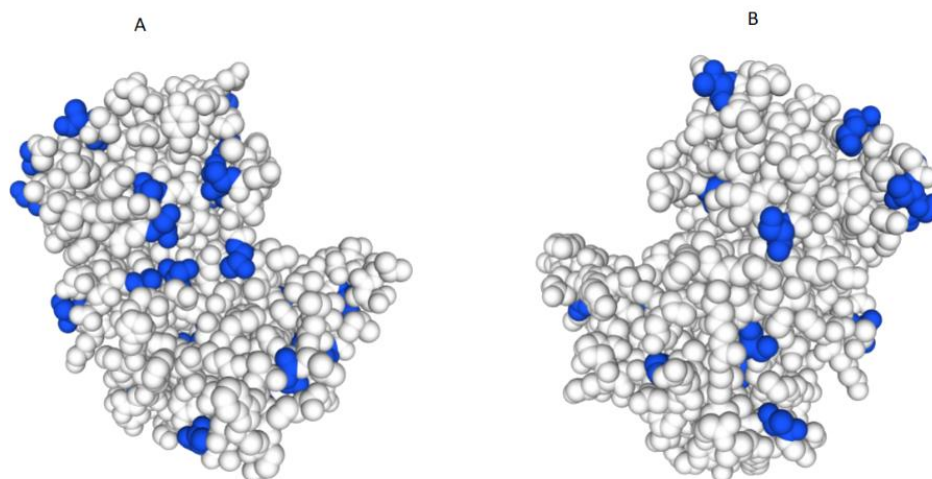
5.1 *In silico* analýzy AtMKK5 a AtMKK1

Porovnáním sekvencí proteinů pomocí nástroje BlastP a následně také porovnáním kódující sekvence nukleotidů za využití nástroje BlastN bylo zjištěno, že zatímco protein AtMKK5 nacházející se u *A. thaliana* je spolu s AtMKK4 ortologem MsSIMKK u *M. sativa*, protein AtMKK1 je spolu s AtMKK2 ortologem MsPRKK (Mališková, 2021). Jelikož je *A. thaliana* modelovým organismem, pro který nacházíme větší množstvím dostupných dat, bylo využito vzájemné homologie proteinů AtMKK1 a AtMKK5 pro studium potenciálních vlastností SIMK a PRKK.

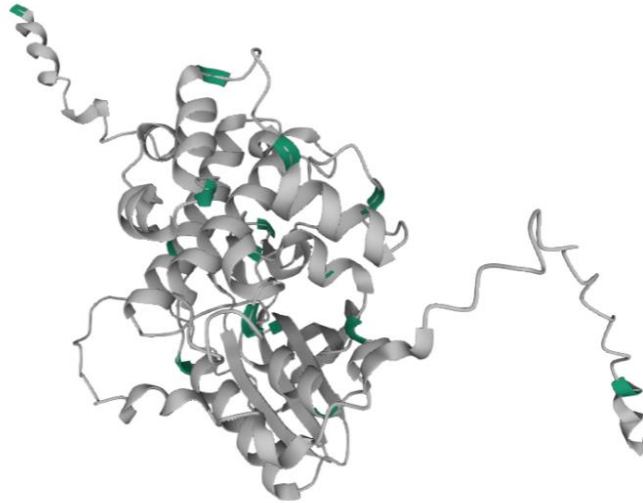
5.1.1 *In silico* analýza AtMKK5

Sestavení 3D struktury AtMKK5

Pomocí SWISS-MODEL (Ref. 9) a UniProt (Ref. 10) byly sestaveny 3D struktury AtMKK5 (locus tag AT3G21220; accession number NM_001338511.1, NP_001319606.1). Na obou obrázcích (Obr. 9, Obr. 10) jsou vyznačeny barevně struktury odpovídající Ser/Thr sekvencím, na kterých dochází k fosforylaci, díky které se stává tato MAPKK aktivní.



Obrázek 9: 3D struktura AtMKK5 ze dvou opačných stran. Jsou vyznačené Ser/Thr sekvence. Vytvořeno pomocí SWISS-MODEL (Ref.9)



Obrázek 10: 3D struktura AtMKK5 s vyznačenými Ser/Thr sekvencemi. Vytvořeno pomocí UniProt (Ref.10)

***In silico* analýza promotoru**

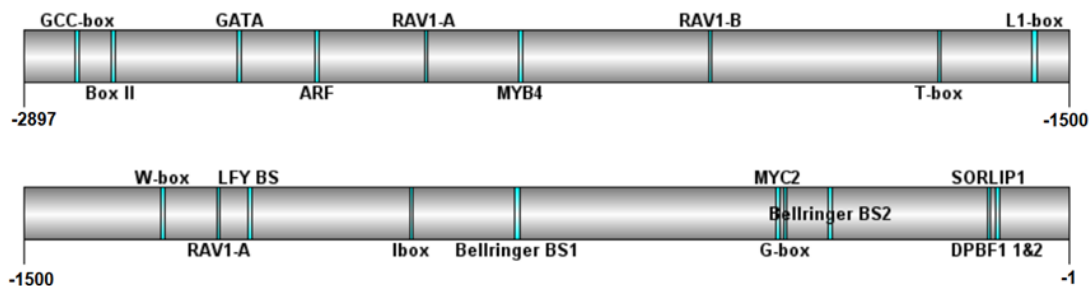
Pomocí serveru Agris (Ref.11) byla provedena analýza promotoru genu *AtMKK5* umístěného na chromozomu 3. Byly identifikovány transkripční faktory (Tab. 3, Obr. 11) a dále byla také zjištěna vazebná místa a sekvence nukleotidů. Mezi tyto transkripční faktory patří například MYC2 (původ zkratky z názvu onkogenu **M**yleocytomatosis), který reguluje genovou expresi při reakci na sucho a kyselinu abscisovou (Abe *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1997; Satoh *et al.*, 2004). Transkripční faktory Bellringer potlačují genovou expresi genu *AGAMOUS*, který je zodpovědný za tvorbu tyčinek a plodolistů (Bao *et al.*, 2004). Mezi další sledované transkripční faktory patří W-Box, jenž vykazuje roli při vazbě WRKY DNA proteinů v regulaci genu *NPR1* (*Nonexpresser of PR genes 1*, také znám jako *Noninducible immunity 1*), který pozitivně reguluje inducibilní odolnost rostliny vůči chorobám. (Cao *et al.*, 1994; Ryals *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 2001). DPBF1&2 (**Dc3 Promoter-Binding Factor-1 and 2**) tvoří třídu transkripčních faktorů bZIP, které interagují s ABA-responzivními a embryo-specifickými prvky v promotoru *Dc3* (Kim *et al.*, 1997). *Dc3* (*Daucus carota*) je gen nacházející se u mrkve a kodující mRNA, která je exprimována ve vysokých hladinách ve vyvíjejících se embryích (Seffens *et al.*, 1990). Exprese genů transkripčních faktorů MYB4 (původ zkratky z názvu onkogenu **M**yeloblastosis) může mít funkci v reakci na environmentální stres (Chen *et al.*, 2002). Transkripční faktor RAV-1 (**R**elated to **ABI3/VP1**; *Viviparous1 locus* (VP1) of maize; *Arabidopsis* **ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3** (ABI3) je zodpovědný za regulaci růstu a vývoje laterálních kořenů (Hu *et al.*, 2004). Transkripčním faktorem **LEAFY** (LFY) je regulována exprese *APETALA3* (*AP3*) (Lamb *et al.*, 2002).

Na auxinové responsivní elementy (AuxRE) TGTCTC, které se nacházejí v promotorech primárních auxinových responzivních genů, se specificky jako dimery vážou ARF transkripční faktory (auxin response factors) (Ulmasov *et al.*, 1999). Vazebné místo Box II pro transkripční faktor GT-1 má vliv na funkci regulačních cis-elementů, které se podílí na reakci na světlo (Green *et al.*, 1987; Le Gourrierc *et al.*, 1999). Na sekvenci nukleotidů GATA v DNA je vázán transkripční faktor GATA podílející se na buněčném zrání a také proliferaci buněk (Teakle *et al.*, 2002). G-box vazebné faktory (GBF, **G**-box **b**inding factors) se účastní vývojových a fyziologických procesů v reakci na podněty, jako jsou světlo či hormony na úrovni celé rostliny (Sibéril *et al.*, 2001).

GCC-box je vazebným místem pro transkripční faktory, které řídí molekulární reakce na dehydrataci a nízkou teplotu (Shinozaki a Yamaguchi-Shinozaki, 2000). Vazebné místo L1-box, na jehož sekvenci se může vázat homeodoménový protein ATML1, hraje klíčovou roli v regulaci exprese *PDF1* (*Protodermal factor 1*) v L1 buňkách (Abe *et al.*, 2001). Vazebné místo T-box slouží jako pozitivní modulátor při světlem aktivované transkripci genu *GAPB*, který kóduje B podjednotku chloroplastové glycerinaldehyd-3fosfát dehydrogenázy (GADPH). Z toho je odvozená zkratka genu *GAPB* (*Glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase B subunit*) (Chan *et al.*, 2001). SORLIP-1 (sequences over-represented in light-induced promoters 1) patří do promotorových motivů zapojených do genové exprese regulované světlem (Hudson and Quail, 2003).

Tabulka 3: Vazebná místa pro transkripční faktory na promotoru genu *AtMKK5*

Transkripční faktor	Vazebná místa		Sekvence nukleotidů	Reference
	Začátek	Konec		
AtMYC2 BS in RD22	-420	-415	cacatg	Abe <i>et al.</i> , 1997
Bellringer/replumless/ /pennywise BS1 IN AG	-795	-788	aaattaa	Bao <i>et al.</i> , 2004
Bellringer/replumless/ /pennywise BS2 IN AG	-346	-339	aaattagt	Bao <i>et al.</i> , 2004
W-box	-1302	-1297	ttgact	Yu <i>et al.</i> , 2001
DPBF1&2 binding site motif	-105	-99	acacagg	Kim <i>et al.</i> , 1997
MYB4 binding site motif	-2187	-2181	accaaac	Chen <i>et al.</i> , 2002
RAV1-A binding site motif	-2321	-2317	caaca	Kagaya <i>et al.</i> , 1999
RAV1-B binding site motif	-1914	-1909	cacctg	Kagaya <i>et al.</i> , 1999
LFY BS	-1178	-1173	ccattg	Lamb <i>et al.</i> , 2002
ARF binding site motif	-2478	-2473	tgtctc	Ulmasov <i>et al.</i> , 1999
Box II promoter motif	-2771	-2766	ggtaa	Le Gourrierec <i>et al.</i> , 1999
GATA promoter motif	-2590	-2585	agatag	Teakle <i>et al.</i> , 2002
G-box promoter motif	-409	-404	cacgtg	Menkens a Cashmore 1994
GCC-box promoter motif	-2823	-2818	gccgcc	Shinozaki a Yamaguchi- Shinozaki, 2000
Ibox promoter motif	-946	-941	gataag	Giuliano <i>et al.</i> , 1988
L1-box promoter motif	-1450	-1443	taaatgca	Abe <i>et al.</i> , 2001
T-box promoter motif	-1585	-1580	actttg	Chan <i>et al.</i> , 2001
SORLIP1	-117	-120	agccac	(Hudson and Quail, 2003).



Obrázek 11: Umístění vazebných míst pro transkripční faktory na promotoru genu *AtMKK5*. Vytvořeno v DOG 2.0.

Detekce subcelulární lokalizace AtMKK5

Za využití databáze SUBA (Ref.12) byly detekovány subcelulární lokalizace protein kinasy AtMKK5. Tato protein kinasa byla zjištěna v jádře (AdaBoost, Nucleo, SubLoc, WoLF PSORT, BaCelLo, Plant-mPloc), poté v plastidech (ChloroP, PredSL, iPSORT, PCLR, PProwler, TargetP), mitochondriích (Mitoprot2, SLPFA, SLP-Local) a v neposlední řadě v cytosolu (Plant-mPloc, MultiLoc, YLoc).

Detekce hladiny transkriptů AtMKK5

Díky databázi TAIR (Ref. 13) byly zjištěny hladiny transkriptů *AtMKK5*, a to v různých pletivech za různých podmínek (vývin rostliny, stresy). Byla detekována vysoká míra transkriptů v řapíku stárnujících listů (Klepikova *et al.*, 2016). Při vývoji semen se nejvíce transkriptů nachází v osemeni (Le *et al.*, 2010). Během klíčení byla nejvyšší míra transkriptů zaznamenána po 24 hodinách po vystavení rostliny světlu. (Narsai *et al.*, 2011). Zvýšená hodnota transkriptů byla zaznamenána po jedné hodině od vystavení rostliny 15-minutovému ozáření UV-B záření (Kilian *et al.*, 2007) a při reakci na selen (Van Hoewyk *et al.*, 2008). Také při vystavení rostliny biotickému stresu byly zjištěny vysoké hodnoty transkriptů *AtMKK5*, konkrétně nejvíce po reakci s elicitorem (nejvíce po 1 hodině) a také při kontaktu s *Pseudomonas syringae* (Winter *et al.*, 2007). Vyšší hladina transkriptů *AtMKK5* byla také zaznamenána při reakci s cykloheximidem popř. i s kyselinou salicylovou po dobu 3 hodin (Winter *et al.*, 2007). Co se týká jednotlivých buněk, nejvíce transkriptů se nachází v endodermálních a xylémových buňkách a také v klidových centrálních a mladých meristémových buňkách kořenové čepičky (Ryu *et al.*, 2019).

Protein-proteinové interakce s AtMKK5

Pomocí databáze IntAct EMBL-EBI (Ref.14) byly zaznamenány protein-proteinové interakce *AtMKK5*. Byla zjištěna interakce s protein kinasou MKK6 za pomoci následujících metod: two hybrid (Lee *et al.*, 2008), two hybrid array (Altmann *et al.*, 2020), validated two hybrid (Altmann *et al.*, 2020) a two hybrid prey pooling approach (Altmann *et al.*, 2020).

Možné polymorfismy genu AtMKK5 a mutace v AMK sekvenci AtMKK5

Pomocí databáze TAIR (Ref. 13) byly zjištěny polymorfismy genu *AtMKK5* na chromozomu 3 (Tab. 4) a poté za využití databáze UniProt (Ref. 10) byly popsány bodové mutace v aminokyselinové sekvenci *AtMKK5* (Tab. 5, Obr. 12). Například při mutaci K99M dochází u 99. aminokyseliny v polypeptidové sekvenci k záměně lysinu za methionin, což má za následek ztrátu v kinasové aktivitě.

Tabulka 4: Polymorfismy genu *AtMKK5* s koordináty 7445604–7448498 bp na chromozomu 3

Polymorfismus	Typ	Místo polymorfismu
GABI_256H09	inzerce	kodující oblast
GABI_393B07	inzerce	kodující oblast
GK-393B07-018296 (BX286705, BX286705)	inzerce	exon
<i>mkk5</i> (SALK_067321)	inzerce	promotor
<i>mkk5-1</i> (SALK_047797)	inzerce	promotor
<i>mkk5-2</i> (SALK_050700)	inzerce	exon
<i>mkk5-2</i> (SALK_050700)	inzerce	3'UTR
<i>ossowski_1151248</i>	inzerce	promotor
<i>ossowski_1151249</i>	inzerce	promotor
<i>ossowski_1151250</i>	inzerce	promotor
<i>ossowski_1200122</i>	delece	promotor
<i>ossowski_486278</i>	substituce	promotor
<i>ossowski_486279</i>	substituce	promotor
<i>ossowski_486282</i>	substituce	3'UTR
PERL0474172	substituce	promotor
PERL0474174	substituce	promotor
PERL0474178	substituce	exon
PERL0474182	substituce	exon
PERL0474183	substituce	exon
SALKseq_050700.0	inzerce	3'UTR
SALKseq_077842.2	inzerce	3'UTR

Tabulka 5: Bodové mutace v AMK sekvenci *AtMKK5*

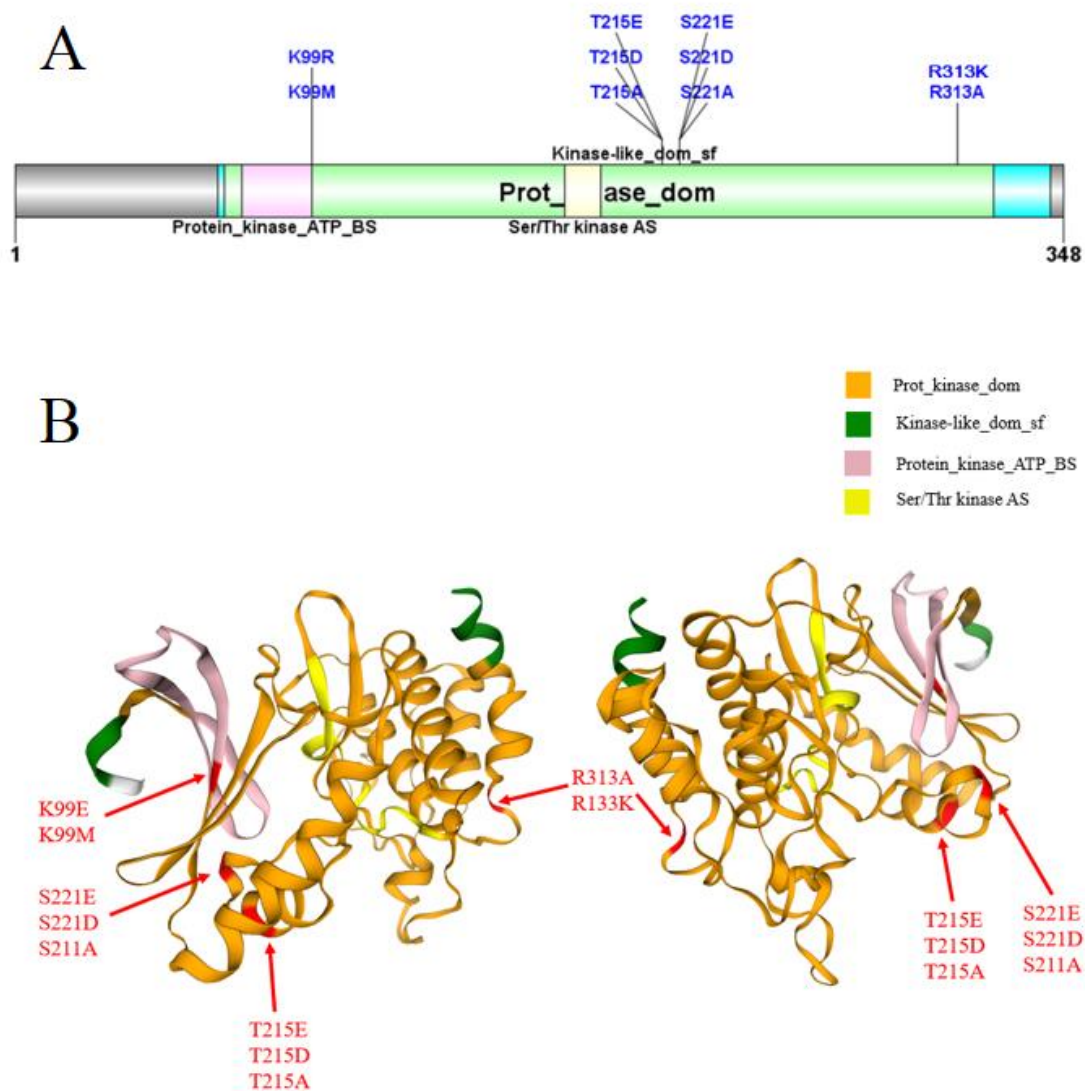
Mutace	Popis
K99M	Ztráta kinasové aktivity
K99R	Ztráta kinasové aktivity, Fosforylováno MAPKKK5 a MAPKKK20
T215A	Zhoršená fosforylace MAPKKK5; při asociaci s S221A
T215D	Konstitutivně aktivní; při asociaci s S221D
T215E	Konstitutivně aktivní; při asociaci s S221E
S221A	Zhoršená fosforylace MAPKKK5; při asociaci s T215A
S221D	Konstitutivně aktivní; při asociaci s T215D
S221E	Konstitutivně aktivní; při asociaci s T215E
R313A	Ztráta ADP-ribosylace
R313K	Ztráta ADP-ribosylace

Proteinové domény na proteinu *AtMKK5*

Díky databázi TAIR (Ref. 13) byly zjištěny proteinové domény (Tab. 6, Obr. 12) Kinase-like_dom_sf (na pozicích aminokyselin 68-344), Protein_kinase_ATP_BS (na pozicích aminokyselin 76-99), Ser/Thr_kinase_AS (na pozicích aminokyselin 183-195) a Prot_kinase_dom (na pozicích aminokyselin 70-325).

Tabulka 6: Proteinové domény na proteinu AtMKK5

Proteinová doména	Lokalizace na proteinu	Databáze
Kinase-like_dom_sf	68-344	Superfamily
Protein_kinase_ATP_BS	76-99	PatternsScan
Ser/Thr kinase AS	183-195	PatternsScan
Prot_kinase_dom	70-325	ProfilesScan

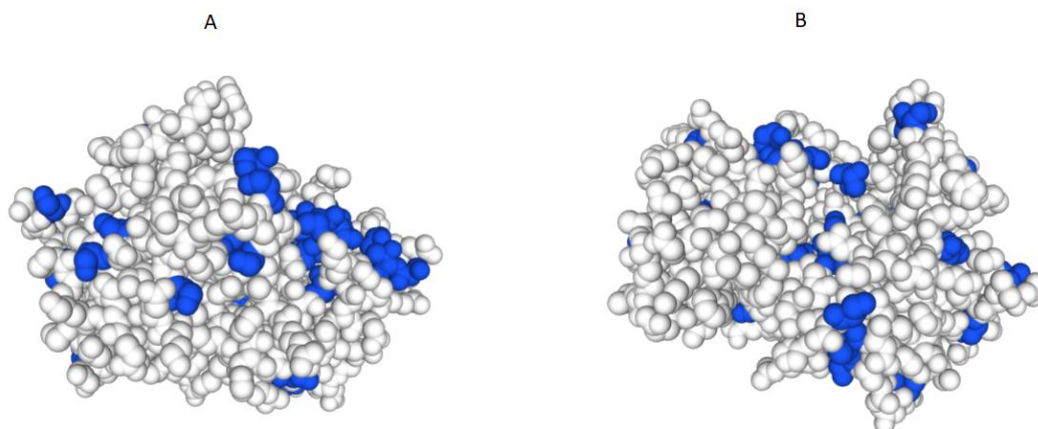


Obrázek 12: Znázornění domén a lokalizace možných bodových mutací mitogen-aktivované protein kinasy AtMKK5 ve 2D a 3D. **A** 2D pomocí programu DOG.2.0. **B** 3D ze dvou stran pomocí SWISS-MODEL (Ref. 9)

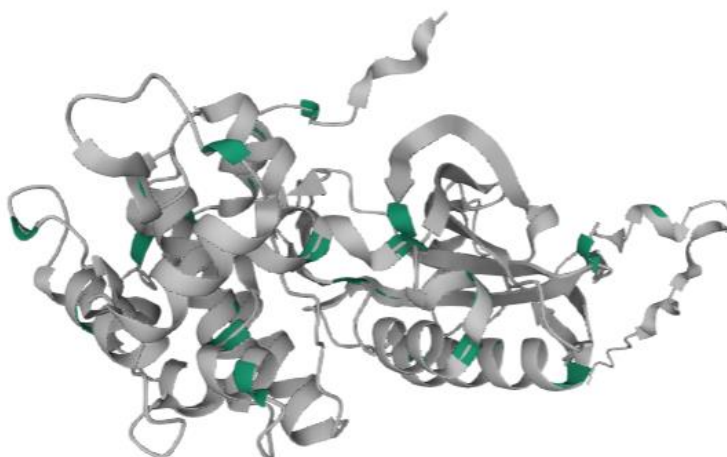
5.1.2 *In silico* analýza AtMKK1

Sestavení 3D struktury AtMKK1

Pomocí SWISS-MODEL (Ref. 9) a UniProt (Ref. 10) byly sestaveny 3D struktury AtMKK1 (locus tag AT4G26070; accession number NM_202890.2, NP_974619.1). Na obou obrázcích (Obr. 13, Obr. 14) jsou vyznačeny barevně struktury odpovídající Ser/Thr sekvencím, na kterých dochází k fosforylaci, díky které se stává tato MAPKK aktivní.



Obrázek 13: 3D struktura AtMKK1 ze dvou opačných stran. Jsou vyznačeny Ser/Thr sekvence. Vytvořeno pomocí SWISS-MODEL (Ref. 9).



Obrázek 14: 3D struktura AtMKK1 s vyznačenými Ser/Thr sekvencemi. Vytvořeno pomocí UniProt (Ref. 10).

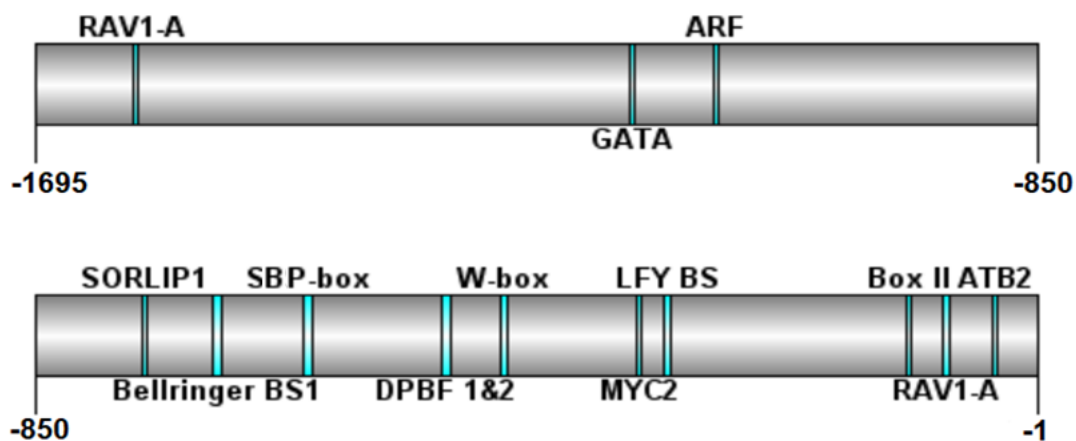
***In silico* analýza promotoru**

Pomocí databáze Agris (Ref.11) byly zjištěny transkripční faktory, jejich vazebná místa a sekvence nukleotidů na promotoru genu *AtMKK1* nacházejícího se na chromozomu 4 (Tab. 7, Obr. 15). Jako první byl zaznamenán transkripční faktor MYC2 (původ zkratky z názvu onkogenu **M**yleocytomatosis), který hraje roli při genové expresi regulované suchem a kyselinou abscisovou (Abe *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1997; Satoh *et al.*, 2004). Transkripční faktory Bellringer potlačují genovou expresi genu *AGAMOUS*, který je zodpovědný za tvorbu tyčinek a plodolistů (Bao *et al.*, 2004). Mezi novou podskupinu proteinů bZIP fungující jako transkripční aktivátory při expresi genu *ProDH* u *Arabidopsis* patří transkripční faktor ATB2 reagující na hypsosmolaritu (Satoh *et al.*, 2004).

Dále byl při analýze promotoru zjištěn promotorový motiv W-Box, jenž vykazuje roli při vazbě WRKY DNA proteinů při regulaci genu *NPRI* (Yu *et al.*, 2001). DPBF1&2 (**Dc3 Promoter-Binding Factor-1 and 2**) tvoří třídu transkripčních faktorů bZIP, které interagují s ABA-responzivními a embryo-specifickými prvky v promotoru *Dc3* (Kim *et al.*, 1997). *Dc3* (*Daucus carota*) je gen nacházející se u mrkve a kodující mRNA, která je exprimována ve vysokých hladinách ve vyvíjejících se embryích (Seffens *et al.*, 1990). DNA-vazebný protein RAV-1 se podílí na mechanismech bránících nadměrnému růstu rostliny (Kagaya *et al.*, 1999) a transkripčním faktorem LFY je regulována exprese *APETALA 3* (Lamb *et al.*, 2002). Na auxinové responsivní elementy (AuxRE) TGTCTC, které se nacházejí v promotorech primárních auxinových responsivních genů, se specificky jako dimery vážou ARF transkripční faktory (**auxin response factors**) (Ulmasov *et al.*, 1999). Vazebné místo Box II pro transkripční faktor GT-1 má vliv na funkci regulačních cis-elementů, které se podílí na reakci na světlo (Green *et al.*, 1987; Le Gourrierec *et al.*, 1999). S promotorovým motivem GATA interagují při reakci na světlo jaderné proteiny (Teakle *et al.*, 2002). Promotorový motiv SBP-box koduje konzervovanou proteinovou doménu SBP, která je zodpovědná za interakci s DNA (Cardon *et al.*, 1999). SORLIP-1 (**sequences over-represented in light-induced promoters 1**) patří do promotorových motivů zapojených do genové exprese regulované světlem (Hudson and Quail, 2003).

Tabulka 7: Vazebná místa pro transkripční faktory na promotoru genu *AtMKK5*

Transkripční faktor	Vazebná místa		Sekvence nukleotidů	Reference
	Začátek	Konec		
AtMYC2 BS in RD22	-340	-345	cacatg	Abe <i>et al.</i> , 1997
Bellringer/replumless/pennywise BS1 IN AG	-699	-692	aaattaa	Bao <i>et al.</i> , 2004
ATB2/AtbZIP53/AtbZIP44/GBF5 BS in ProDH	-38	-33	actcat	Satoh <i>et al.</i> , 2004
W-box	-455	-450	ttgacc	Yu <i>et al.</i> , 2001
DPBF1&2 binding site motif	-504	-498	acacaag	Kim <i>et al.</i> , 1997
RAV1-A binding site motif	-1611	1607	caaca	Kagaya <i>et al.</i> , 1999
	-79	-75		
LFY consensus binding site motif	-316	-311	ccaatg	Lamb <i>et al.</i> , 2002
ARF binding site motif	-1120	-1115	tgtctc	Ulmasov <i>et al.</i> , 1999
Box II promoter motif	-111	-116	ggtaa	Le Gourrierec <i>et al.</i> , 1999
GATA promoter motif	-1191	-1186	tgataa	Teakle <i>et al.</i> , 2002
SBP-box promoter motif	-623	-615	ttcgtacaa	Cardon <i>et al.</i> , 1999
SORLIP1	-759	-754	agccac	Hudson and Quail, 2003



Obrázek 15: Umístění vazebných míst pro transkripční faktory na promotoru genu *AtMKK1*. Vytvořeno za využití DOG 2.0.

Detekce subcelulární lokalizace AtMKK1

Za využití databáze SUBA (Ref. 12) byly vyhledány subcelulární lokalizace protein kinasy AtMKK1. Tato protein kinasa byla nejvíce detekována v cytosolu (EpiLoc, MultiLoc, SLP-Local, SubLoc, YLoc), poté v mitochondriích (PredSL, SLPFA, iPSORT, PProwler), jádře (SLP-Local, BaCelLo, Plant-mPloc) a byla nalezena také v plasmatické membráně (AdaBoost) a v plastidech (WoLF PSORT).

Detekce hladiny transkriptů AtMKK1

Díky databázi TAIR (Ref. 13) byly zjištěny hladiny transkriptů *AtMKK1*, a to v různých pletivech za různých podmínek (vývin rostliny, stresy). Byla detekována vysoká míra transkriptů v řapíku stárnoucích listů a v řapíku a čepeli listů dospělé rostliny (Klepikova *et al.*, 2016). Při vývoji semen se nejvíce transkriptů nachází v periferním endospermu (Winter *et al.*, 2007). Zvýšená hladina transkriptů byla zaznamenána při kontaktu se selenem (Van Hoewyk *et al.*, 2008) a po šesti hodinách od vystavení rostliny 15- minutovému ozáření UV-B záření v reakci na tento abiotický stres (Kilian *et al.*, 2007). Dále bylo zjištěno vyšší množství transkriptů při kontaktu s *Botrytis cinerea* a *Erysiphe orontii* (Winter *et al.*, 2007). Vyšší hladina transkripčních faktorů byla také zaznamenána při reakci s cykloheximidem, popř. i s kyselinou salicylovou po dobu 3 hodin (Winter *et al.*, 2007). Co se týká jednotlivých buněk, tak zde se nejvíce transkriptů nachází v kortexových buňkách a buňkách epidermis v časném stádiu diferenciaci (Ryu *et al.*, 2019).

Protein-proteinové interakce s AtMKK1

Pomocí databáze IntAct EMBL-EBI (Ref.14) byly zjištěny 4 proteinové interakce s AtMKK1 (Tab. 8). Jako první byla identifikována interakce s protein kinasou MPK4 pomocí různých metod, mezi které patří BIFC (Gao *et al.*, 2008), in gel kinase assay a two hybrid (Teige *et al.*, 2004), two hybrid array (Altmann *et al.*, 2020), protein kinase assay (Lee *et al.*, 2008), two hybrid prey pooling approach (Altmann *et al.*, 2020) a validated two hybrid (Altmann *et al.*, 2020).

Dále byla zjištěna možná interakce s protein kinasou MEKK1 díky metodám BIFC (Gao *et al.*, 2008), two hybrid (Mizoguchi *et al.*, 1998) a two hybrid array (Arabidopsis Interactome Mapping Consortium, 2011). Poté byla pomocí metod two hybrid (Lee *et al.*, 2008) a protein kinase assay (Lee *et al.*, 2008) nalezena interakce s MPK11. Jako poslední byla identifikována za využití metody protein kinase assay (Lee *et al.*, 2008) interakce s MPK12, která je jednou ze třech ortologů MsMMK2 (Pavlíková, 2022).

Tabulka 8: Protein-proteinové interakce AtMKK1

Interagující protein	Lokus	Funkce	Metoda detekce interakce
MPK4 (MsMMK2)	AT4G01370	Protein kinasa	BIFC
			In gel kinase assay
			Protein kinase assay
			Two hybrid
			Two hybrid array
			Two hybrid prey pooling approach
MEKK1	AT4G08500	Protein kinasa	Validated two hybrid
			BIFC
			Two hybrid
			Two hybrid array
MPK11 (SAMK)	AT2G46070	Protein kinasa	Two hybrid
			Protein kinase assay
MPK12 (MsMMK2)	AT1G01560	Protein kinasa	Protein kinase assay

Možné polymorfismy genu *AtMKK1* a mutace v AMK sekvenci *AtMKK1*

Pomocí databáze TAIR (Ref. 13) byly zjištěny polymorfismy genu *AtMKK1* na chromozomu 4 (Tab. 9) a poté za využití databáze UniProt (Ref. 10) byly popsány bodové mutace v aminokyselinové sekvenci *AtMKK5* (Tab. 10, Obr. 16). Například při mutaci K97R dochází u 97. aminokyseliny v aminokyselinové sekvenci k záměně lysinu za arginin, což má za následek ztrátu v kinasové aktivitě.

Tabulka 9: Polymorfismy genu *AtMKK1* s koordinátami 13217475 – 13219936 bp na chromozomu 4

Polymorfismus	Typ	Místo polymorfismu
FLAG_086D03	inzerce	promotor
GABI_854B05	inzerce	3'UTR
GABI_923H02	inzerce	3'UTR
GABI_923H02	inzerce	kódující oblast
GK-854B05-025755	inzerce	exon
GK-923H02-031999	inzerce	exon
GT25368.Ds5.04.23.2009.jz58.524	inzerce	promotor
GT7888.Ds5.09.29.00.b.621	inzerce	promotor
GT8366.Ds5.04.27.01.JU92.b.604	inzerce	promotor
<i>mkk1</i> (CS66014) (SALK_027645)	inzerce	intron
<i>ossowski_802925</i>	substituce	promotor
PERL0817032	substituce	intron
PERL0817034	substituce	intron
PERL0817035	substituce	exon
SAIL_123_D07	inzerce	5'UTR
SAIL_125_G11.v1	inzerce	5'UTR
SAIL_269_C04	inzerce	5'UTR
SAIL_269_C04	inzerce	intron
SAILseq_294_G11.2	inzerce	5'UTR
SALK_015914	inzerce	promotor
SALK_015914.56.00.x	inzerce	kódující oblast
SALK_015914.56.00.x	inzerce	promotor
SALK_015953.35.85.x	inzerce	kódující oblast
SALK_015953.35.85.x	inzerce	promotor
SALK_140054.54.25.x	inzerce	intron
SALKseq_056711.2	inzerce	kódující oblast
SALKseq_076309.2 (ABI1TD)	inzerce	kódující oblast
SALKseq_093946.1	inzerce	intron
SALKseq_140054.0	inzerce	intron

Tabulka 10: Bodové mutace v AMK sekvenci *AtMKK1*

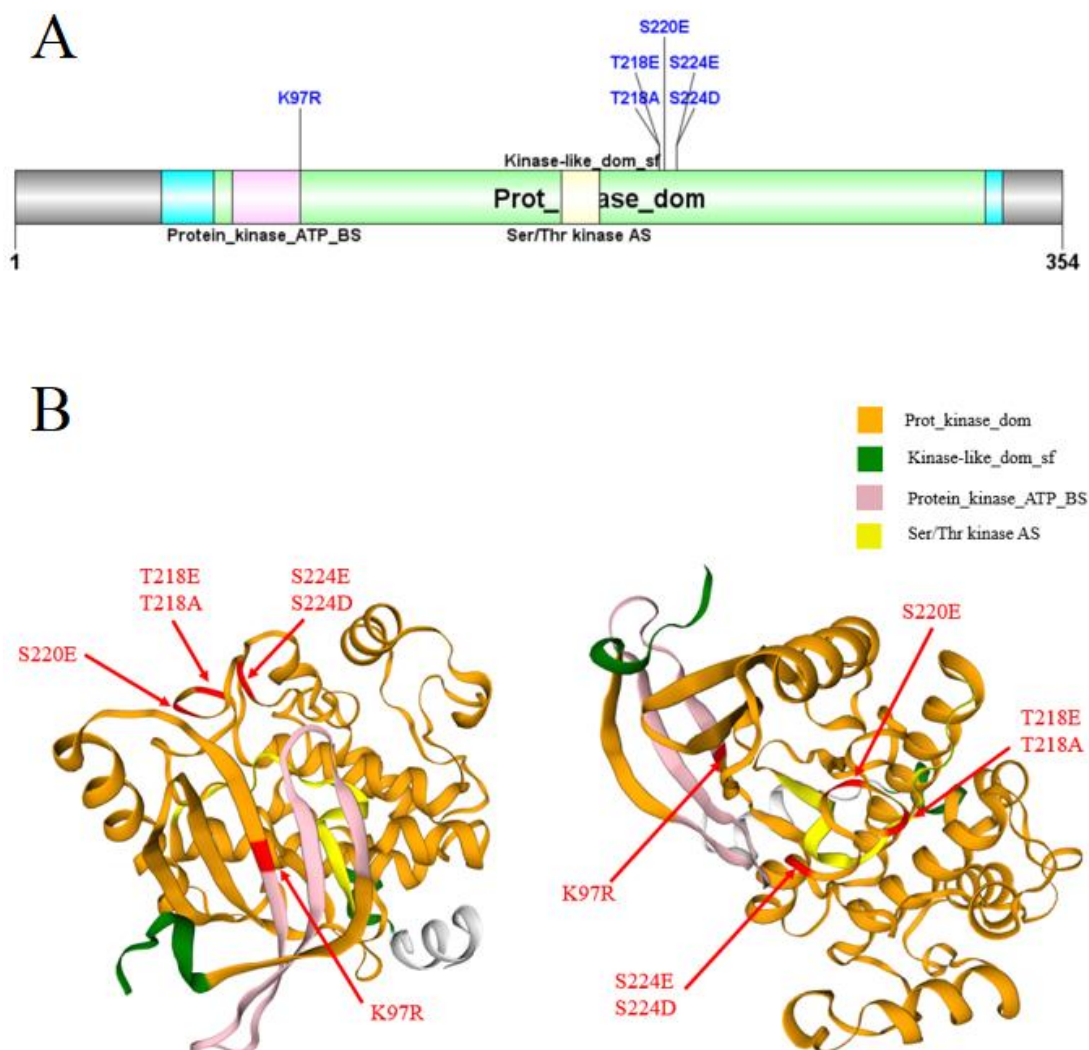
Mutace	Popis
K97R	Ztráta kinasové aktivity <i>in vitro</i>
T218A	Ztráta kinasové aktivity <i>in vitro</i> ; při asociaci s S224E
T218E	Konstitutivně aktivní; při asociaci s S224D. Zvyšuje aktivitu kinasy <i>in vitro</i> ; při asociaci s S224E
S220E	Zvyšuje aktivitu kinasy <i>in vitro</i> ; při asociaci s S224E
S224D	Konstitutivně aktivní; při asociaci s T218E
S224E	Zvyšuje aktivitu kinasy <i>in vitro</i> ; při spojení s T218E nebo S220E

Proteinové domény na proteinu *AtMKK1*

Proteinové domény (Tab. 11, Obr. 16) byly vyhledány pomocí databáze TAIR (Ref. 13). Byly detekovány proteinové domény Kinase-like_dom_sf (na pozicích aminokyselin 50-334), Protein_kinase_ATP_BS (na pozicích aminokyselin 74-97), Ser/Thr_kinase_AS (na pozicích aminokyselin 185-198) a Prot_kinase_dom (na pozicích aminokyselin 68-328).

Tabulka 11: Proteinové domény na proteinu AtMKK1

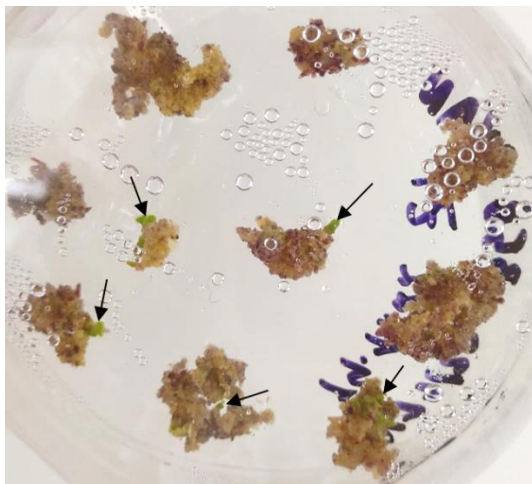
Proteinová doména	Lokalizace na proteinu	Databáze
Kinase-like_dom_sf	50-334	Superfamily
Protein_kinase_ATP_BS	74-97	PatternsScan
Ser/Thr kinase AS	185-198	PatternsScan
Prot_kinase_dom	68-328	ProfilesScan



Obrázek 16: Znázornění domén a lokalizace možných bodových mutací mitogen-aktivované protein kinasy AtMKK1 ve 2D a 3D. **A** 2D pomocí programu DOG.2.0. **B** 3D ze dvou stran pomocí SWISS-MODEL (Ref. 9)

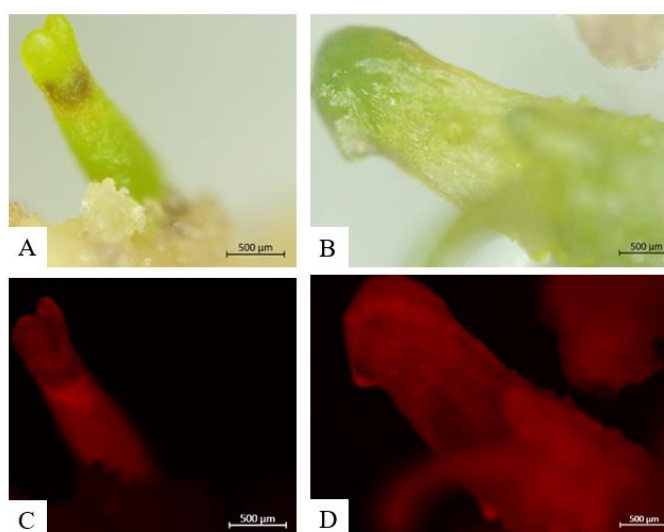
5.2 Rozmnožení transgenní linie *M. sativa* metodou somatické embryogeneze

Za využití metody somatické embryogeneze byly z listových explantátů rostliny *M. sativa* transgenní linie *35S::tagRFP-TUA6* nejdříve na B5H médiu indukovány nediferencované kalusy. Po přeložení kalusů na diferenciační médium B50 došlo k jejich diferenciaci, pozorovatelné jako nárůst embryí na povrchu kalusu (Obr. 17).



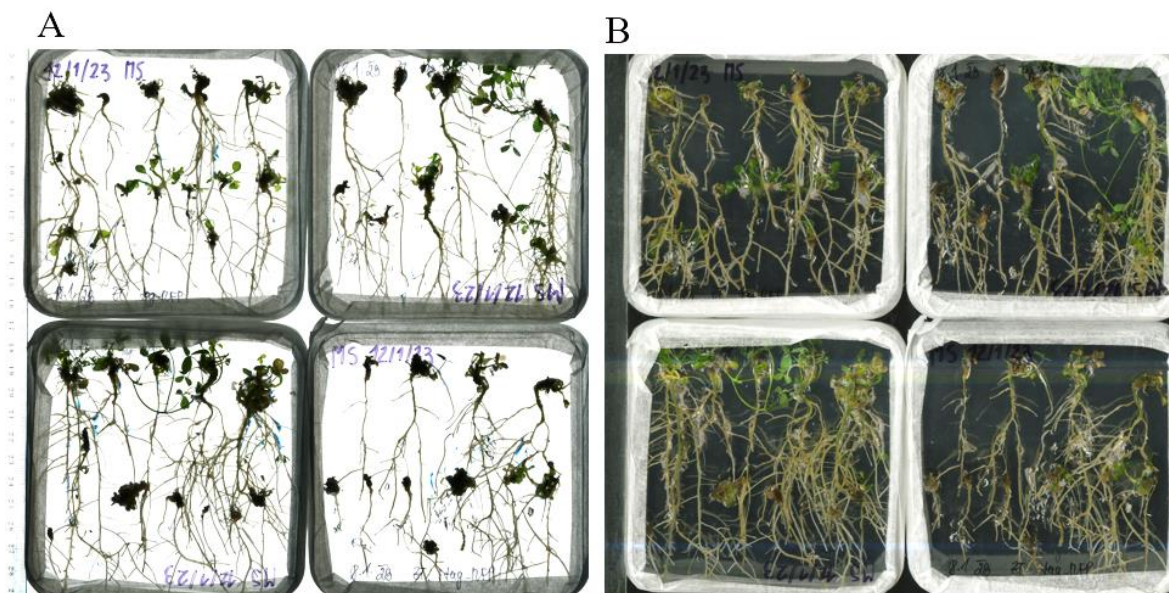
Obrázek 17: Diferencované kalusy se somatickými embryi na povrchu B50 média. Embrya označena šipkou. Vyfoceno pomocí mobilního telefonu.

Byla sledována vývojová stádia embryí, tedy brzká a pozdní torpédovitá vývojová fáze embryogeneze (Obr. 18, A, B). V tomto kroku byla ověřena přítomnost cytoskeletárního markeru *tagRFP-TUA6*, který měl červený signál (Obr. 18, C-D). Byl vizualizován na Zoom mikroskopu ve viditelném světle (kanál RL_ring) a v UV oblasti (kanál DsRED, excitační vlnová délka 590 nm, emisní vlnová délka 612 nm).



Obrázek 18: Somatická embrya ve svých vývojových fázích. **A** Brzké torpédovitá embryo. **B** Pozdní torpédovitá embryo. **C, D** Ověření cytoskeletárního markeru *tagRFP-TUA6* v embryích. Měřítko 500 µm. Vyfoceno pomocí Axio Zoom.V16. Z=1x10.

Embrya byla přemístěna na kultivační MMS médium, kde se postupně formovaly výhonky a kořen. Poté byly mladé rostliny přemístěny na povrch MS média (Obr. 19), odkud byly v případě nutnosti přesazeny do větší nádoby obsahující MS médium.

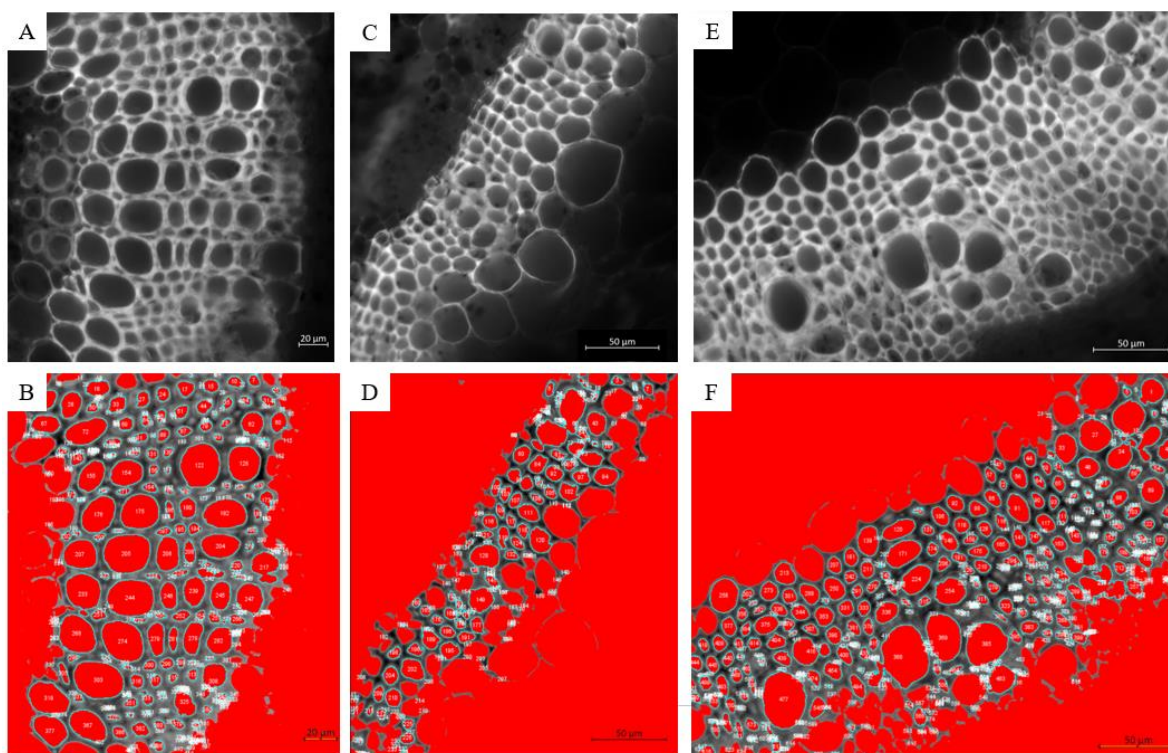


Obrázek 19: Mladé vyvíjející se rostliny *M. sativa* na MS médiu. **A** Světlé pozadí. **B** Tmavé pozadí. Vyfoceno pomocí Image Scanner III.

Tento postup je součástí metody stabilní transformace, kdy se při této metodě používá obdobného metodologického postupu a praktické dovednosti získané při jednoduché somatické embryogenezi bez stabilní transformace. Co se konkrétně úspěšnosti týče, počet použitých listů činil celkem 50 listů odebraných ze dvou opakování experimentu, tedy bylo připraveno 14 Petriho misek s explantáty na B5H médiu. Celkem bylo získáno 28 vitálních rostlin (Obr. 19). Úspěšnost je počítána jako poměr vitálních rostlin ku celkovému počtu použitých listů, tedy $28/50 = 0,56 = 56\%$.

5.3 Fenotypové analýzy xylémových buněk stonku

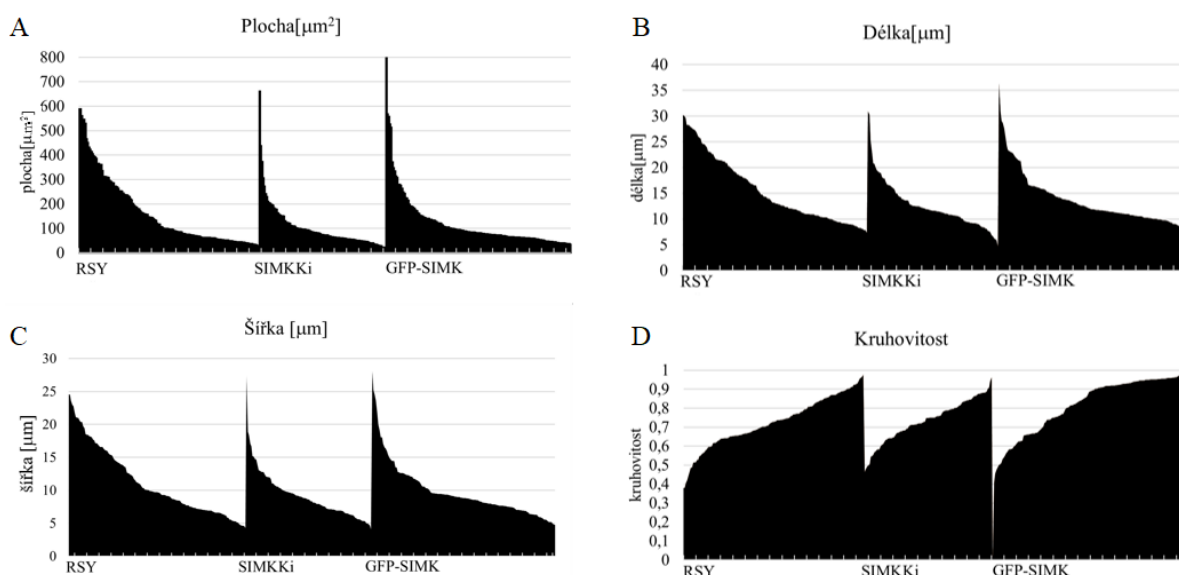
Vodivým pletivem, které transportuje vodu a živiny z půdy do stonků a listů, je xylém. Bylo provedeno automatizované měření plochy (průřez a průtok) a dalších parametrů buněk xylému u transversálního řezu stonku. Měření bylo provedeno u studovaných linií (RSY, SIMKKi a GFP-SIMK), kdy z každé byly náhodně vybrány tři rostliny, představující biologické repliky. Na obrázku č. 20 lze vidět příklady reprezentativních snímků používaných pro získání dat.



Obrázek 20: Reprezentativní snímky pro měření xylémových buněk u transgenních linií *M. sativa* SIMKKi a GFP-SIMK a u kontrolní linie RSY. **A, B** Xylémové buňky *M. sativa* kontrolní linie RSY. **C, D** Xylémové buňky *M. sativa* transgenní linie SIMKKi. **E, F** Xylémové buňky *M. sativa* transgenní linie GFP-SIMK. **A, C, E** Buňky pod epifluorescenčním mikroskopem ZEISS Axio Imager.M2. **B, D, F** Buňky prahované v programu Image J. **A, B** Měřítko 20 µm. **C-F** Měřítko 50 µm.

Ze získaných dat byly vybrány parametry, které byly zamýšleny pro použití při statistickém vyhodnocení: area (plocha), major (délka), minor (šířka), circularity (cirkularita) a roundness (kruhovitost). Cirkularita nakonec nebyla posuzována z důvodu možného zkreslení hodnot při měření pixelů softwarem. Distribuce plochy, délky, šířky a kruhovitosti byly zpracovány do skupinových sloupcových grafů (Obr. 21). Bylo zjištěno, že u transgenních linií je trend distribuce velikosti ploch buněk odlišný od kontrolní linie (Obr. 21, A). U linie SIMKKi je patrná distribuce spíše ve prospěch menších buněk.

U linie GFP-SIMK je naopak viditelná distribuce ve prospěch buněk o větší ploše. Stejný trend se vyskytuje i v případě parametrů délky (Obr. 21, B) a šířky (Obr. 21, C), jelikož tyto dva parametry blízce souvisí s plochou. Zajímavé je, že při sledování kruhovitosti (Obr. 21, D) u linie GFP-SIMK byla distribuce buněk ve prospěch více kruhovitých buněk, což není pozorovatelné u dalších dvou linií.

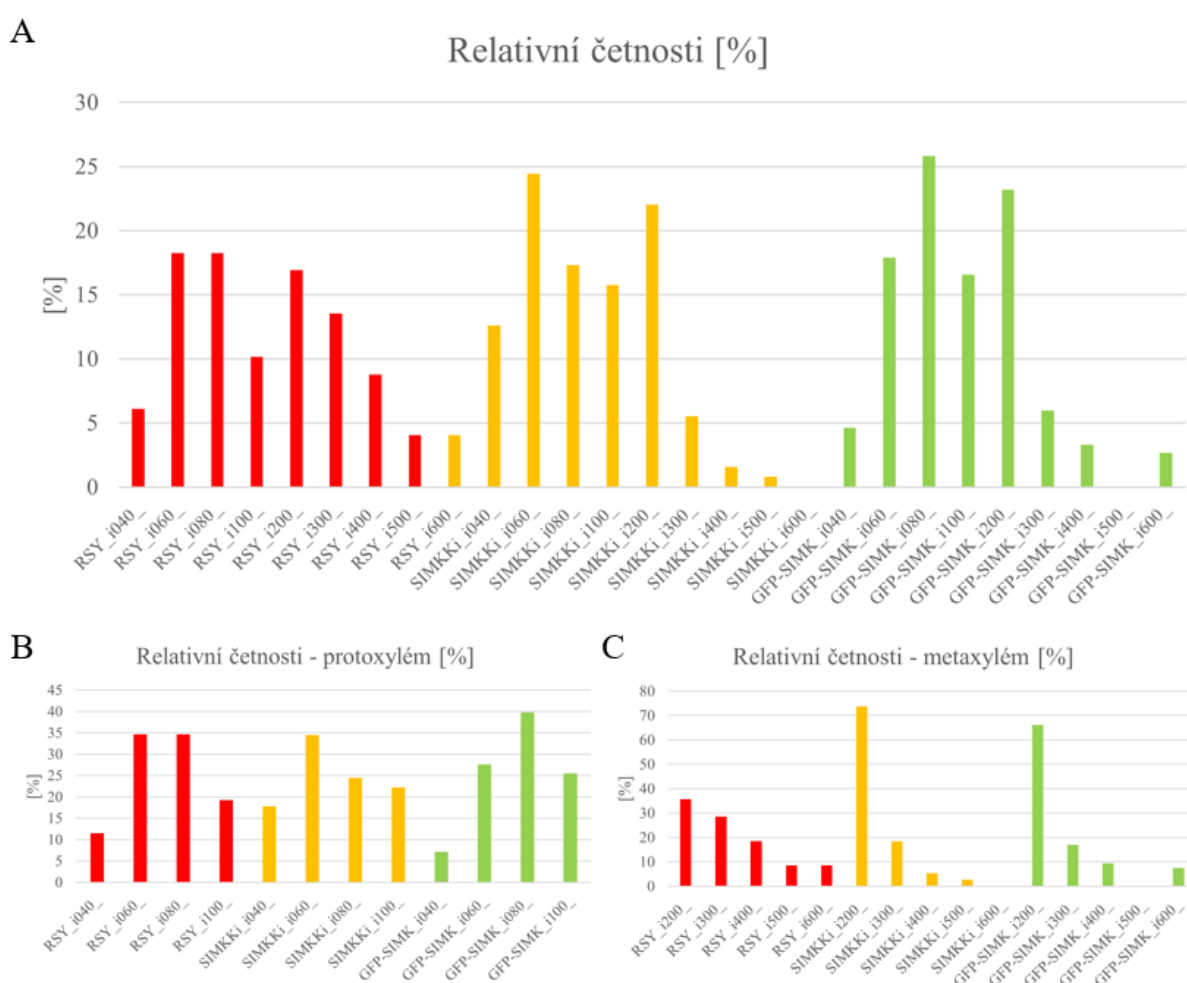


Obrázek 21: Výsledek automatizovaného měření xylémových buněk u transgenních linií *M. sativa* SIMKKi a GFP-SIMK a u kontrolní linie RSY. Sledované parametry: **A** Plocha (μm^2); **B** Délka (μm); **C** Šířka (μm); **D** Kruhovitost. RSY N=148; SIMKKi N=127; GFP-SIMK N=152. Vytvořeno v MS Excel.

Dále byl pro bližší zkoumání vybrán parametr plochy, kdy byly buňky přiděleny do intervalů, kterých bylo devět. Dolní hranice prahu (threshold) pro detekci byla $40 \mu\text{m}^2$ (interval i040, $40\text{--}59,99 \mu\text{m}^2$), následoval interval i060 ($60\text{--}79,99 \mu\text{m}^2$) a poté i080 ($80\text{--}99,99 \mu\text{m}^2$). Intervaly i100 až i600 (horní threshold) byly rozděleny do intervalů po $100 \mu\text{m}^2$. Interval i100 rovněž představuje vlastním zvážením stanovenou hranici pro protoxylém, jelikož v literatuře nebylo možno tento údaj dohledat. Intervaly i200–i600 byly stanoveny pro reprezentaci metaxylému. Celková dolní hranice prahu už nebyla posunuta níže v důsledku možné rostoucí nepřesnosti automatického měření při zmenšující se ploše.

Byla sledována relativní četnost buněk ve stanovených intervalech plochy (Obr. 22). Patrné je, že se vnitřní distribuce buněk v rámci jednotlivých linií liší. V rámci protoxylému (Obr. 22, B) je u linie SIMKKi distribuce posunuta ve prospěch menších buněk, kdy nejvíce buněk se nachází v intervalu i040. Naopak u rostlin GFP-SIMK linie je patrný posun ve prospěch větších protoxylémových buněk. Nejvíce buněk se v tomto případě nachází v intervalu i080. Zajímavé je, že v kontrolní linii RSY jsou buňky v intervalech i060 a i080

zastoupeny rovnoměrně. Pokud se zaměříme na metaxylému (Obr. 22, C), nenazačují získaná data diferenci v distribuci u transgenních linií. Je ale viditelný rozdíl mezi kontrolní linií RSY a transgenními liniemi, kdy u RSY je viditelný méně strmý trend poklesu. Celkově je pozorovatelné, že postupně klesá počet buněk s velkou plochou. Zajímavé je, že u všech linií můžeme vidět největší zastoupení buněk v intervalu i200, přičemž nejvíce jsou buňky tohoto intervalu zastoupeny u SIMKKi linie. Byl proveden dvouvýběrový t-test mezi kontrolní linií RSY a SIMKKi nebo GFP-SIMK, avšak jelikož byly použity pouze tři biologické repliky na jednu linii, p nebylo menší než zvolená hladina významnosti 0,05, tudíž výsledek není statisticky významný.

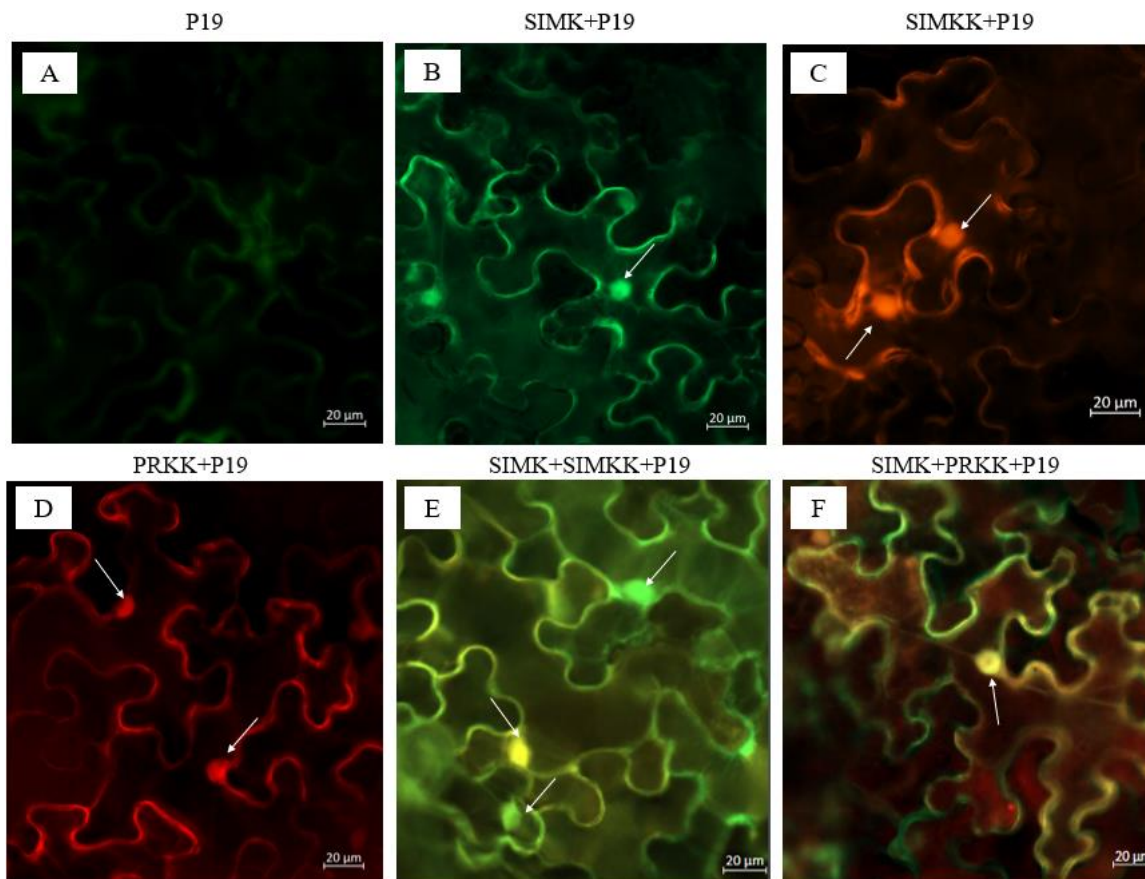


Obrázek 22: Relativní četnosti počtu ploch xylémových buněk v jednotlivých velikostních intervalech u transgenních linií *M. sativa* SIMKKi a GFP-SIMK a u kontrolní linie RSY. Intervaly: i040 (40 μm^2 –59,99 μm^2), i060 (60 μm^2 –79,99 μm^2), i080 (80 μm^2 –99,99 μm^2), i100 (100 μm^2 –199,99 μm^2), i200 (200 μm^2 –299,99 μm^2), i300 (300 μm^2 –399,99 μm^2), i400 (400 μm^2 –499,99 μm^2), i500 (500 μm^2 –599,99 μm^2) a i600 (600 μm^2 –699,99 μm^2). **A** Celková distribuce. **B** Distribuce v rámci protoxylému. **C** Distribuce v rámci metaxylému. RSY N=148; SIMKKi N=127; GFP-SIMK N=152. Vytvořeno v MS Excel.

5.4 Transientní (ko-)transformace listů *Nicotiana benthamiana* s fluorescenčně značenými MAPK

Pro experiment bylo použito 6 variant se studovanými konstrukty: 1 (*P19*), 2 (*35S::SIMK+P19*), 3 (*35S::tagRFP:SIMKK+P19*), 4 (*35S::mRFP:PRKK+P19*), 5 (*35S::SIMK+35S::tagRFP:SIMKK+P19*) a 6 (*35S::SIMK+35S::mRFP:PRKK+P19*). Po třech dnech od provedení transientní transformace (3 DAT) byla na epifluorescenčním mikroskopu potvrzena exprese vnesených studovaných konstruktů *35S::GFP:SIMK* (kanál EGFP, excitační vlnová délka 488 nm a emisní vlnová délka 509 nm), *35S::tagRFP:SIMKK* (kanál TagRFP, excitační vlnová délka 558 nm a emisní vlnová délka 583), *35S::mRFP:PRKK* (kanál mRFP1.2, excitační vlnová délka 590 nm a emisní vlnová délka 612).

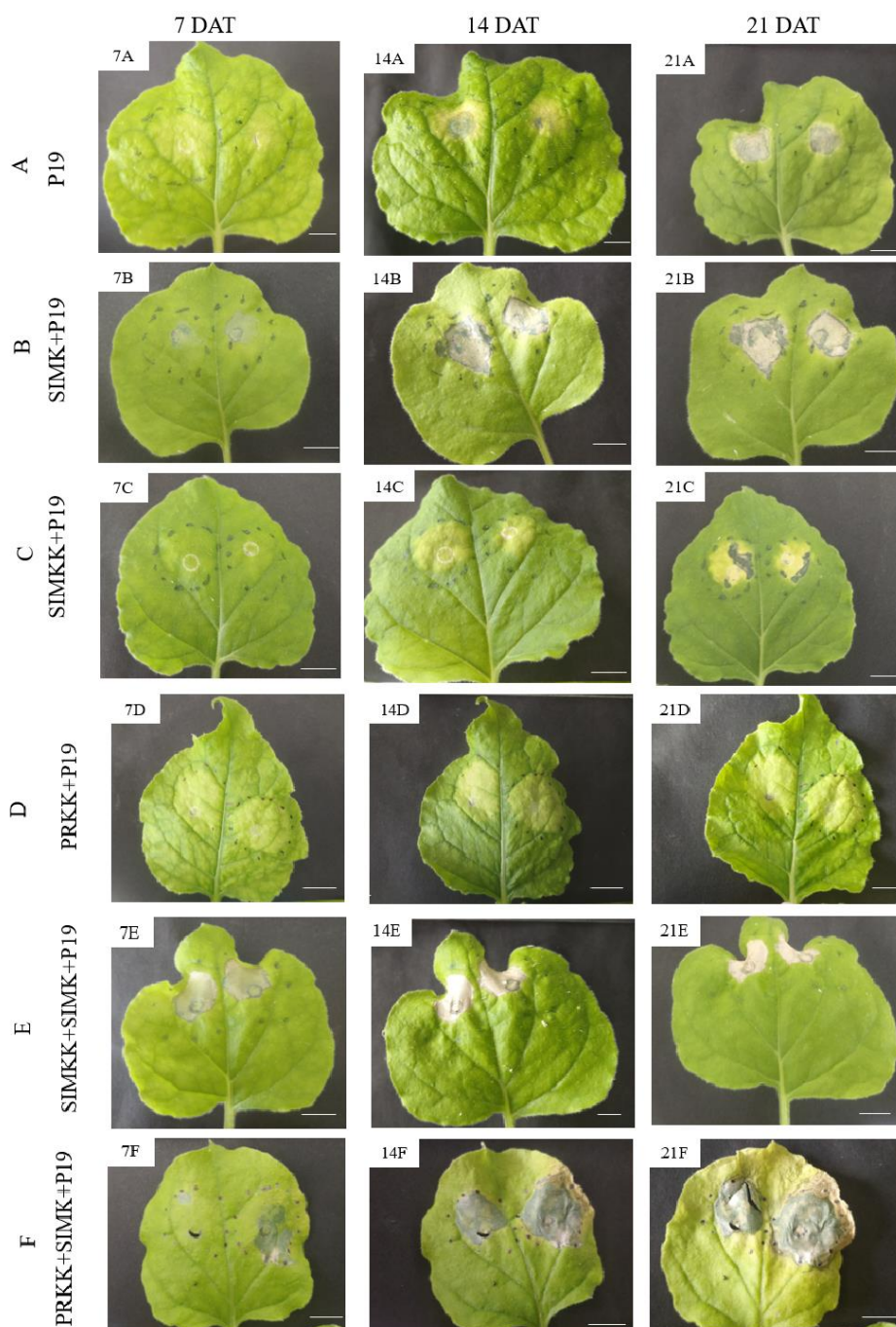
Kombinace dvou kanálů (green/red) byla použita u všech 6 variant experimentu, včetně varianty se samotnou kulturou bakterie nesoucí konstrukt *P19* využitý k supresi RNAi (Obr. 23, A). Bakterie s *P19* byly použity u všech variant. Signál je viditelný jak při použití jednoho konstruktů s MAPK nebo MAPKK, tak při studiu kotransformace MAPKK-MAPK použitím dvou konstruktů. Je zřejmé, že SIMK, SIMKK a PRKK jsou exprimovány v cytoplazmatické membráně a také v jádře (Obr. 23, B-D). Koexprese SIMK-SIMKK a SIMK-PRKK byla potvrzena spojením kanálů EGFP a TagRFP nebo mRFP 1.2 a je viditelná jako oranžovožlutý signál (Obr. 23; E, F).



Obrázek 23: Studované MAP kinasy exprimované v epidermálních buňkách transientně transformovaných listů *N. benthamiana*. Pozorováno pod epifluorescenčním mikroskopem ZEISS Axio Imager.M2 (Objektiv LD Plan-Neofluar 20x/0,4 Korr M27). Transformace prostřednictvím *A. tumefaciens* s konstrukty: **A** P19; **B** 35S::*GFP*:SIMK + P19; **C** 35S::*tagRFP*:SIMKK + P19; **D** 35S::*mRFP*:PRKK+P19; **E** 35S::*GFP*:SIMK+35S::*tagRFP*:SIMKK+P19. **F** 35S::*GFP*:SIMK+35S::*mRFP*:PRKK+P19. **A, B** kanál EGFP; **C** kanál TagRFP; **D** kanál mRFP; **E** spojení kanálů EGFP a TagRFP. **F** spojení kanálů EGFP a mRFP. Šipky značí jádra. **A-F** Měřitko 20 µm.

5.5 Sledování fenotypu transientně transformovaných rostlin *Nicotiana benthamiana*

Transientně transformované listy byly sledovány v intervalech 7 DAT, 14 DAT a 21 DAT se zaměřením poškození listů, tedy chlorózy a nekrózy.



Obrázek 24: Fenotypy transientně transformovaných listů *N. benthamiana* se studovanými konstrukty: **A** *P19*; **B** *35S::GFP:SIMK + P19*; **C** *35S::tagRFP:SIMKK + P19*; **D** *35S::mRFP:PRKK+P19*; **E** *35S::GFP:SIMK+35S::tagRFP:SIMKK+P19*. **F** *35S::GFP:SIMK+35S::mRFP:PRKK+P19*. Vyfoceno pomocí mobilního telefonu. Měřítka **A-F** 1 mm.

V časovém úseku 7 DAT (Obr. 24, 7A-F) je pozorovatelná nekróza u listů, kde byla exprimována SIMK nejen samotná (Obr. 24, 7B), ale i v případě koexprese s upstream kinasami SIMKK a PRKK (Obr. 24, 7E, 7F), kde je však projev nekrózy výraznější. U listů s nadprodukcí pouze samotných SIMKK a PRKK nedochází ještě v čase 7 DAT k nekróze, ale pouze ke chloróze. (Obr. 24, 7C, 7D). V časovém úseku 14 DAT (Obr. 24, 14A-F) můžeme pozorovat rozšíření oblasti nekrózy v případě listů s exprimovanou SIMK (Obr. 24, 14B) a v případě nadprodukce fúzního proteinu PRKK-SIMK (Obr. 24, 14F). V případě listu s nadprodukcí samotné SIMKK došlo pouze k rozšíření chlorózy (Obr. 24, 14C). Posledním časovým intervalem bylo 21 DAT (Obr. 21, 24A-F), kdy dochází k nekróze už u všech infiltrovaných listů. Konstrukt *P19* (Obr. 24, A) představuje negativní kontrolu a je patrné, že jsou první příznaky nekrózy viditelné až v čase 14 DAT (Obr. 24, 14A), zatímco chloróza se projevuje už v čase 7 DAT (Obr. 24, 7A). Z výše uvedeného lze usuzovat, že upstream MAPKK SIMKK a PRKK mohou urychlit v počátečním intervalu od infiltrace projevy buněčné smrti, jelikož v případě listů s exprimovanou SIMK dochází k výraznější nekróze až v čase 14 DAT, zatímco v případě koexprese s upstream kinasami SIMKK a PRKK je možno nekrózu zaznamenat už v čase 7 DAT. Pro podložení tohoto tvrzení by bylo nutno experiment opakovat a statisticky vyhodnotit fenotypové projevy u více biologických replik (3 a více listů) a poté ideálně opakováním celého experimentu v čase.

6 DISKUSE

Při *in silico* analýzách bylo zjištěno, že transkripční faktory nebo vazebná místa pro transkripční faktory nacházející se na genu *AtMKK5* mají vliv na regulaci abiotických stresů, jako je například sucho (MYC2; Abe *et al.*, 1997) nebo dehydratace (GCC-box; Shinozaki a Yamaguchi-Shinozaki, 2000) a podnětů, jako je například světlo (Box II; Le Gourrierc *et al.*, 1999 a G-box; Sibéřil *et al.*, 2001). Svoji úlohu také *AtMKK5* hraje při vývinu (DPBF1&2RAV-1; Kim *et al.*, 1997) a odolnosti rostliny vůči chorobám (W-box; Yu *et al.*, 2001). *AtMKK5* je lokalizována v jádře, dále také v plastidech a v neposlední řadě v cytosolu (databáze SUBA, Ref.12). U jejího blízkého ortologa v *M. sativa* MAP kinasy SIMKK byl za využití transientní transformace zjištěn výskyt v plazmatické membráně a v jádře, jak je uvedeno v kapitole 4.10. Interaguje s protein kinasou *AtMKK6* (databáze IntAct EMBL-EBI, Ref.14).

Na promotoru genu *AtMKK1* se nachází transkripční faktory nebo vazebná místa pro transkripční faktory podílející se na odpovědi na abiotický stres, jako je například hyperosmolarita (ATB2; Satoh *et al.*, 2004) nebo sucho (MYC2, Abe *et al.*, 1997). Také nachází uplatnění při reakci na světlo (Box II; Le Gourrierc *et al.*, 1999 a G-box; Sibéřil *et al.*, 2001). *AtMKK1* je nejvíce detekována v cytosolu, mitochondriích a v jádře. Nalezena byla rovněž v plazmatické membráně (databáze SUBA, Ref.12). U jejího blízkého ortologa v *M. sativa* MAP kinasy kinasy PRKK byl za využití transientní transformace zjištěn výskyt v plazmatické membráně a v jádře, jak je uvedeno v kapitole 4.10. Interaguje s protein kinasou MPK4, což je ortolog MMK2 v *M. sativa*, se kterým interaguje PRKK. Dále byla zjištěna interakce s MPK11 a MPK12, s dalšími ortology MsMMK2 v *M. sativa*, jak bylo zjištěno v práci Pavlíková, 2022. Dále byla zjištěna interakce s MKKK1 (databáze IntAct EMBL-EBI, Ref.14).

V dalším kroku bylo úspěšně provedeno rozmnožení transgenní linie *M. sativa* za využití metody somatické embryogeneze, přičemž získání praxe v provedení této metody je důležité, pokud chceme získat rostliny regenerované somatickou embryogenezí po stabilní transformaci za využití *A. tumefaciens*. Takovéto rostliny mohou vytvářet semena, a tak mohou být propagovány do dalších generací. Procentuální úspěšnost somatické embryogeneze 56 % je poměrně vysoká s přihlédnutím k náchylnosti rostlin k plísnovým nebo bakteriálním kontaminacím.

Výše zmíněné *A. tumefaciens* byly využity při transientní (ko-)transformaci pro studium MAP kinas, na které byla zaměřena tato práce. Lze konstatovat, že veškeré použité

konstrukty *35S::SIMK*, *35S::tagRFP::SIMKK*, *35S::mRFP::PRKK* spolu s *P19* se podařilo úspěšně transformovat do rostlin *N. benthamiana*, tudíž mohla být mikroskopicky prokázána jejich exprese i koexprese v epidermálních buňkách. Jak bylo předpokládáno, *SIMK*, *SIMKK* i *PRKK* jsou exprimovány nejen v cytoplazmatické membráně, ale také v jádře. Mezi *SIMKK* a *SIMK* byla spojením kanálů EGFP a TagRFP pozorována koexprese, jež byla viditelná jako oranžovožlutý signál (Obr. 23; E), což potvrzuje již zjištěnou skutečnost, že v neaktivním stavu se *SIMKK* a *SIMK* nacházejí společně v cytoplasmě a jádře (Ovečka *et al.*, 2014). Také byla sledována koexprese *PRKK* a *SIMKK* za spojení kanálů EGFP a mRFP 1.2 (Obr. 23, F) (Cardinale *et al.*, 2002).

Ze sledování fenotypu transientně transformovaných listů *N. benthamiana* v čase lze vyvodit zapojení *SIMKK* a *PRKK* v projevech buněčné smrti v počátečním intervalu od infiltrace, a to především z důvodu výraznější nekrózy u listů nadměrně *SIMK* v čase 14 DAT, zatímco v případě koexprese s upstream kinasami *SIMKK* a *PRKK* bylo možné nekrózu zaznamenat už v čase 7 DAT. Rovněž bylo možné pozorovat, že u samotné *SIMKK* k projevům buněčné smrti dochází dříve než u *PRKK*, což zřejmě může souviset se schopností *SIMKK* se autofosforylovat, na rozdíl od *PRKK*, která pro svoji aktivaci vyžaduje příslušnou MAPKKK, jak zmiňuje Kiegerl *et al.*, 2000.

U transgenních rostlin linií *SIMKKi* a GFP-*SIMK* a kontrolní linie RSY bylo provedeno automatické měření velikosti ploch xylémových buněk na transversálních řezech. U transgenních linií se v případě parametru plochy průtoku xylémových buněk lišila distribuce v porovnání s kontrolní linií. Linie GFP-*SIMK* vykazovala posun v distribuci ve prospěch větších buněk. Naopak u buněk v linii *SIMKKi* je patrná distribuce spíše ve prospěch menších buněk. Tyto trendy byly pozorovatelné i u parametrů délky a šířky jakožto blízkce souvisejících parametrů. Co se týče kruhovitosti, u linie GFP-*SIMK* je větší podíl více kruhovitých buněk oproti ostatním dvěma liniím.

Výše uvedené může vést k hypotéze, že nadměrná exprese *SIMK* nebo naopak downregulace genů *SIMK* a *SIMKK* může ovlivňovat parametry buněk xylému jakožto důležitého vodivého pletiva pro rozvod živin. Transpiračním proudem je umožněn posun vody a minerálních živin z kořenů do nadzemní části rostliny. Větší xylemové buňky, umožňují průtok většího množství živin, což může korelovat s nárůstem nadzemní biomasy u rostlin linie GFP-*SIMK*. Výše zjištěné by tedy korespondovalo se zjištěním (Hrbáčková *et al.*, 2020b), že genetické manipulace ve smyslu downregulace nebo nadměrné exprese *SIMK* ovlivňují fenotyp rostlin (nadzemní biomasa, kořenové vlášení, tvorba nodulů). Při bližším zkoumání distribuce velikosti buněk po jejich rozdělení do velikostních intervalů

bylo zjištěno, že u protoxylému je u linie SIMKKi distribuce posunuta ve prospěch menších buněk, zatímco u rostlin GFP-SIMK linie byl pozorovatelný posun ve prospěch větších protoxylémových buněk. Pro konstatování relevantních závěrů by bylo vhodné experiment zopakovat s více opakováními, tedy přidat další biologické repliky a také by bylo nezbytné přidat technické repliky (stonky na rostlině, více obrázků z jedné biologické repliky). Byl proveden dvouvýběrový t-test mezi kontrolní linií RSY a SIMKKi nebo GFP-SIMK, avšak jelikož byly použity pouze tři biologické repliky na jednu linii, p nebylo menší než zvolená hladina významnosti 0,05, tudíž výsledek není statisticky významný.

Z obrázku 20 je patrné, že ne všechny buňky lze měřit z důvodu nastavení prahování. V rámci optimalizace metody by se ale pro měření okrajových buněk s tenkými buněčnými stěnami dalo prahování dělat postupně, tedy zhotovením více variant prahu pro jeden obrázek. U metaxylému (Obr. 22, C) chybí v některých velikostních intervalech (SIMKKi_i600 a GFP-SIMK_i500) data, jelikož nebyly zjištěny buňky, které by se v daných intervalech nacházely. Tato skutečnost znesnadňuje přesnou interpretaci výsledků ohledně distribuce velikost metaxylémových buněk.

Využití ručních řezů, barvení a automatizovaného měření za použití softwaru (program ImageJ) xylémových buněk otevírá dveře pro další experimenty zaměřené na sledování fenotypu a následného statistického vyhodnocení u transgenních rostlin. Do budoucna by mohlo být potenciálním předmětem zkoumání například mikroskopické měření tloušťky buněčných stěn xylému, floému, ale i sklerenchymu a jiných rostlinných pletiv. Dále by mohlo být využito barvení buněčné stěny calcofluorem (calcofluor white), který fluorescenčně barví celulózu (Ursache *et al.*, 2017; Kitin *et al.*, 2020), nebo dalších barviv vizualizujících polysacharidy (pektin) v buněčné stěně (Bidhendi *et al.*, 2020).

7 ZÁVĚR

Stěžejním předmětem teoretické části bylo studium mitogen aktivovaných protein kinas, a to zejména v *M. sativa*, *A. thaliana* a v také dalších druzích zahrnujících *M. truncatula* a *O. sativa*, čemuž ale nejdříve předcházela botanická charakteristika *M. sativa*, *A. thaliana* a *M. truncatula* a také pro porozumění celé problematiky nezbytný popis obecného modelu signalizační kaskády MAP kinas. U *M. sativa* a *A. thaliana* byly pro rešerši vybrány nejznámější a nejvíce opublikované MAP kinasy, kdy byl kladen důraz také na SIMK a její nadřazené kinasy SIMKK a PRKK, jakožto klíčové kinasy studované v této bakalářské práci, nejen v části teoretické. Rovněž byla popsána role MAP kinas nejen při vývinu rostliny, ale také při odpovědi na biotický stres a různé formy stresu abiotického.

Praktická část setávala ze čtyř hlavních bodů, kdy prvním bodem byly *in silico* analýzy proteinů AtMKK5 a AtMKK1 v *A. thaliana*, a to z důvodu jejich blízké ortologie k proteinům SIMKK a PRKK v *M. sativa*. *In silico* analýza byla zaměřena na analýzu promotoru, subcelulární lokalizace, mutace a polymorfismy a také na protein-proteinové interakce s dalšími kinasami. Dále byla pro naučení metody provedena somatická embryogeneze transgenních rostlin *M. sativa* 35S::tagRFP-TUA6, kdy hlavním výsledkem bylo potvrzení červeného signálu cytoskeletárního markeru tagRFP-TUA6 ve vývojových fázích získaných embryí. Sledování fenotypu bylo další nedílnou součástí praktické části. Z experimentu automatického měření plochy průtoku xylémových buněk vyplývá, že downregulace nebo nadměrná exprese *SIMK* za účelem genetické manipulace ovlivňuje distribuci velikosti buněk xylému rostliny v případě linie SIMKKi směrem doleva od normálního rozdělení a u linie GFP-SIMK směrem doprava od normálního rozdělení. V posledním bodu byla realizována transientní (ko-)transformace listů *N. benthamiana* s fluorescenčně značenými MAP kinasami. Bylo zjištěno, že SIMK, SIMKK a PRKK jsou exprimovány v cytoplazmatické membráně a také v jádře. Spojením kanálů EGFP a TagRFP nebo mRFP 1.2 byla verifikována koexprese SIMK-SIMKK a SIMK-PRKK, kterou bylo možné potvrdit díky přítomnosti oranžovožlutého signálu. V průběhu 21 dní byl sledována fenotyp transientně transformovaných listů. Ze získaných dat se můžeme domnívat, že SIMKK a PRKK mají vliv na urychlení projevů buněčné smrti v počátečním intervalu od infiltrace.

8 LITERATURA

8.1 Odborná literatura

- Abe H., Yamaguchi-Shinozaki K., Urao T., Iwasaki T., Hosokawa D., Shinozaki K. (1997): Role of arabidopsis MYC and MYB homologs in drought-and abscisic acidregulated gene expression. *The Plant Cell* 9(10): 1859–1868.
- Abe M., Takahashi T., Komeda Y. (2001): Identification of a cis-regulatory element for L1 layer-specific gene expression, which is targeted by an L1-specific homeodomain protein. *The Plant Journal* 26(5):487-94.
- Agrawal GK., Iwahashi H., Rakwal R. (2003): Rice MAPKs. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 302(2):171-80.
- Altmann M., Altmann S., Rodriguez P. A., Weller B., Elorduy Vergara L., Palme J., Marín-de la Rosa N., Sauer M., Wenig M., Villaécija-Aguilar J. A., Sales J., Lin C. W., Pandiarajan R., Young V., Strobel A., Gross L., Carbonnel S., Kugler K. G., Garcia-Molina A., Bassel G. W., Falter C., Mayer K. F. X., Gutjahr C., Vlot A. C., Grill E., Falter-Braun P. (2020): Extensive signal integration by the phytohormone protein network. *Nature*. 583(7815):271-276. Epub 2020 Jul 1. Erratum in: *Nature*. 584(7821): E34.
- Bao X., Franks R. G., Levin J. Z., Liu Z. (2004): Repression of AGAMOUS by BELLRINGER in floral and inflorescence meristems. *ThePlant Cell.*; 16(6): 1478-1489.
- Barker D., Bianchi S., Blondon F., Dattée Y., Duc G., Essad S., Flament P., Gallusci P., Génier G., Guy P., Muel X., Tourneur J., Dénarié J., Huguet T. (1990): *Medicago truncatula*, a model plant for studying the molecular genetics of the Rhizobium-legume symbiosis. *Plant Molecular Biology Reporter* 8, 40–49.
- Bayer M., Nawy T., Giglione C., Galli M., Meinnel T., Lukowitz W. (2009): Paternal control of embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 323: 1485–1488.
- Bi G., Zhou Z., Wang W., Li L., Rao S., Wu Y., Zhang X., Menke FLH., Chen S., Zhou JM. (2018): Receptor-like cytoplasmic kinases directly link diverse pattern recognition receptors to the activation of mitogen-activated protein kinase cascades in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 30: 1543-1561.
- Bidhendi AJ., Chebli Y., Geitmann A. (2020): Fluorescence visualization of cellulose and pectin in the primary plant cell wall. *Journal of Microscopy* 278(3):164-181.
- Bigeard J., Hirt H. (2018): Nuclear Signaling of Plant MAPKs. *Frontiers in Plant Science* 9:469.

- Bögre 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. *The Plant Cell* 11(1): 101-13.
- Bosseno M., Lambert A., Beucher D., Le Gleuher M., Aubry C., Pauly N., Montrichard F., Boscari, A. (2019): A simple method for genetic crossing in *Medicago truncatula*. In: *The Model Legume Medicago truncatula*, F. de Bruijn (Ed.).
- Campbell N., Reece J., Urry L., Cain M., Cain S., Wasserman S., Minorsky P., Jackson R (2015): *Biology: A global approach* (10th), Pearson, Harlow.
- Cao, H., Bowling, S.A., Gordon, A.S., and Dong, X. (1994): Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. *The Plant Cell* 6(11):1583-1592.
- 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.
- Cardon G., Höhmann S., Klein J., Nettlesheim K., Saedler H., Huijser P. (1999): Molecular characterisation of the *Arabidopsis* SBP-box genes. *Gene*. 237(1): 91-104.
- Danquah A., de Zelicourt A., Colcombet J., Hirt H. (2014): The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses. *Biotechnology Advances* 32(1):40-52.
- Dóczi R., Brader G., Pettkó-Szandtner A., Rajh I., Djamei A., Pitzschke A., Teige M., Hirt H. (2007): The *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinase MKK3 is upstream of group C mitogen-activated protein kinases and participates in pathogen signaling. *The Plant Cell* (10):3266-79.
- Dóczi R., Okrész L., Romero AE., Paccanaro A., Bögre (2012): Exploring the evolutionary path of plant MAPK networks. *Trends Plant Science* 17(9):518-25.
- Dostál J. (1989): *Nová květena ČSSR 1*, Academia, Praha.
- Frugoli J., Harris J. (2001): *Medicago truncatula* on the Move! *The Plant Cell* 13(3):458-63.
- Gao M., Liu J., Bi D., Zhang Z., Cheng F., Chen S., Zhang Y. (2008): MEKK1, MKK1/MKK2 and MPK4 function together in a mitogen-activated protein kinase cascade to regulate innate immunity in plants. *Cell Research* 18(12):1190-8.
- Gómez-Gómez L, Boller T. FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. (2000): *Molecular Cell*. 5(6):1003-11.

- Green PJ., Kay SA., Chua NH. (1987): Sequence-specific interactions of a pea nuclear factor with light-responsive elements upstream of the *rbcS-3A* gene. *The EMBO Journal* 6(9):2543-9.
- Guo T., Chen K., Dong NQ., Shi CL., Ye WW., Gao JP., Shan JX., Lin HX. (2018): GRAIN SIZE AND NUMBER1 Negatively Regulates the OsMKKK10-OsMKK4-OsMPK6 Cascade to Coordinate the Trade-off between Grain Number per Panicle and Grain Size in Rice. *The Plant Cell* 30(4):871-888.
- Guo T., Lu ZQ., Shan JX., Ye WW., Dong NQ., Lin HX. (2020): ERECTA1 Acts Upstream of the OsMKKK10-OsMKK4-OsMPK6 Cascade to Control Spikelet Number by Regulating Cytokinin Metabolism in Rice. *The Plant Cell* 32(9):2763-2779.
- Hrbáčková M., Dvořák P., Takáč T., Tichá M., Luptovčíak I., Šamajová O., Ovečka M., Šamaj J. (2020): Biotechnological Perspectives of Omics and Genetic Engineering Methods in Alfalfa. *Frontiers in Plant Science* 11:592.
- Hrbáčková M., Luptovčíak I., Hlaváčková K., Dvořák P., Tichá M., Šamajová O., Novák D., Bednarz H., Niehaus K., Ovečka M., Šamaj J.(2020b): Overexpression of alfalfa SIMK promotes root hair growth, nodule clustering and shoot biomass production. *Plant Biotechnology Journal* 19(4):767-784.
- Hu YX., Wang YX., Liu XF., Li JY. (2004)_ Arabidopsis RAV1 is down-regulated by brassinosteroid and may act as a negative regulator during plant development. *Cell Research* 14(1):8-15.
- Hudson M. E., Quail P. H. (2003): Identification of promoter motifs involved in the network of phytochrome A-regulated gene expression by combined analysis of genomic sequence and microarray data. *Plant Physiology* 133(4): 1605-16.
- Chan C. S., Guo L., Shih M. C. (2001): Promoter analysis of the nuclear gene encoding the chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B subunit of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 46(2): 131-141.
- Chen J., Wang L., Yuan M. (2021): Update on the Roles of Rice MAPK Cascades. *International Journal of Molecular Sciences* 22(4):1679.
- Chen, T., Zhou, B., Duan, L., Zhu, H. and Zhang, Z. (2017): MtMAPKK4 is an essential gene for growth and reproduction of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* 159: 492–503.
- Chen W., Provart N. J., Glazebrook J., Katagiri F., Chang H. S., Eulgem T., Mauch F., Luan S., Zou G., Whitham S. A., Budworth P. R., Tao Y., Xie Z., Chen X., Lam S., Kreps J. A., Harper J. F., Si-Ammour A., Mauch-Mani B., Heinlein M., Kobayashi K., Hohn T.,

- Dangl J. L., Wang X., Zhu T. (2002): Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *The Plant Cell* 14(3): 559-74.
- Cheong YH., Moon BC., Kim JK., Kim CY., Kim MC., Kim IH., Park CY., Kim JC., Park BO., Koo SC., Yoon HW., Chung WS., Lim CO., Lee SY., Cho MJ. (2003): BWMK1, a rice mitogen-activated protein kinase, locates in the nucleus and mediates pathogenesis-related gene expression by activation of a transcription factor. *Plant Physiology* 132(4):1961-72.
- Ichimura K., Mizoguchi T., Yoshida R., Yuasa T., Shinozaki K. (2000): Various abiotic stresses rapidly activate *Arabidopsis* MAP kinases AtMPK4 and AtMPK6. *The Plant Journal* 24(5), 655–665.
- Ichimura K., Shinozaki K., Tena G., Sheen J., Henry Y., Champion A., Kreis M., Zhang S., Hirt H., Wilson C., Heberle-Bors E., Ellis B.E., Morris P.C., Innes R.W., Ecker J.R., Scheel D., Klessig D.F., Machida Y., Mundy J., Ohashi Y., Walker J.C. (2002): Mitogen activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends in Plant Science* 7, 301-308.
- Jagodzick P., Tajdel-Zielinska M., Ciesla A., Marczak M., Ludwikow A. (2018): Mitogen-Activated Protein Kinase Cascades in Plant Hormone Signaling. *Frontiers in Plant Science* 9:1387.
- Jalmi SK., Sinha AK. (2016): Functional Involvement of a Mitogen Activated Protein Kinase Module, OsMKK3-OsMPK7-OsWRK30 in Mediating Resistance against *Xanthomonas oryzae* in Rice. *Scientific Report* 6:37974.
- Jia W., Li B., Li S., Liang Y., Wu X., Ma M., Wang J., Gao J., Cai Y., Zhang Y., Wang Y., Li J., Wang Y. (2016): Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade MKK7-MPK6 Plays Important Roles in Plant Development and Regulates Shoot Branching by Phosphorylating PIN1 in *Arabidopsis*. *PLOS Biology* 14(9):1002550.
- Jiang M., Zhang Y., Li P., Jian J., Zhao C., Wen G. (2022): Mitogen-Activated Protein Kinase and Substrate Identification in Plant Growth and Development. *International Journal of Molecular Sciences* 23(5):2744.
- Jonak C., Ligterink W., Hirt H (1999): MAP kinases in plant signal transduction. *Cellular and Molecular Life Science* 55(2):204-13.
- 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.
- Kagaya Y., Ohmiya K., Hattori T. (1999): RAV1, a novel DNA-binding protein, binds to

- bipartite recognition sequence through two distinct DNA-binding domains uniquely found in higher plants. *Nucleic Acids Research* 27(2): 470-8.
- Karimi M., Bleys A., Vanderhaeghen R., Hilson P. (2007): Building blocks for plant gene assembly. *Plant Physiology* 145(4):1183-91.
- Karin M. (1998): Mitogen-activated protein kinase cascades as regulators of stress responses. *Annals of the New York Academy of Sciences* 851, 139–146.
- 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.
- Kilian J., Whitehead D., Horak J., Wanke D., Weinl S., Batistic O., D'Angelo C., Bornberg-Bauer E., Kudla J. and Harter K. (2007): The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. *The Plant Journal* 50: 347-363.
- Kim JM., Woo DH., Kim SH., Lee SY., Park HY., Seok HY., Chung WS., Moon YH. (2012): *Arabidopsis* MKKK20 is involved in osmotic stress response via regulation of MPK6 activity. *The Plant Cell Reports* 31(1):217-24.
- Kim SY., Chung HJ., Thomas TL. (1997): Isolation of a novel class of bZIP transcription factors that interact with ABA-responsive and embryo-specification elements in the Dc3 promoter using a modified yeast one-hybrid system. *The Plant Journal* 11(6):1237-51.
- Kitin P., Nakaba S., Hunt CG., Lim S., Funada R. (2020): Direct fluorescence imaging of lignocellulosic and suberized cell walls in roots and stems. *AoB Plants* 12(4):plaa032.
- Klepikova A. V., Kasianov A. S., Gerasimov E. S., Logacheva M. D., Penin A. A. (2016): A high resolution map of the *Arabidopsis thaliana* developmental transcriptome based on RNA-seq profiling *The Plant Journal* 88: 1058-1070.
- 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.
- 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*. *The Plant Cell* 22(11):3778-90.
- Krishnakumar V., Kim M., Rosen BD., Karamycheva S., Bidwell SL., Tang H., Town CD. (2015): MTGD: The *Medicago truncatula* Genome Database, *Plant and Cell Physiology*.
- Küster H. (2013): *Medicago truncatula*. In: Maloy S., Hughes K. (ed.): *Brenner's encyclopedia of genetics*, 2nd edn. pp 335–337 Academic Press.

- Lamb R. S., Hill T. A., Tan Q. K., Irish V. F. (2002): Regulation of *APETALA3* floral homeotic gene expression by meristem identity genes. *Development* 2002; 129: 2079–2086.
- Le B. H., Cheng C., Bui A. Q., Wagmaister J. A., Henry K. F., Pelletier J., Kwong L., Belmonte M., Kirkbride R., Horvath S., Drews G. N., Fischer R. L., Okamura J. K., Harada J. J., Goldberg R. B. (2010): Global analysis of gene activity during *Arabidopsis* seed development and identification of seed-specific transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(18): 8063-70.
- Le Gourrierec J., Li YF., Zhou DX. (1999): Transcriptional activation by *Arabidopsis* GT-1 may be through interaction with TFIIA-TBP-TATA complex. *The Plant Journal* 18(6):663-8.
- Lee J. S., Huh K. W., Bhargava A., Ellis B. E. (2008): Comprehensive analysis of protein-protein interactions between *Arabidopsis* MAPKs and MAPK kinases helps define potential MAPK signalling modules. *Plant Signaling and Behaviour* 3(12): 1037-41.
- Li K., Yang F., Zhang G., Song S., Li Y., Ren D., Miao Y., Song CP (2017): AIK1, A Mitogen-Activated Protein Kinase, Modulates Abscisic Acid Responses through the MKK5-MPK6 Kinase Cascade. *Plant Physiology* 173(2):1391-1408.
- Li W., Xu H., Liu Y., Song L., Guo C., Shu Y. (2016): Bioinformatics Analysis of MAPKKK Family Genes in *Medicago truncatula*. *Genes (Basel)* 4;7(4):13.
- Liu XM., Kim KE., Kim KC., Nguyen XC., Han HJ., Jung MS., Kim HS., Kim SH., Park HC., Yun DJ., Chung WS. (2010): Cadmium activates *Arabidopsis* MPK3 and MPK6 via accumulation of reactive oxygen species. *Phytochemistry* 71(5-6):614-8.
- Liu Y., Leary E., Saffaf O., Frank Baker R., Zhang S. (2022): Overlapping functions of YDA and MAPKKK3/MAPKKK5 upstream of MPK3/MPK6 in plant immunity and growth/development. *Journal of Integrative Plant Biology* 64(8):1531-1542.
- Liu Y., Li J., Zhu Y., Jones A., Rose RJ., Song Y. (2019): Heat Stress in Legume Seed Setting: Effects, Causes, and Future Prospects. *Front. Plant Science* 10:938.
- Lukowitz W., Roeder A., Parmenter D., Somerville C. (2004): A MAPKK kinase gene regulates extra-embryonic cell fate in *Arabidopsis*. *Cell* 116(1):109-19.
- Malíšková A. (2021): Charakterizace SIMKK a PRKK proteinů u vojtěšky *Medicago sativa*. Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.
- McCoy, T. J., and Bingham, E. T. (1988): Cytology and cytogenetics of alfalfa. In: *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. (ed.): A. A. Hanson (Madison, WI: ASA), 737–776.
- Meng X., Wang H., He Y., Liu Y., Walker JC., Torii KU., Zhang S. (2012): A MAPK

- cascade downstream of ERECTA receptor-like protein kinase regulates *Arabidopsis* inflorescence architecture by promoting localized cell proliferation. *The Plant Cell* 24(12):4948-60.
- Menkens AE., Cashmore AR. (1994): Isolation and characterization of a fourth *Arabidopsis thaliana* G-box-binding factor, which has similarities to Fos oncoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(7):2522-6.
- Meskiene I., Baudouin E., Schweighofer A., Liwosz A., Jonak C., Rodriguez PL., Jelinek H., Hirt H. (2003): Stress-induced protein phosphatase 2C is a negative regulator of a mitogen-activated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* 278(21):18945-52.
- Meskiene I., Bögre L., Glaser W., Balog J., Brandstätter M., Zwerger K., Ammerer G., Hirt H. (1998): MP2C, a plant protein phosphatase 2C, functions as a negative regulator of mitogen-activated protein kinase pathways in yeast and plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 95(4): 1938-43.
- Mishra NS., Tuteja R, Tuteja N. (2006): Signaling through MAP kinase networks in plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 452(1):55-68.
- Mittler R., Finka A., Goloubinoff P. (2012): How do plants feel the heat? *Trends in Biochemical Sciences* 37(3):118-25.
- Mlíkovský J., Stýblo P. (2006): *Nepůvodní druhy fauny a flóry České republiky, ČSOP*, Praha.
- Murata T., Sano T., Sasabe M., Nonaka S., Higashiyama T., Hasezawa S., Machida Y., Hasebe M. (2013): Mechanism of microtubule array expansion in the cytokinetic phragmoplast. *Nature Communications* 4:1967.
- Na YJ., Choi HK., Park MY., Choi SW., Xuan Vo KT., Jeon JS., Kim SY. (2019): OsMAPKKK63 is involved in salt stress response and seed dormancy control. *Plant Signaling & Behavior* 14(3):e1578633.
- Nakagami H., Kiegerl S., Hirt H. (2004): OMTK1, a novel MAPKKK, channels oxidative stress signaling through direct MAPK interaction. *The Journal of Biological Chemistry* 279(26), 26959–26966.
- Nakagami H., Pitzschke A., Hirt H. (2005): Emerging MAP kinase pathways in plant stress signalling. *Trends in Plant Science* 10(7):339-46.
- Narsai R., Law S. R., Carrie C., Xu L., Whelan J. (2011): In-depth temporal transcriptome profiling reveals a crucial developmental switch with roles for RNA processing and organelle metabolism that are essential for germination in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 157(3): 1342-62.

- Nitta Y., Qiu Y., Yaghmaiean H., Zhang Q., Huang J., Adams K., Zhang Y. (2020): MEKK2 inhibits activation of MAP kinases in *Arabidopsis*. *Plant J*, 103: 705-714.
- Ouaked F., Rozhon W., Lecourieux D., Hirt H. (2003): A MAPK pathway mediates ethylene signaling in plants. *The EMBO Journal* 22(6):1282-8.
- Ovečka M., Lichtscheidl I. K., Baluška F., Šamaj J., Volkmann D., Hirt H. (2008): Regulation Of Root Hair Tip Growth: Can Mitogen-Activated Protein Kinases Be Taken Into Account? In: Blume, Y.B., Baird, W.V., Yemets, A.I., Breviario, D. (eds) *The Plant Cytoskeleton: a Key Tool for Agro-Biotechnology*. NATO Science for Peace and Security Series C: Environmental Security. Springer, Dordrecht.
- Ovečka M., Takáč T., Komis G., Vadovič P., Bekešová S., Doskočilová A., Šamajová V., Luptovčiak I., Šamajová O., Schweighofer A., Meskiene I., Jonak C., Křenek P., Lichtscheidl I., Škultéty L., Hirt H., Šamaj J. (2014): Salt-induced subcellular kinase relocation and seedling susceptibility caused by overexpression of *Medicago* SIMKK in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 65(9):2335-50.
- Pavlíková M. (2022): Úlohy vybraných MAPK proteinů u vojtěšky *Medicago sativa*. Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.
- Petersen M., Brodersen P., Naested H, Andreasson E., Lindhart U., Johansen B., Nielsen HB., Lacy M., Austin MJ., Parker JE., Sharma SB., Klessig DF, Martienssen R, Mattsson O, Jensen AB, Mundy J. (2000): *Arabidopsis* map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* 103(7):1111-20.
- Pilát A. (1968): Kapesní atlas rostlin (Vyd. 4.), Státní pedagogické nakladatelství, Praha.
- Pitzschke A., Schikora A., Hirt H. (2009): MAPK cascade signalling networks in plant defence. *Current Opinion in Plant Biology* 12(4):421-6.
- Rodriguez MC., Petersen M., Mundy J. (2010): Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* 61:621-49.
- Ryals J., Weymann K., Lawton K., Friedrich L., Ellis D., Steiner HY., Johnson J., Delaney TP., Jesse T., Vos P., Uknes S. (1997): The *Arabidopsis* NIM1 protein shows homology to the mammalian transcription factor inhibitor I kappa B. *The Plant Cell* 9(3):425-39.
- Ryu H., Laffont C., Frugier F., Hwang I. (2017): MAP Kinase-Mediated Negative Regulation of Symbiotic Nodule Formation in *Medicago truncatula*. *Molecules and Cells* 40(1):17-23.
- Ryu K. H., Huang L., Kang H. M., Schiefelbein J. (2019): Single-Cell RNA Sequencing Resolves Molecular Relationships Among Individual Plant Cells. *Plant Physiology*. 179(4): 1444-1456.

- Samac, D.A. and Austin-Phillips, S. (2006) Alfalfa (*Medicago sativa* L.). In *Agrobacterium Protocols. Methods in Molecular Biology*. (Wang, K., ed) 343, pp, 301–312. Clifton, N.J.: Humana Press.
- Sangwan V., Dhindsa R.S. (2002): In vivo and in vitro activation of temperature-responsive plant MAP Kinases. *FEBS Letters* 531, 561–564.
- Satoh R., Fujita Y., Nakashima K., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2004): A novel subgroup of bZIP proteins functions as transcriptional activators in hypoosmolarity-responsive expression of the ProDH gene in Arabidopsis. *Plant Cell Physiology*. 45(3): 309-17.
- Seffens WS., Almoguera C., Wilde HD., Vonder Haar RA., Thomas TL. (1990): Molecular analysis of a phylogenetically conserved carrot gene: developmental and environmental regulation. *Developmental Genetics* 11(1):65-76.
- Sharma, D., Verma, N., Pandey, C., Verma, D., Bhagat, P.K., Noryang, S., Singh, K. Tayyeba, S., Banerjee, G. and Sinha, A.K. (2020): MAP kinase as regulators for stress responses in plants: An overview. In: Pandey, G.K. (Ed.), *Protein Kinases and Stress Signaling in Plants: Functional Genomic Perspective*, John Wiley & Sons Ltd. pp. 369-392.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology* 3(3):217-23.
- Sibérel Y., Doireau P., Gantet P. (2001): Plant bZIP G-box binding factors. Modular structure and activation mechanisms. *European Journal of Biochemistry* 268(22):5655-66.
- Singh R., Jwa NS. (2013): The rice MAPKK-MAPK interactome: the biological significance of MAPK components in hormone signal transduction. *Plant Cell Reports* 32(6):923-31.
- Sinha AK., Jaggi M., Raghuram B., Tuteja N. (2011): Mitogen-activated protein kinase signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signaling and Behavior* 6(2):196-203.
- 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.
- Song Y., Lv J., Ma Z., Dong W. (2019): The mechanism of alfalfa (*Medicago sativa* L.) response to abiotic stress. *Plant Growth Regul* 89, 239–249.
- Sopeña-Torres S., Jordá L., Sánchez-Rodríguez C., Miedes E., Escudero V., Swami S.,

- López G., Piślewska-Bednarek M., Lassowskat I., Lee J., Gu Y., Haigis S., Alexander D., Pattathil S., Muñoz-Barrios A., Bednarek P., Somerville S., Schulze-Lefert P., Hahn MG., Scheel D., Molina A. (2018): YODA MAP3K kinase regulates plant immune responses conferring broad-spectrum disease resistance. *New Phytologist* 218(2):661-680
- Sözen C., Schenk ST., Boudsocq M., Chardin C., Almeida-Trapp M., Krapp A., Hirt H., Mithöfer A., Colcombet J (2020): Wounding and Insect Feeding Trigger Two Independent MAPK Pathways with Distinct Regulation and Kinetics. *The Plant Cell* 32(6):1988-2003.
- Suliman S., Ha CV., Schulze J., Tran LS. (2013): Growth and nodulation of symbiotic *Medicago truncatula* at different levels of phosphorus availability. *Journal of Experimental Botany* 64(10):2701-12.
- Sun T., Nitta Y., Zhang Q., Wu D., Tian H., Lee JS. Zhang Y. (2018): Antagonistic interactions between two MAP kinase cascades in plant development and immune signaling. *EMBO Rep* 19(7): e45324
- Šamaj J., Baluška F., Hirt H (2004): From signal to cell polarity: mitogen-activated protein kinases as sensors and effectors of cytoskeleton dynamicity, *Journal of Experimental Botany* 55, 189-198
- Šamaj J., Ovečka M., Hlavačka 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. *The EMBO Journal* 21(13):3296-306.
- Šamajová O., Komis G., Šamaj J. (2013): Emerging topics in the cell biology of mitogen-activated protein kinases. *Trends in Plant Science* 18(3), 140-148.
- Taj G., Agarwal P., Grant M., Kumar A. (2010): MAPK machinery in plants: recognition and response to different stresses through multiple signal transduction pathways. *Plant Signaling and Behavior* (11):1370-8
- Teakle G. R., Manfield I. W., Graham J. F., Gilmartin P. M. (2002): *Arabidopsis thaliana* GATA factors: organisation, expression and DNA-binding characteristics. *Plant Molecular Biology* 250(1): 43-57.
- Tena G., Asai T., Chiu WL., Sheen J. (2001): Plant mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Current Opinion in Plant Biology* 4, 392–400.
- Ulmasov T., Hagen G., Guilfoyle T. J. (1999): Dimerization and DNA binding of auxin response factors. *The Plant Journal* 19(3): 309-19.
- Ursache R., Andersen TG., Marhavý P., Geldner N. (2018): A protocol for combining

- fluorescent proteins with histological stains for diverse cell wall components. *The Plant Journal* 93(2):399-412.
- Valíček P. (2002): *Užitkové rostliny tropů a subtropů* (Vyd. 2), Academia, Praha.
- Van Hoewyk D., Takahashi H., Inoue E., Hess A., Tamaoki M., Pilon-Smits E. A. H. (2008): Transcriptome analyses give insights into selenium-stress responses and selenium tolerance mechanisms in *Arabidopsis*. *Physiologia Plantarum*, 132: 236-253.
- Wang F., Jing W., Zhang W. (2014): The mitogen-activated protein kinase cascade MKK1-MPK4 mediates salt signaling in rice. *Plant Science* 227:181-9.
- Wang H., Ngwenyama N., Liu Y., Walker JC., Zhang S. (2007): Stomatal development and patterning are regulated by environmentally responsive mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 19: 63–73.
- Wang Q., Liu J., Zhu H. (2018): Genetic and Molecular Mechanisms Underlying Symbiotic Specificity in Legume-Rhizobium Interactions. *Frontiers in Plant Science* 9:313.
- Wang W., Vinocur B., Altman A (2003): Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218(1):1-14.
- Wang Y., Wu Y., Zhang H., Wang P., Xia Y. (2022): *Arabidopsis* MAPKK kinases YODA, MAPKKK3, and MAPKKK5 are functionally redundant in development and immunity. *Plant Physiology* 0:0(1-5).
- Wang Z., Gou X. (2020): Receptor-Like Protein Kinases Function Upstream of MAPKs in Regulating Plant Development. *International Journal of Molecular Sciences* 21(20):7638.
- Whitmarsh AJ., Davis RJ. (1998): Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals. *Trends in Biochemical Sciences* 23(12):481-5.
- Winter D., Vinegar B., Nahal H., Ammar R., Wilson G. V., Provart N. J. (2007): An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS One*. 2007 Aug 8; 2(8): e718.
- Xu J., Zhang S. (2015): Mitogen-activated protein kinase cascades in signaling plant growth and development. *Trends in Plant Science* 20(1):56-64.
- Xu R., Duan P., Yu H., Zhou Z., Zhang B., Wang R., Li J., Zhang G., Zhuang S., Lyu J., Li N., Chai T., Tian Z., Yao S., Li Y. (2018): Control of Grain Size and Weight by the OsMKKK10-OsMKK4-OsMAPK6 Signaling Pathway in Rice. *Molecular Plant* 11(6):860-873.
- Yoo SJ., Kim SH., Kim MJ., Ryu CM., Kim YC., Cho BH., Yang KY. (2014): Involvement of the OsMKK4-OsMPK1 Cascade and its Downstream Transcription Factor

- OsWRKY53 in the Wounding Response in Rice. *The Plant Pathology Journal* 30(2):168-77.
- Yu D., Chen C., Chen Z. (2001): Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of NPR1 gene expression. *The Plant Cell* 13(7):1527-40.
- Zhang M., Zhang S. (2022): Mitogen-activated protein kinase cascades in plant signaling. *Journal of Integrative Plant Biology* 64(2):301-341.
- Zhang T., Liu Y., Yang T., Zhang L., Xu S., Xue. L, An L. (2006): Diverse signals converge at MAPK cascades in plant. *Plant Physiology and Biochemistry* 44(5-6):274-83.
- 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 Reports*18(2):292-302.
- Zhou C., Cai Z., Guo Y., Gan S. (2009): An Arabidopsis mitogen-activated protein kinase cascade, MKK9-MPK6, plays a role in leaf senescence. *Plant Physiology* 150(1):167-77.

8.2 Hypertextové odkazy

Ref1: https://www.botanickafotogalerie.cz/fotogalerie.php?lng=cz&latName=Medicago%20sativa&czName=tolice%2520set%25C3%25A1%2520%28vojt%25C4%259B%25C5%25A1ka%29&title=Medicago%2520sativa%2520%7C%2520tolice%2520set%25C3%25A1%2520%28vojt%25C4%259B%25C5%25A1ka%29&showPhoto_variant=photo_description&show_sp_descr=true&spec_syntax=species&sortby=lat

Ref 2: <http://flora.upol.cz/fotogalerie/info/7393-Medicago-sativa.html>

Ref 3: http://idtools.org/id/table_grape/weed-tool/key/GrapeSeedKey/Media/Html/fact_sheets/Med-sat.html

Ref 4: <http://www.freenatureimages.eu/plants/Flora%20J-N/Medicago%20truncatula/index.html>

Ref 5: <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:506474-1>

Ref 6: <http://flora.upol.cz/fotogalerie/info/5482-Arabidopsis-thaliana/0-42.html>

Ref7: https://www.botanickafotogalerie.cz/fotogalerie.php?lng=cz&latName=Arabidopsis%20thaliana&showPhoto_variant=photo_description&show_sp_descr=true&spec_syntax=species&sortby=lat

Ref 8: <https://nightsea.com/galleries/arabidopsis/>

Ref 9: <https://swissmodel.expasy.org/> (navštíveno 6.12.2021)

Ref 10: <https://www.uniprot.org/> (navštíveno 28.11.2021)

Ref 11: <https://agris-knowledgebase.org/> (navštíveno 28.11.2021)

Ref 12: <https://suba.live/> (navštíveno 6.12.2021)

Ref 13: <https://www.arabidopsis.org/> (navštíveno 13.11.2021)

Ref 14: <https://www.ebi.ac.uk/intact/home> (navštíveno 13.11.2021)

Ref 15: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (navštíveno 4.12.2021)

9 PŘÍLOHY

Příloha 1: Sekvence (nukleotidové a proteinové) analyzovaných MAPK kinas (AtMKK1 a AtMKK5)

Příloha 1: Sekvence (nukleotidové a proteinové) analyzovaných MAPK kinas (AtMKK1 a AtMKK5)

1. AtMKK5 nukleotidová sekvence (zdroj: NCBI, Ref.15)

>NM_001338511.1 *Arabidopsis thaliana* MAP kinase kinase 5 (MKK5), mRNA

ATGAAACCGATTCAATCTCCTTCTGGAGTAGCTTCACCTATGAAGAACCGTT
TACGCAAACGTCCTGACCTAAGCTTACCACTCCCACACCGCGACGTCGCTCTCGCCGTACT
CTCCCTCTCCACCTCCTTCTCCTTCCATCCGCTCCGGCGTCTTCCCTCCGCGATCTCAA
CCAACATCTCCGCCGCTAAAAGCTTATCCGAGCTAGAACGAGTGAACCGAATCGGAAGCGG
AGCCGGAGGAACGGTTTACAAAGTAATCCCACTCCGACGTCACGTCCTTTCGCTCTCAA
GTGATTTACGGAAACCACGAAGATACCGTGAGACGTCAGATCTGTAGAGAGATCGAGATCT
TAAGAAGTGGTTCATCCAAACGTTGTGAAATGTCACGATATGTTTGATCATAACGGTGA
GATCCAGGTTTTGCTTGAGTTTATGGATCAAGGATCTCTTGAAGGAGCTCATATATGGCAA
GAACAGGAATTAGCTGATCTCTCTCGTCAGATTCTTAGTGGATTAGCTTATCTTCATCGTC
GTCATATCGTTCATCGTGATATCAAACCTTCGAATCTTCTTATAAACTCAGCTAAAAATGT
GAAAATTGCTGATTTTGGTGTGAGTAGGATCTTGGCACAAACAATGGATCCTTGTAATTCA
TCTGTTGGTACTATTGCTTATATGAGTCCTGAGAGGATTAATACTGATTTGAATCATGGTC
GTTACGATGGTTATGCTGGAGATGTTTGGAGTTTAGGTGTTAGTATCTTGGAGTTTTACTT
GGGAGGTTTTCTTTTGCTGTGAGTAGACAAGGTGATTGGGCTAGTCTTATGTGTGCTATT
TGTATGTCTCAGCCACCTGAAGCTCCGGCTACGGCGTCTCAGGAGTTTCGTCACCTTTGTTT
CTTGTTGTTTACAGAGTGATCCTCCTAAGAGATGGTCAGCTCAACAGCTTTTGCAGCATCC
TTTCATACTTAAAGCTACCGGTGGTCCTAATCTCCGTCAAATGTTGCCGCCGCCCTCGTCCT
CTTCTTCTGCCTCTTAG

2. AtMKK5 proteinová sekvence (zdroj: NCBI, Ref. 15)

>NP_001319606.1 MAP kinase kinase 5 [*Arabidopsis thaliana*]

MKPIQSPSGVASPMKNRLRKRPDLSLPLPHRDVALAVPLPLPPSSSSSSAPASSSAISTNI
SAAKSLSELERVNRIGSGAGGTVYKVIHTPTSRPFALKVIYGNHEDTVRRQICREIEILRS
VDHPNVVKCHDMFDHNGEIQVLLLEFMDQGSLEGAHIWQEQLADLSRQILSGLAYLHRRHI
VHRDIKPSNLLINSAKNVKIADFGVSRILAQTMDPCNSSVGTIAYMSPERINTDLNHGRYD
GYAGDVWSLGVSI LEFYLGFRFPFAVSRQGDWASLMCAICMSQPPEAPATASQEFRHFVSCC
LQSDPPKRWSAQQLLQHPFILKATGGPNLRQMLPPPRPLPS

3. AtMKK1 nukleotidová sekvence (zdroj: NCBI, Ref. 15)

>NM_202890.2 *Arabidopsis thaliana* MAP kinase/ ERK kinase 1 (MEK1), mRNA

ATGAACAGAGGAAGCTTATGCCCTAATCCCATCTGTCTCCCTCCTCTTGAGCAATCCATCT
CCAAATTCTTAACACAGAGTGGAACGTTTAAAGATGGAGATCTTCGAGTGAACAAAGATGG
AATCCAGACCGTGTCTCTGTCCGAACCAGGAGCTCCACCTCCTATTGAGCCATTGGACAAC
CAATTGAGTTTGGCAGATTTAGAAGTGATCAAAGTCATTGGCAAAGGAAGTAGTGGTAATG
TCCAGTTGGTCAAACACAACTCACTCAACAGTTTTTCGCTCTTAAGGTCATTCAATTGAA
CACAGAAGAATCAACATGTCTGGGCGATTTCTCAGGAGCTGAGAATAAACTTGAGCTCGCAA
TGTCATATCTTGTCTCATGTTATCAATCTTCTACCACAACGGTCTTGTTCATCATAT
TGGAATTCATGGATGGTGGATCCCTTGCAGACTTGTTAAAGAAAGTCGGAAAAGTTCCTGA
AAACATGCTATCTGCCATCTGCAAGCGAGTTCTTCGAGGTCTTTGTTATATTCATCATGAG
AGGCGAATCATTTCATCGGGACTTAAAGCCTTCAAACCTTGCTAATCAATCATAGAGGTGAAG
TCAAGATCA CAGACTTTGGTGTCTCAGCAAGATCTTGACAAGCACAAGTAGTCTTGCTAATT
CTTTCGTGGGCACATACCCTTATATGTCTCCAGAGAGAATCAGCGGGAGTTTGTACAGTAA
CAAGAGCGATATTTGGAGCTTGGGACTGGTTTTGCTCGAATGTGCAACGGGTAAATTCCTG
TATACTCCTCCAGAACACAAGAAAGGATGGAGTAGCGTGTACGAGCTTGTGGACGCCATTG
TTGAAAACCCGCCTCCTTGTGCACCTTCCAATCTCTTTTCTCCAGAGTTTTGCTCCTTCAT
CTCGCAATGTGTACAAAAAGATCCAAGGGACAGAAAATCAGCAAAGGAGCTTCTGGAACAC
AAGTTCGTAAAGATGTTTGAAGATTCGGATACAAATCTCTCGGCTTACTTCACCGACGCAG
GATCTTTGATTCCCCCACTTGCTAACTAGAA

4. AtMKK1 proteinová sekvence (zdroj: NCBI, Ref. 15)

>NP_974619.1 MAP kinase/ ERK kinase 1 [*Arabidopsis thaliana*]

MNRGSLCPNPICLPPLEQSIKFLTQSGTFKDGDLRVNKDGIQTVSLSEPGAPPIEPLDN
QLSLADLEVIKVIKVGSSGNVQLVKHKLTQQFFALKVIQLNTEESTCRAISQELRINLSSQ
CPYLVSCYQSFYHNLVSIILEFMDGGSLADLLKKVGVKVPENMLSAICKRVLRLGLCYIHHE
RRIIHRDLKPSNLLINHRGEVKITDFGVSKILTSTSSLANSFVGTYPYMSPERISGSLYSN
KSDIWSLGLVLLCATGKFPYTPPEHKKGWSSVYELVDAIVENPPPCAPSNLFSPEFCSFI
SQCVOQKDRDRKSAKELLEHKFVKMFEDSDTNLSAYFTDAGSLIPPLAN