

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Charakterizace transkripčních variant
„zinc finger“ proteinu YY1 u modelové
rostliny *Arabidopsis thaliana***

Bakalářská práce

Martina Tučková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2018

Vedoucí práce: Mgr. Hana Jeřábková, Ph.D.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Charakterizace transkripčních variant „zinc finger“ proteinu YY1 v modelové rostlině *Arabidopsis thaliana* zpracovala samostatně s použitím uvedených literárních zdrojů a pod vedením Mgr. Hany Jeřábkové, Ph.D.

V Olomouci dne:

.....

Martina Tučková

SOUHRN

Transkripční faktory jsou klíčovými regulátory biologických procesů. Prostřednictvím specifické vazby s DNA se podílí na kontrole exprese cílových genů. Regulace genové exprese je nezbytná pro řízení buněčného růstu, vývoje a diferenciaci. Yin Yang 1 (YY1) je evolučně konzervovaný transkripční faktor patřící do skupiny C2H2 zinc finger proteinů, který má schopnost transkripci aktivovat i potlačovat v závislosti na kontextu, ve kterém se váže.

Cílem této práce byla charakterizace tří transkripčních variant genu pro YY1 u modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* (AT4G06634). Jejich studium zahrnovalo počáteční analýzu *in silico*, kdy byla porovnávána jejich vzájemná podobnost a experimentální analýzu, při které byla ověřována lokalizace proteinu YY1 v rostlinné buňce. Tato analýza zahrnovala vytvoření vhodných konstruktů pomocí Gateway® klonovací technologie následované vnesením těchto konstruktů pomocí *Agrobacterium tumefaciens* do rostlin a suspenzních buněčných kultur *A. thaliana*. Úspěšnost transformace byla následně hodnocena s využitím fluorescenční mikroskopie.

Výsledky *in silico* analýzy prokázaly vysokou podobnost všech tří transkripčních variant AtYY1, a to především v oblastech zinc finger domén. Nejvyšší podobnost byla zjištěna pro transkripční varianty 1 a 3. V rámci experimentální analýzy byly cíle naplněny pouze částečně. Pro transkripční varianty 1 a 2 byla potvrzena lokalizace v interfázním jádře, transkripční variantu 3 se však naklonovat nepodařilo.

SUMMARY

Transcription factors are the key regulators of biological processes. These factors are involved in controlling the expression of target genes by their specific interactions with DNA. Gene expression regulation is essential for cell growth control, development and differentiation. Yin Yang 1 (YY1) is an evolutionarily conserved transcription factor belonging to the C2H2 zinc finger protein group and has the ability to both activate and suppress transcription depending on the context in which it binds.

The aim of this bachelor thesis was the characterization of three transcription variants of YY1 gene (AT4G06634) for the *Arabidopsis thaliana* as a model plant. The study of these variants included an initial *in silico* analysis, which compared their similarities and an experimental analysis, during which the localization of YY1 protein in the plant cell was verified. This analysis involved creating suitable constructs using Gateway® cloning technology followed by introducing these constructs into the *A. thaliana* plants and suspension cell cultures using *Agrobacterium tumefaciens*. The success of the transformation was then evaluated with the use of fluorescence microscopy.

Results of the *in silico* analysis have shown high similarity of all three AtYY1 transcription variants, particularly in zinc finger domains. The highest similarity was found for transcription variants 1 and 3. Within experimental analysis the targets were met only partially. The localization in an interphase nucleus was confirmed for transcription variants 1 and 2, transcription variant 3, however, had failed to be cloned.

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla poděkovat své školitelce Mgr. Haně Jeřábkové, Ph.D. za věnovaný čas, ochotu a odborné vedení při zpracovávání bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat také Ing. Beátě Petrovské, Ph.D.

OBSAH

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK	vii
SEZNAM OBRÁZKŮ	viii
SEZNAM TABULEK.....	ix
SEZNAM PŘÍLOH.....	x
1 ÚVOD	1
2 CÍLE PRÁCE	2
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	3
3.1 Transkripční faktory.....	3
3.2 Zinc finger proteiny	5
3.3 Protein YY1 u živočichů.....	7
3.3.1 Struktura a funkce proteinu YY1	7
3.3.2 Role proteinu YY1 v transkripční regulaci	9
3.4 Protein YY1 u rostlin	11
3.5 Gateway technologie klonování.....	13
4 MATERIÁL A METODY	14
4.1 Biologický materiál.....	14
4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky.....	15
4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení	17
4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy	18
4.4.1 <i>In silico</i> analýza transkripčních variant proteinu AtYY1	18
4.4.2 Navržení <i>attB</i> PCR primerů	18
4.4.3 Příprava <i>attB</i> -PCR produktů.....	19
4.4.4 BP reakce	20
4.4.5 Transformace bakterií <i>Escherichia coli</i>	21
4.4.6 LR reakce	22
4.4.7 Transformace bakterií <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	23
4.4.8 Transformace suspenzních buněčných kultur	23
4.4.9 Transformace a selekce rostlin.....	24
5 VÝSLEDKY	25
5.1 <i>In silico</i> analýza transkripčních variant proteinu AtYY1	25
5.2 Navržení <i>attB</i> PCR primerů.....	29
5.3 Příprava <i>attB</i> -PCR produktů.....	30
5.4 BP reakce a transformace bakterií <i>Escherichia coli</i>	30
5.5 LR reakce a transformace bakterií <i>Escherichia coli</i>	31
5.6 Transformace bakterií <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	32

5.7 Transformace suspenzních buněčných kultur	33
5.8 Transformace a selekce rostlin.....	34
6 DISKUZE.....	36
7 ZÁVĚR	38
8 LITERATURA.....	39
9 PŘÍLOHY	45

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

ABA	kyselina abscisová
ABI4	abscisic acid insensitive 4
ABR1	abscisic acid repressor 1
AP1	activating protein 1
AtYY1	<i>Arabidopsis thaliana</i> Yin Yang 1
bZIP	basic-region leucine zipper
C2H2	zinc finger doména (cys2-his2)
CF1	common factor 1
CK2	kasein kináza 2
CTCF	CCCTC-binding factor
DNMT	DNA methyltransferáza
E1A	adenovirus early region 1A
ERBB2	human epidermal growth factor receptor 2
Ezh2	enhancer of zeste homolog 2
GFP	zelený fluorescenční protein
GR	glukokortikoidní receptor
HDAC	histon deacetyláza
HMG1	high mobility group 1
HTH	helix-turn-helix
IHF	integration host factor
LIM	Lin-11, Isl-1, Mec-3
MED18	mediator 18
NF-E1	nuclear factor erythroid 1
OD	optická hustota
PHD	plant homeodomain
pRb	retinoblastomový protein
PRMT1	protein arginine methyltransferase 1
PTEN	phosphatase and tensin homolog
RFP	červený fluorescenční protein
RING	really interesting new gene
SMC	structural maintenance of chromosomes
TAD	topologicky asociovaná doména
TF	transkripční faktor
UCRBP	upstream conserved region-binding protein
YY1	Yin Yang 1
ZNF	zinc finger protein

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Mechanizmy nepřímé kooperace mezi TF.....	4
Obrázek 2: HTH strukturní motiv.....	4
Obrázek 3: bZIP doména.....	5
Obrázek 4: Struktura C2H2 zinc finger domény.....	6
Obrázek 5: Schématické zobrazení struktury zinc finger domén RING, PHD a LIM.....	6
Obrázek 6: Diagram znázorňující domény a funkce proteinu YY1.....	7
Obrázek 7: VCM (variable chromatin module) tvoří funkční entity vyššího řádu uspořádané v topologicky asociovaných doménách.....	10
Obrázek 8: Funkce proteinů YY1 a CTCF při utváření velkých DNA smyček a smyček enhancer-promotor.....	10
Obrázek 9: Model reprezentující funkce AtYY1 v odpovědi na ABA.....	12
Obrázek 10: Schématické znázornění principu BP reakce.....	13
Obrázek 11: Schématické znázornění principu LR reakce.....	13
Obrázek 12: Sekvence <i>attB</i> forward primeru pro Gateway způsob klonování.....	18
Obrázek 13: Sekvence <i>attB</i> reverse primeru pro Gateway způsob klonování.....	18
Obrázek 14: Mapa donorového vektoru pDONR207.....	20
Obrázek 15: Transkripční varianty proteinu AtYY1 a příslušná část chromozomu 4.....	25
Obrázek 16: Grafické znázornění proteinových domén a funkčních oblastí u tří transkripčních variant AtYY1.....	28
Obrázek 17: Detekce <i>attB</i> -PCR produktů transkripčních variant AtYY1.....	30
Obrázek 18: Detekce <i>attL</i> -PCR produktů transkripčních variant AtYY1 pro ověření úspěšnosti BP reakce a transformace <i>E. coli</i>	30
Obrázek 19: Detekce PCR produktů transkripčních variant AtYY1 pro ověření úspěšnosti LR reakce a transformace <i>E. coli</i>	32
Obrázek 20: Detekce PCR produktů transkripčních variant AtYY1 pro ověření úspěšnosti transformace <i>A. tumefaciens</i>	33
Obrázek 21: Lokalizace konstruktů AtYY1-1 N-term GFP, AtYY1-1 C-term RFP a AtYY1-2 N-term GFP v interfázních jádrech buněk suspenzní kultury odvozené od rostliny <i>Arabidopsis thaliana</i> ekotyp <i>Landsberg erecta</i> (<i>Ler</i>).....	34
Obrázek 22: Lokalizace konstruktů AtYY1-1 N-term GFP a AtYY1-1 C-term RFP v interfázních jádrech buněk rostliny <i>Arabidopsis thaliana</i> ekotyp <i>Columbia</i> (<i>Col-0</i>).....	35

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Podmínky PCR pro přípravu <i>attB</i> -PCR produktů.....	19
Tabulka 2: Podmínky PCR pro ověření úspěšnosti klonování.....	21
Tabulka 3: Přehled destinačních vektorů použitých pro LR reakci.....	22
Tabulka 4: Sekvence <i>attB</i> primerů použitých pro Gateway způsob klonování.....	29
Tabulka 5: Varianty produktů LR rekombinační reakce.....	31

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Genomické sekvence transkripčních variant AtYY1.

Příloha 2: Multiple sequence alignment pro genomické sekvence transkripčních variant AtYY1.

Příloha 3: Primery bez *attB* míst pro transkripční varianty AtYY1.

1 ÚVOD

Regulace genové exprese je klíčovým mechanismem pro řízení buněčného růstu, vývoje a diferenciace. Tato regulace je umožněna působením transkripčních faktorů, proteinů, které se specificky vážou na DNA a kontrolují transkripci cílových genů. Protein Yin Yang 1 (YY1) je evolučně konzervovaný transkripční faktor patřící do skupiny C2H2 zinc finger proteinů, který má schopnost transkripci aktivovat i potlačovat v závislosti na kontextu, ve kterém se váže.

Živočišný YY1 je poměrně dobře charakterizován a je známo, že se jako všudypřítomně exprimovaný protein účastní regulace řady biologických procesů. Regulační mechanismus rostlinného proteinu YY1 byl studován především v souvislosti se signální drahou kyseliny abscisové. Jeho další funkce v procesu regulace transkripce však stále nejsou objasněny. Strukturní podobnost domén proteinu YY1 živočichů a rostlin ale může naznačovat obdobné funkce u těchto skupin organismů. Studium funkce proteinů zahrnuje například jejich počáteční analýzu *in silico* a vytvoření vhodných konstruktů pro následné ověření lokalizace, exprese a interakčních studií. V případě YY1 u modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* byly identifikovány tři transkripční varianty genu, jejichž bližší charakterizace je předmětem této práce.

2 CÍLE PRÁCE

- Zpracování literární rešerše na dané téma
- *In silico* analýza transkripčních variant proteinu YY1
- Navržení primerů pro Gateway způsob klonování
- Syntetizování transkripčních variant fúzovaných s GFP nebo RFP
- Transformace do *Escherichia coli* a jejich ověření sekvenací
- Transformace konstruktů do *Agrobacterium tumefaciens*
- Transformace rostlin a suspenzních buněčných kultur *Arabidopsis thaliana*
- Lokalizační analýza pomocí fluorescenční mikroskopie

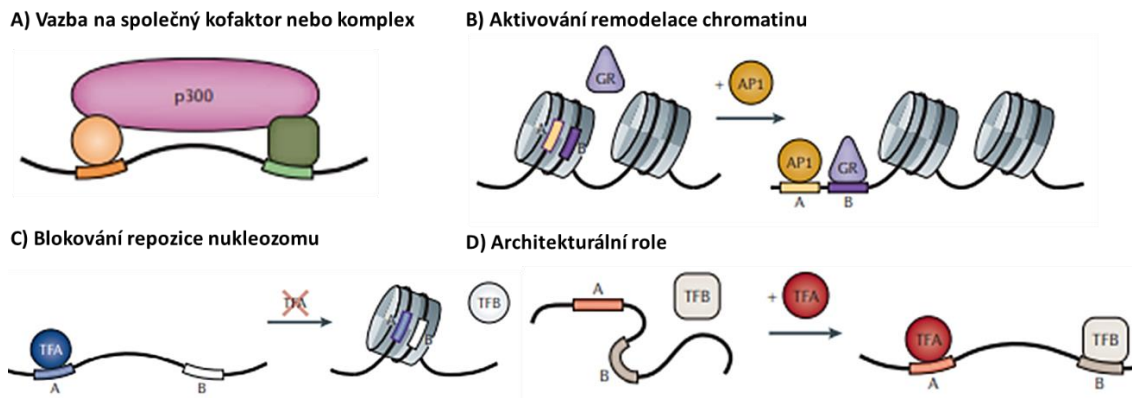
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Transkripční faktory

Sekvenčně specifické transkripční faktory (TF) jsou klíčovými regulátory biologických procesů. Jejich funkce spočívá v navázání do transkripčních regulačních oblastí (např. promotory, enhancery) za účelem kontroly exprese cílových genů. Regulace genové exprese je nezbytná pro řízení buněčného růstu, vývoje a diferenciaci (Shi *et al.*, 1997).

Prokaryota a eukaryota využívají k zacílení TF do specifických oblastí genomu různé strategie. Bakteriální TF rozpoznávají dlouhé sekvence DNA, které v malých genomech dostatečně specifikují geny, jejichž transkripce má být regulována. Naproti tomu TF eukaryot typicky rozpoznávají kratší sekvence, které se navíc v jejich rozsáhlém genomu mohou vyskytovat v mnoha kopiích (Wunderlich *et Mirny*, 2009). Každý TF obvykle rozpoznává soubor podobných sekvencí DNA. Specifita vazby TF-DNA je determinována nukleotidovou sekvencí (Stormo, 2000), 3D strukturou a flexibilitou TF a jejich vazebných míst (Meijsing *et al.*, 2009), působením kofaktorů (Siggers *et al.*, 2011), kooperací s dalšími TF (Panne, 2008), přístupností chromatinu (Liu *et al.*, 2006) či methylací DNA (Lazarovici *et al.*, 2013).

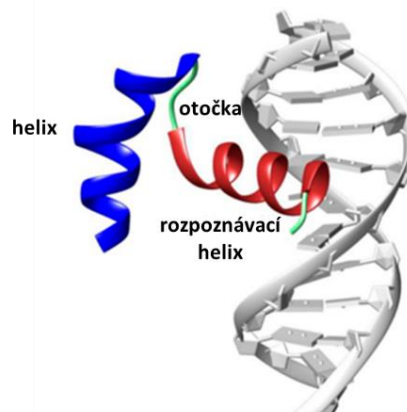
Regulace enhancerů je uskutečňována prostřednictvím vzájemné kooperace TF. Kooperativní vazba na DNA je často výsledkem přímých protein-protein interakcí mezi TF, které se vážou na přilehlé oblasti DNA. Existuje ale také několik modelů popisujících nepřímou kooperaci. V některých případech vazba dvou nebo více TF na tentýž prvek enhanceru umožňuje vazbu společného kofaktoru (např. p300) nebo jiných komponent multiproteinového komplexu (např. Mediátor), který může zvyšovat jejich afinitu k vazebným místům nebo zvyšovat retenční čas TF na enhanceru (Obrázek 1A). Některé TF (např. AP1 a GR) mohou také kooperovat při aktivaci remodelace chromatinu, přičemž vazebná místa pro tyto TF jsou lokalizována na nukleozomu. Vazbou jednoho z TF dojde k odkrytí vazebného místa pro další TF, který se na něj následně naváže (Obrázek 1B). Podstatou dalšího mechanismu je blokování repozice nukleozomů. V případě, že TF (např. TFA) zůstává navázán v určitém místě, může zabránit repozici nukleozomu tím, že umožní přístup jinému TF (např. TFB) k sousednímu vazebnému místu, které by v případě jeho absence bylo jinak nepřístupné (Obrázek 1C). Jiné TF (např. HMG1) mohou zase indukovat vznik lokálních ohybů DNA, které zvyšují afinitu dalších TF k vazebným místům enhancerů nebo podporují tvorbu komplexů (Obrázek 1D) (Spitz *et Furlong*, 2012).



Obrázek 1: Mechanizmy nepřímé kooperace mezi TF (převzato a upraveno podle Spitz *et Furlong*, 2012).

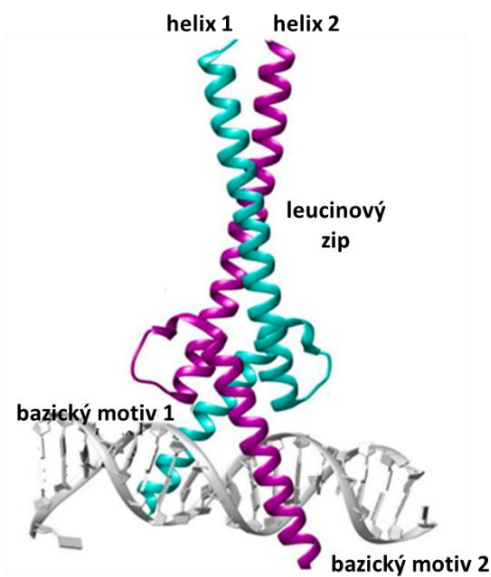
Pro vykonávání své funkce TF obecně vyžadují schopnost vázat se na DNA a následně ovlivňovat transkripci pozitivně nebo negativně. Zatímco některé specifické oblasti TF zodpovídají za vazbu TF na DNA (DNA-vazebné domény), jiné oblasti téže molekuly vytváří stimulační nebo inhibiční efekt na proces transkripce. Strukturně jsou TF obvykle klasifikovány na základě jejich DNA-vazebných domén, které nejčastěji obsahují následující strukturní motivy: HTH (helix-turn-helix), bZIP (basic-region leucine zipper) a zinc finger (Harrison, 1991; Latchman, 1997).

Motiv HTH tvoří dva α -helixy oddělené β -otočkou. Aminokyseliny C-terminálního helixu, také nazývaného rozpoznávací helix, interagují s cílovou DNA. N-terminální helix pomáhá strukturu stabilizovat. Strukturní homologie mezi motivy umožňuje v některých případech změnit specifitu interakce protein-DNA záměnou rozpoznávacího helixu. Tento strukturní motiv nese většina prokaryotních TF (Struhl, 1989) (Obrázek 2).



Obrázek 2: HTH strukturní motiv (převzato a upraveno podle Yesudhas *et al.*, 2017).

Domény bZIP proteinů se skládají ze dvou charakteristických motivů umístěných na sousedních α -helixech. První z nich je N-terminální motiv bohatý na bazické aminokyseliny, který zodpovídá za kontakt s cílovou DNA. Druhým motivem je leucinový zip, který zprostředkovává dimerizaci a staví vedle sebe dva bazické motivy helixů tak, aby vytvořily DNA-vazebné místo (Vinson *et al.*, 1989). Každý sedmý aminokyselinový zbytek helixu tvoří leucin (případně jiná hydrofobní aminokyselina), v důsledku čehož vzniká amfipatický helix, který prostřednictvím hydrofobních interakcí vytváří tzv. coiled-coil strukturu se sousedním helixem. TF nesoucí tyto domény byly popsány u eukaryot (Hurst, 1995) (Obrázek 3).

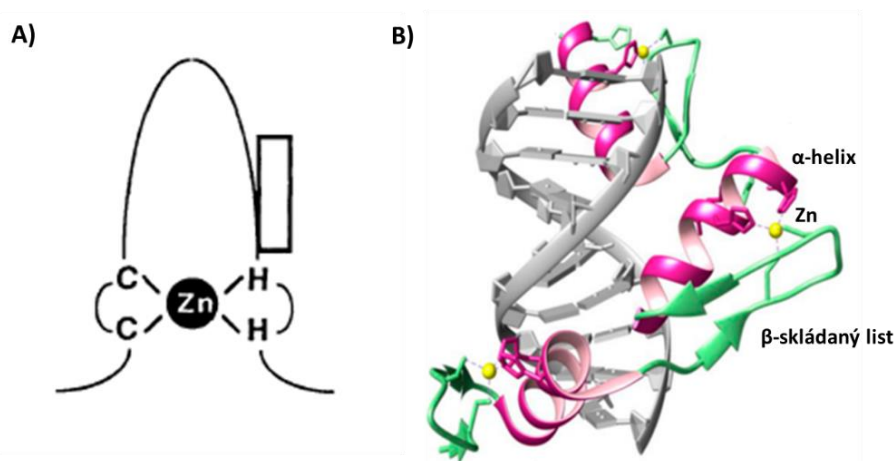


Obrázek 3: bZIP doména (převzato a upraveno podle Yesudhas *et al.*, 2017).

3.2 Zinc finger proteiny

Zinc finger proteiny (ZNF) jsou jednou z nejrozšířenějších skupin proteinů v eukaryotních genomech (Laity *et al.*, 2001). Vzhledem k velké variabilitě jejich vazebných domén mohou ZNF interagovat s nukleovými kyselinami, jinými proteiny i některými malými molekulami (např. lipidy) a podílet se tak na regulaci řady buněčných procesů (Krishna *et al.*, 2001). Mezi takové procesy patří například regulace transkripce, ubiquitinem zprostředkovaná degradace proteinů, přenos signálů, oprava DNA, apoptóza nebo buněčná migrace.

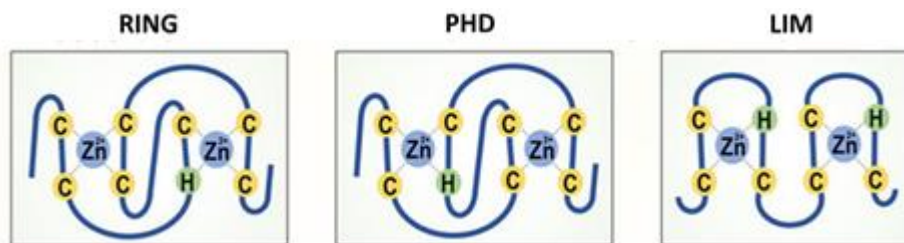
Každý zinc finger motiv tvoří přibližně 30 aminokyselin a jeho struktura je udržována prostřednictvím zinečnatého iontu, který koordinuje cystein a histidin v různých kombinacích. V případě klasických Cys2His2 (C2H2) zinc finger proteinů propojuje zinečnatý iont vždy dva cysteiny a dva histidiny protilehlého řetězce (Gibson *et al.*, 1988). Doménu C2H2 proteinů tvoří dva β -skládané listy a jeden α -helix (Zhang *et al.*, 2011). Aminokyseliny helixu interagují s bázemi velkého žlábků DNA (Wolfe *et al.*, 2000) (Obrázek 4).



Obrázek 4: Struktura C2H2 zinc finger domény. **A)** Schématické zobrazení strukturního motivu (převzato a upraveno podle Struhl, 1989), **C** – cystein, **H** – histidin, obdélník označuje oblast proteinu uplatňující se při specifické interakci s DNA. **B)** Terciární struktura domény (převzato a upraveno podle Yesudhas *et al.*, 2017).

ZNF se mohou lišit v kombinacích cystein/histidin, dalšími variantami tak mohou být například C2CH nebo C2C2 domény. V současnosti existuje 30 typů ZNF, které jsou schváleny HGNC (The HUGO Gene Nomenclature Committee) a které jsou klasifikovány na základě struktury jejich vazebných domén (Cassandri *et al.*, 2017). Mnoho ZNF ve své struktuře také obsahuje více typů vazebných domén. Mezi nejvýznamnější a nejvíce zastoupené skupiny ZNF patří již zmíněné C2H2, dále RING (really interesting new gene), PHD (plant homeodomain) a LIM (Lin-11, Isl-1, Mec-3) (Obrázek 5).

Skupina C2H2 ZNF zahrnuje velké množství TF, jejichž motivy umožňují přímé interakce s DNA. Tyto proteiny typicky obsahují více zinc finger motivů, které vytváří kontakt tandemově podél DNA (Wolfe *et al.*, 2000). Funkce C2H2 domén však není omezena pouze na interakce protein-DNA, ale umožňuje rovněž interakce protein-RNA a protein-protein (Mackay *et Crossley*, 1998). Do této skupiny patří i zkoumaný protein YY1.



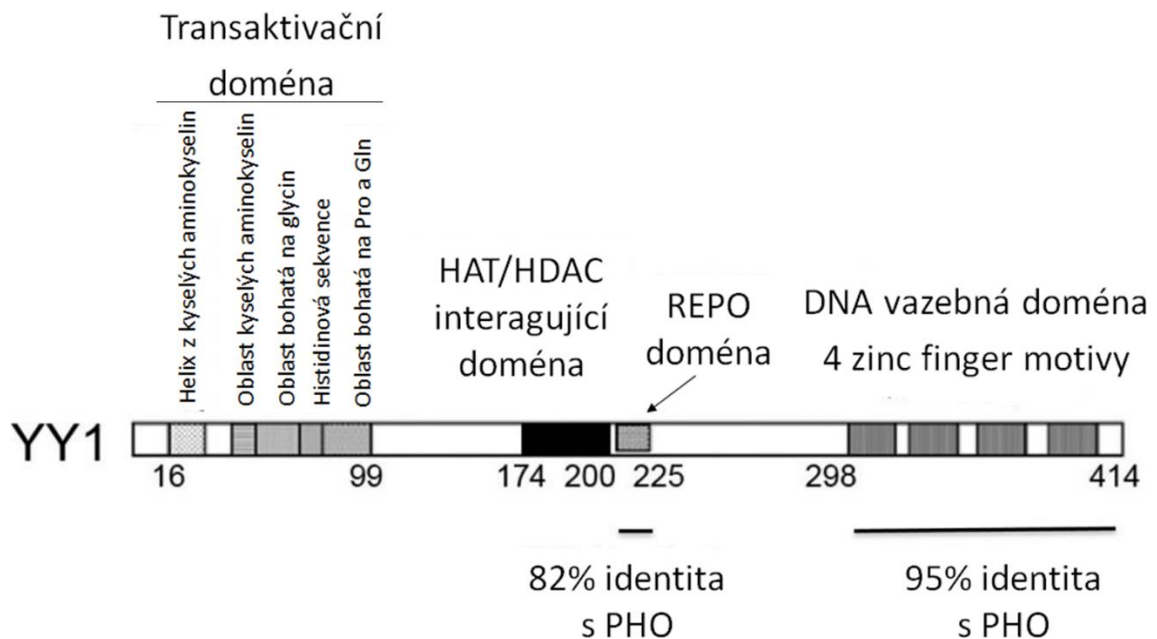
Obrázek 5: Schématické zobrazení struktury zinc finger domén RING, PHD a LIM (převzato a upraveno podle Cassandri *et al.*, 2017).

3.3 Protein YY1 u živočichů

3.3.1 Struktura a funkce proteinu YY1

Yin Yang 1 (YY1) byl jako DNA-vazebný protein objeven v letech 1991 a 1992 několika skupinami vědců a je proto znám také pod názvy δ , NF-E1, UCRBP nebo CF1. Jedná se o všudypřítomně exprimovaný, multifunkční a evolučně konzervovaný protein (Shi *et al.*, 1991, 1997).

Protein YY1 u člověka obsahuje čtyři C2H2 zinc finger motivy lokalizované na C-konci (aa 298–397). Tato oblast umožňuje rozpoznat vazebné sekvence CCAT a ACAT v genových promotorech a rovněž zodpovídá za represivní funkci YY1 (Yant *et al.*, 1995). Blízko N-konce se nachází sekvence 11 kyselých aminokyselin (aa 43–53), které jsou součástí aktivační domény. V oblasti aa 170–201 byla rovněž prokázána transkripčně represivní aktivita a protein YY1 tedy disponuje celkem dvěma represivními doménami (Shi *et al.*, 1997) (Obrázek 6). Na základě sekvenční homologie proteinu YY1 s *Drosophila* Krüppel proteinem, který se rovněž prostřednictvím transkripční regulace podílí na embryogenezi a normální morfologii, se YY1 řadí do GLI-Krüppel genové rodiny (Wieschaus *et al.*, 1984; Shi *et al.*, 1991, 1997).



Obrázek 6: Diagram znázorňující domény a funkce proteinu YY1 (převzato a upraveno podle Atchison, 2014), PHO – *Drosophila* Plieohomeotic.

Živočišný protein YY1 v průběhu buněčného cyklu mění subcelulární lokalizaci. Primárně je lokalizován v cytoplazmě, v souvislosti s procesem replikace ale na počátku S fáze dochází k jeho přemístění z cytoplazmy do jádra. Akumulace proteinu YY1 v jádře je spojena jak se zvýšením DNA-vazebné aktivity, tak s up-regulací exprese replikačně-dependentních histonových genů. V pozdní S fázi je obnovena primární lokalizace YY1 v cytoplazmě (Palko *et al.*, 2004). Výzkumy týkající se lokalizace YY1 v průběhu mitózy prokazují, že je protein během profáze přítomen v cytoplazmě a k jeho vazbě na DNA znovu dochází až na počátku telofáze. YY1 je rovnoměrně distribuován mezi dceřiné buňky a poté rychle asociován s dekonduzovanými chromozomy, což naznačuje jeho zapojení v označování aktivovaných a potlačovaných genů. Byla také zmapována tři fosforylační místa na YY1 v průběhu mitózy, přičemž fosforylace dvou z nich může narušit DNA-vazebnou aktivitu proteinu (Rizkallah *et Hurt*, 2009).

TF YY1 hraje důležitou roli v biologických procesech jako jsou embryogeneze, diferenciaci, replikace a buněčná proliferace. Tyto procesy ovlivňuje prostřednictvím schopnosti aktivovat nebo potlačovat transkripci v závislosti na kontextu, ve kterém se váže. Mechanismus jeho působení zahrnuje přímou aktivaci nebo represi, nebo nepřímou aktivaci nebo represi spojenou s navázáním kofaktorů. Mezi tyto kofaktory patří například deacetylázy histonů (HDAC) a methyltransferázy s represivní aktivitou, a histon acetyltransferázy stimulující genovou expresi (Zhang *et al.*, 2011). Některé studie řadí živočišný YY1 do PcG (Polycomb Group) rodiny proteinů, které jsou zodpovědné za zachování transkripční represe vývojově důležitých genů, právě díky jeho schopnosti zapojovat komplex PcG proteinů do regulačních aktivit (Atchison, 2014; Basu *et al.*, 2013). Sekvence nezbytná pro zapojení PcG proteinů, metylaci lysinu 27 na histonu H3 (H3K27me) a represi transkripce byla u živočišného YY1 identifikována jako REPO doména v oblasti aa 201–226. Delece tohoto krátkého motivu neovlivňuje přechodnou transkripční represi, ale znemožňuje represi vlivem PcG (Wilkinson *et al.*, 2006).

Dalším mechanismem regulace je narušení vazebných míst a konformační změny DNA. Aktivita YY1 je také regulována dalšími TF a cytoplazmatickými proteiny, tyto mechanismy ale ještě nebyly zcela objasněny (Gordon *et al.*, 2006). Přestože je tento protein běžně uváděn jako TF, některé studie také prokázaly roli YY1 jako transkripčního kofaktoru, jehož činnost je nezávislá na vazbě na DNA (Deng *et al.*, 2009; Zlatanova *et Caiafa*, 2009).

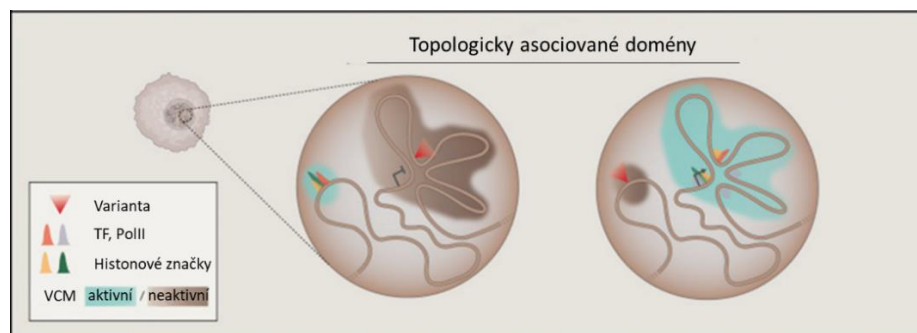
3.3.2 Role proteinu YY1 v transkripční regulaci

Termín *Yin Yang* se používá k popisu vzájemné závislosti zdánlivě opačných sil v přírodě. Tento termín může rovněž popisovat roli živočišného YY1 při tumorogenezi, ačkoliv podle dostupné literatury jeho onkogenní role převládá nad tumor-supresivním potenciálem. Aktivita proteinu YY1 může být změněna z transkripčního represoru na aktivátor adenovirovým onkoproteinem E1A. Přítomnost E1A indukuje YY1-zprostředkovanou aktivaci transkripce, naopak v nepřítomnosti E1A funguje YY1 jako transkripční represor, odtud také název Yin Yang 1 (Shi *et al.*, 1997).

Po onkogenní stimulaci může YY1 aktivovat mnoho již dobře charakterizovaných onkogenů jako jsou například *c-myc*, *c-fos*, *B23* a *ERBB2* (Allouche *et al.*, 2008; Begon *et al.*, 2005; Mai *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 1995). YY1 také zprostředkovává funkce mnoha proteinů přispívajících k aberantním epigenetickým změnám u nádorových onemocnění. Příkladem takových proteinů mohou být: Ezh2, PRMT1, p300, HDAC a DNMT (Baumeister *et al.*, 2005; Ko *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 1996). YY1 rovněž antagonizuje funkce několika klíčových nádorových supresorů, kterými jsou například proteiny p53 a p14ARF (Sui *et al.*, 2004). YY1 může být také antagonizován, a to některými nádorovými supresory (např. PTEN, pRb, některé miRNA) a apoptotickými stimuly (Petrella *et Brinckerhoff*, 2009; Song *et Wang*, 2009; Wang *et al.*, 2008). U mnoha typů nádorových onemocnění bývá YY1 overexprimován, přičemž jeho promotor obsahuje G4-DNA struktury, které jsou typicky přítomné v promotorech onkogenů (Brooks *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2012).

Předpokládaná role YY1 při tumorogenezi je podpořena již známými interakcemi s různými komponentami buněčného cyklu. YY1 se také podílí na regulaci činnosti a exprese molekul spojených s apoptózou. Apoptóza je proces programované buněčné smrti, kterým se v organismu eliminují přebytečné nebo potenciálně nebezpečné buňky. Indukce apoptózy se opírá především o aktivaci kaspáz, rodiny proteáz, které zabíjí buňky prostřednictvím proteolýzy klíčových substrátů (Green, 2000; Wolf *et Green*, 1999). Deregulovaná aktivita YY1 může vést k dysfunkční buněčné proliferaci, zvýšené odolnosti k buněčné smrti, a tím i k podpoření procesu tumorogeneze.

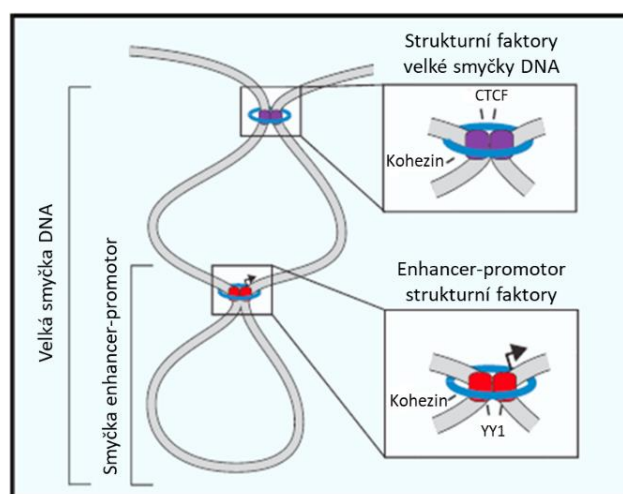
Při kontrole genové exprese hraje velmi důležitou roli také uspořádání chromozomů v interfázním jádře. Genová exprese probíhá na povrchu chromozomálních teritorií, jaderných oblastí s výskytem určitých chromozomů. DNA se v chromozomálních teritoriích sdružuje do topologicky asociovaných domén (TAD), kde může docházet ke vzniku smyček a změně prostorové konformace. Jednotlivé TAD jsou navzájem oddělen tzv. izolátory (Obrázek 7).



Obrázek 7: VCM (variable chromatin module) tvoří funkční entity vyššího řádu uspořádané v topologicky asociovaných doménách (převzato a upraveno podle Deplancke *et al.*, 2016), **PolII** – RNA polymeráza II.

Tvorba DNA smyček, respektive interakce oblastí enhanceru a promotoru v rámci TAD, je součástí mechanismů, které regulují všechny aspekty metabolismu DNA včetně transkripce, replikace a rekombinace. YY1 se podílí na remodelaci chromatinu prostřednictvím interakce s různými proteiny. Mezi tyto proteiny patří také CTCF (Donohoe *et al.*, 2007).

CTCF je všudypřítomně exprimovaný zinc finger protein s funkcí transkripčního regulátoru a izolátoru (Vietri Rudan *et al.*, 2015). Proteinový komplex kohezinu a CTCF se v jádře živočišných buněk podílí na ukotvení chromatinových smyček a následně na regulaci genové exprese. Pomocí Hi-C experimentů bylo prokázáno, že se YY1 podílí na enhancer-promotor strukturních interakcích způsobem analogickým k interakcím DNA zprostředkovaných CTCF. YY1 se váže na aktivní enhancery a promotor-proximální oblasti a pomocí acidické domény vytváří dimery, které usnadňují interakci těchto oblastí. Delece vazebných míst pro YY1 nebo nedostatečné množství tohoto proteinu tak narušuje proces genové exprese (Dixon *et al.*, 2012; Gibcus *et al.*, 2013; Splinter *et al.*, 2006; Weintraub *et al.*, 2017) (Obrázek 8). Přítomnost proteinu CTCF u rostlinných buněk nebyla doposud prokázána. Znaky homologie rostlinného a živočišného YY1 však mohou naznačovat funkční podobnost, která ale v souvislosti s architekturní funkcí nebyla podle dostupných studií u rostlinného YY1 zkoumána.



Obrázek 8: Funkce proteinů YY1 a CTCF při utváření velkých DNA smyček a smyček enhancer-promotor (převzato a upraveno podle Weintraub *et al.*, 2017).

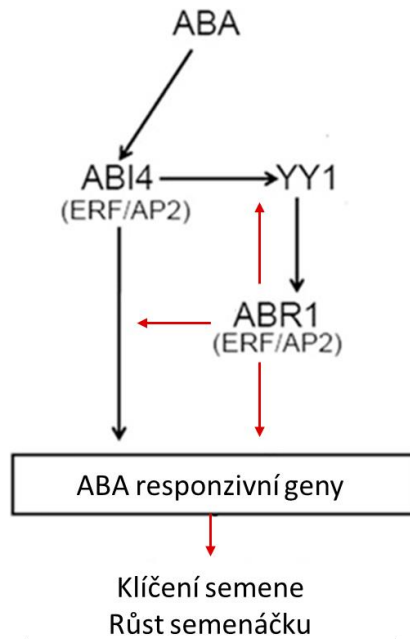
U živočišného proteinu YY1 bylo také zjištěno, že slouží jako substrát Aurora A kinázy v průběhu mitózy. Tento enzym je klíčovým regulátorem důležitých procesů spojených s mitózou jako jsou maturace centrozomu a formování dělicího vřeténka. Aurora A přímo fosforyluje YY1 na serinu, který se nachází v pozici 365 v DNA-vazebné doméně. Fosforylace YY1 v tomto místě tak ruší DNA-vazebnou aktivitu proteinu a také jeho schopnost transaktivace (Alexander *et* Rizkallah, 2017).

3.4 Protein YY1 u rostlin

Zatímco živočišný protein YY1 je v současné době již poměrně dobře charakterizován, v případě rostlinného YY1 je dostupných informací stále velmi málo. Doposud také nebyla potvrzena příslušnost rostlinného YY1 k PcG skupině proteinů, jak je tomu v případě jeho živočišného homologa.

Yin Yang 1 u *Arabidopsis thaliana* (AtYY1) je TF patřící do skupiny C2H2 zinc finger proteinů a stejně jako živočišný protein i AtYY1 obsahuje transkripčně represivní a aktivační domény. Váže se na motiv 5'-CCATnTT-3' obsažený v promotoru cílového genu, přičemž sekvence CCAT je rovněž vazebným prvkem savčího proteinu YY1. Dále rozpoznává také motiv dlouhý 11 bp, který je bohatý na guanin: 5'-GGGGGCAGTGG-3' (Li *et al.*, 2016). Ve své struktuře AtYY1 nese čtyři po sobě následující zinc finger domény a jednu samostatnou zinc finger doménu bez typického motivu QALGGH specifického pro rostliny. AtYY1 je odlišný od běžných rostlinných C2H2 zinc finger proteinů, u kterých je známa přítomnost jedné nebo více zinc finger domén a QALGGH motivu odděleného dlouhým spacerem. Unikátnost AtYY1 tak může naznačovat jeho zajímavý evoluční původ a důležitou roli v organizmu. Bylo také prokázáno zapojení AtYY1 v různých buněčných procesech jako jsou fotosyntéza, fototropismus, metabolismus sacharidů, transkripce a odpověď na solný stres. Nicméně to, jakým způsobem je AtYY1 v signálních drahách zapojen, je stále nejasné (Li *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2012).

Bylo rovněž prokázáno, že AtYY1 je negativním regulátorem signální dráhy kyseliny abscisové (ABA). ABA je rostlinný hormon plnící důležitou roli při regulaci růstu a vývoje rostliny a při odpovědi na nejrůznější druhy environmentálního stresu. Součástí signální dráhy ABA je řada TF (ABI3, ABI4 a ABI5). Exprese AtYY1 je indukována prostřednictvím ABA a stresových podmínek jako jsou solný stres nebo dehydratace. AtYY1 se váže na promotor represoru ABR1 a přímo up-reguluje jeho expresi. Protein ABI4 může pozitivně regulovat expresi AtYY1, zatímco ABR1 může tuto regulaci antagonistovat. ABI4-AtYY1-ABR1 regulační dráha tak může velmi jemně řídit genovou expresi v odpovědi na ABA (Li *et al.*, 2016) (Obrázek 9).



Obrázek 9: Model reprezentující funkce AtYY1 v odpovědi na ABA (převzato a upraveno podle Li *et al.*, 2016), černé šipky indikují pozitivní regulaci a červené negativní regulaci.

Fosforylace a defosforylace proteinů je zásadní při regulaci jejich aktivity a stability v různých signálních drahách. AtYY1 byl identifikován jako potenciální cíl kasein kinázy 2 (CK2), který fyzicky interaguje se dvěma jejími regulačními podjednotkami, CKB3 a CKB4. Další studie naznačují, že CK2-zprostředkovaná fosforylace AtYY1 zesiluje jeho transkripční aktivitu a stabilitu, a tím posiluje efekt AtYY1 jakožto negativního regulátoru v odpovědi na ABA (Wu *et Li*, 2017).

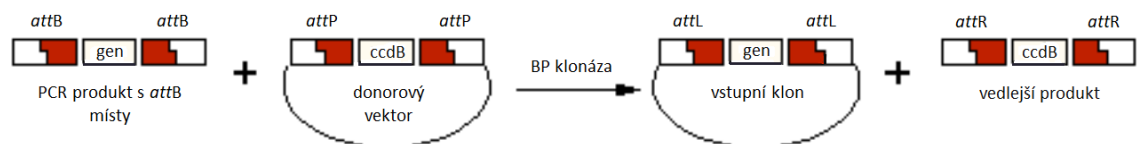
U AtYY1 je také známa interakce s MED18. MED18 u *Arabidopsis* je multifunkční protein regulující rostlinnou imunitu, čas kvetení a odpovědi na hormonální signály prostřednictvím interakcí s různými TF. Pomocí interakce MED18 s YY1 je potlačována exprese některých genů (glutaredoxiny *GRX480*, *GRXS13* a thioredoxin *TRX-h5*) významných pro vznik onemocnění a posilována rezistence k houbovým infekcím (Lai *et al.*, 2014).

3.5 Gateway technologie klonování

Při experimentální analýze transkripčních variant AtYY1 bylo v rámci této práce využito Gateway technologie. Gateway® (Invitrogen) technologie je univerzální klonovací metoda založená na místně specifickém rekombinačním systému bakteriofága lambda (Landy, 1989). Tato technologie představuje rychlý a vysoce účinný způsob přenosu sekvencí DNA do mnoha vektorových systémů pro studium exprese a funkce proteinů (Hartley *et al.*, 2000).

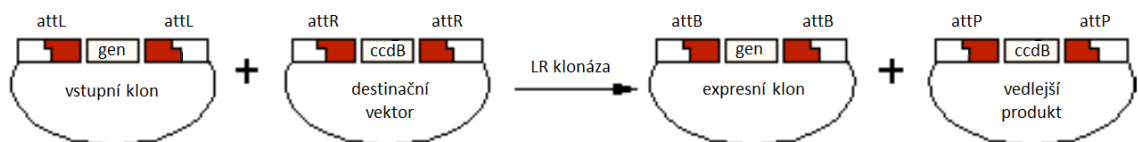
Podstatou metody jsou dvě rekombinační reakce, při kterých dojde k přenosu požadované sekvence přes vstupní klon do destinačního expresního vektoru. Rekombinaci umožňují specifické rekombinační sekvence, tzv. *att* místa, přítomná v interagujících molekulách DNA a také příslušné proteiny, které se na ně vážou.

Při BP rekombinační reakci interaguje substrát s *attB* místy (např. PCR produkt) s *attP* místy v donorovém vektoru za vzniku vstupního klonu s *attL* místy a vedlejšího produktu s *attR* místy. Reakci katalyzují enzymy integráza a IHF (Obrázek 10).



Obrázek 10: Schématické znázornění principu BP reakce (převzato a upraveno podle uživatelské příručky Gateway technologie, Invitrogen), **ccdB** – gen pro negativní selekci, **BP klonáža** – směs rekombinačních enzymů.

Druhou rekombinační reakcí je LR reakce, při které interaguje vstupní klon s *attL* místy s destinačním vektorem s *attR* místy za vzniku expresního klonu s *attB* místy a vedlejšího produktu s *attP* místy. Reakci katalyzují enzymy integráza, excisionáza a IHF (Obrázek 11).



Obrázek 11: Schématické znázornění principu LR reakce (převzato a upraveno podle uživatelské příručky Gateway technologie, Invitrogen), **ccdB** – gen pro negativní selekci, **LR klonáža** – směs rekombinačních enzymů.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

Bakterie

Pro účely klonování byl použit kmen *Escherichia coli*: TOP 10 [F-*mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74 recA1 araD139 Δ (*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL* (STR^R) *endA1 nupG*] (Invitrogen). Bakterie byly kultivovány v LB médiu (složení a příprava v kapitole 4.2.3) při teplotě 37 °C přes noc na orbitální třepačce (220 rpm) nebo v termostatu.*

Pro transformaci rostlin a z nich odvozených buněčných suspenzních kultur byly použity bakterie *Agrobacterium tumefaciens*, kmen: GV3101 (markerový gen Rif, Nopaline Ti plazmid). Tyto bakterie byly kultivovány v YEB médiu (složení a příprava v kapitole 4.2.3) při teplotě 28 °C na orbitální třepačce (200 rpm, přes noc) nebo v termostatu.

Rostlinný materiál

Pro lokalizační analýzu proteinu YY1 byly použity ekotypy modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh: *Landsberg erecta* (*Ler*) a *Columbia* (*Col-0*) (Nottingham Arabidopsis Stock Centre). Dále byly použity suspenzní buněčné kultury odvozené od kalusů rostliny *Arabidopsis thaliana* (*Ler*).

Rostliny *Arabidopsis thaliana* určené k transformaci byly kultivovány při teplotě 21 °C v režimu 16 h světlo, 8 h tma. Suspenzní buněčné kultury *Ler* byly kultivovány v AR NAA KIN médiu (složení a příprava v kapitole 4.2.3) na orbitální třepačce (110 rpm) při teplotě 24 °C ve tmě.

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

Použité chemikálie

- 6x DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific, kat.č. R0611)
- Acetosyringon (3,5-dimethoxy-4-hydroxyacetofenon) (Sigma-Aldrich, kat.č. D134406)
- Agar (HiMedia, kat.č. RM201)
- Claforan (cefatoxim sodný) (Duchefa Biochemie, kat.č. C0111)
- DL-fosfinotricin (Duchefa Biochemie, kat.č. P0159)
- DMSO (dimethyl sulfoxid) (Serva, kat.č. 39757)
- EDTA (kyselina ehylendiamintetraoctová) (Sigma-Aldrich, kat.č. E5134)
- Ethylalkohol 96% (Lach-ner, kat.č. 20025-A96)
- GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, ready-to-use (Thermo Fisher Scientific, kat.č. SM1333)
- Gentamicin sulfát (Serva, kat.č. 22185)
- Hovězí extrakt (HiMedia, kat.č. RM002)
- Hydroxid draselný p.a. (Lach-ner, kat.č. 10003-AP3)
- Hydroxid sodný perly p.a. (Lach-ner, kat.č. 10006-AP2)
- Hygromycin B (PAA, kat.č. P21-014)
- Chlorid sodný p.a. (Lach-ner, kat.č. 30423)
- Kinetin (Duchefa Biochemie, kat.č. K0905)
- Kvasničný autolyzát (Duchefa Biochemie, kat.č. Y1333)
- Kyselina chlorovodíková 37% (Merck Millipore, kat. č. 113386)
- Kyselina octová 99% p.a. (Lach-ner, kat.č. 10047-A99)
- MES monohydrát (Duchefa Biochemie, kat.č. M1503)
- MS směs (Duchefa Biochemie, kat.č. M0231)
- NAA (kyselina α -naftalenoctová) (Sigma-Aldrich, kat.č. N0640)
- PCR agaróza (Top-Bio, kat.č. P045)
- PCR ethidium bromid (Top-Bio, kat.č. P047)
- Pepton (Duchefa Biochemie, kat.č. P1328)
- Rifampicin (Serva, kat.č. 34514)
- Sacharóza p.a. (Lach-ner, kat.č. 40135-AP0)
- Silwet Star (AgroBio, kat.č. 1681-1C)
- Síran hořečnatý heptahydrát p.a. (Lach-ner, kat.č. 30807)
- Spectinomycin (dihydrochlorid pentahydrát) (Sigma-Aldrich, kat.č. S9007)
- Tris (Sigma-Aldrich, kat.č. T1503)
- Triton X-100 (t-oktylfenoxypolyethoxyethanol) (Sigma-Aldrich, kat.č. X100)

Použité soupravy

- Gateway BP Clonase II Enzyme Mix (Invitrogen, kat.č. 11789)
- Gateway LR Clonase II Enzyme Mix (Invitrogen, kat.č. 11791)
- Perfect*Taq* Plus DNA Polymerase - 1000 U (5Prime, kat.č. 2200055)
- Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (BioLabs, kat.č. M0491)
- QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, kat.č. 27104)
- QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, kat.č. 28704)

Použité roztoky a jejich příprava

LB médium (pH 7): Smíchat 10 g peptonu, 5 g kvasničného autolyzátu a 15 g NaCl. Rozpustit v 800 ml destilované vody a upravit pH přidavkem KOH na požadovanou hodnotu. Doplnit destilovanou vodou do 1000 ml a sterilizovat autoklávováním. Pro přípravu tuhého média s výslednou koncentrací agaru 1,5% přidat 15 g agaru na 1000 ml média.

YEB médium (pH 7,2): Smíchat 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 g hovězího extraktu, 5 g peptonu, 5 g sacharózy a 1 g kvasničného autolyzátu. Rozpustit v 800 ml destilované vody a upravit pH přidavkem KOH na požadovanou hodnotu. Doplnit destilovanou vodou do 1000 ml a sterilizovat autoklávováním. Pro přípravu tuhého média s výslednou koncentrací agaru 1,5% přidat 15 g agaru na 1000 ml média.

½ MS médium (pH 5,8): Smíchat 2,2 g MS směsi, 10 g sacharózy a 1 g MES monohydrátu. Rozpustit v 800 ml destilované vody a upravit pH přidavkem KOH na požadovanou hodnotu. Doplnit destilovanou vodou do 1000 ml a sterilizovat autoklávováním. Pro přípravu tuhého média s 0,6% agarem (w/v), přidat 6 g agaru na 1000 ml média.

AR NAA KIN médium (pH 5,7): Smíchat 30 g sacharózy, 4,4 g MS směsi a rozpustit v 800 ml destilované vody. Přidat 50 μl NAA a 5 μl kinetinu. Upravit pH přidavkem KOH na požadovanou hodnotu, doplnit destilovanou vodou do 1000 ml a sterilizovat autoklávováním.

50x TAE pufr: Rozpustit 242 g Tris v 800 ml destilované vody, přidat 57,1 ml 99% kyseliny octové a 100 ml $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA (pH 8,5). Doplnit destilovanou vodou do 1000 ml.

1x TAE pufr: Smíchat 20 ml 50x TAE pufru a doplnit destilovanou vodou do 1000 ml.

TE pufr (pH 8): Smíchat 2 ml $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA (pH 8) s 10 ml $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl (pH 8) a doplnit destilovanou vodou do 1000 ml.

1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl (pH 8): Rozpustit 121,1 g Tris v 800 ml destilované vody a upravit pH koncentrovanou HCl na požadovanou hodnotu. Doplnit destilovanou vodou do 1000 ml.

0,5 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA: 186,1 g EDTA rozpustit v 800 ml destilované vody, upravit pH přidavkem NaOH na požadovanou hodnotu. Doplnit destilovanou vodou do 1000 ml a sterilizovat filtrací.

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- Analytické váhy A 200S (Sartorius)
- Biologický termostat BT 120
- Centrifuga 5415 D (Eppendorf)
- Centrifuga Jouan BR4i, úhlový rotor AM 50C.13 (Thermo Fisher Scientific)
- Centrifuga MiniStar Silverline (VWR)
- Centrifuga myFuge Mini (Benchmark Scientific)
- Digitální předvážky Scout SC4010 (Ohaus)
- Laboratorní digestoř M 1800 (Merci)
- Laminární box MSC 1.2 Advantage (Thermo Fisher Scientific)
- Magnetická míchačka VS-C7 (VWR)
- Mikroskop Olympus, typ IX81 invertovaný, vybavený DSU (Disc Scanning Unit) a digitální monochromatickou CCD kamerou (CCD-ORCA/ER)
- NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, program ND-1000 V3.8.1 (Thermo Fisher Scientific)
- Orbitální třepačka VKS 75A (Bühler)
- pH metr InoLab pH 7110 (WTW)
- Sekvenátor 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems)
- Souprava pro horizontální gelovou elektroforézu (Bio-Rad)
- Spektrofotometr Ultrospec 10 (Amersham Biosciences)
- Termostatovaná třepačka MaxQ 4000 (Thermo Fisher Scientific)
- Thermocycler T-Gradient (Biometra)
- Thermoshaker, Cooling Thermal Shake Touch (VWR)
- Transiluminátor InGenius LHR (Syngene), program GeneSnap (Syngene)
- Třepačka VV3 (VWR)
- Zpracování a analýza snímků – program CellR software (Olympus) a Adobe Photoshop CS5 (Adobe)

4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.4.1 *In silico* analýza transkripčních variant proteinu AtYY1

Sekvence tří transkripčních variant proteinu YY1 byly převzaty z databáze TAIR10 (The Arabidopsis Information Resource, <https://www.arabidopsis.org/>). Tato databáze shromažďuje nejnovější genetická a molekulárně biologická data pro modelovou rostlinu *Arabidopsis thaliana*, která mimo jiné zahrnují i kompletní genomickou sekvenci spolu se strukturou genů (Berardini Tanya Z. *et al.*, 2015).

Pro multiple sequence alignment tří transkripčních variant byl použit program Clustal Omega (Sievers *et Higgins*, 2018). Aminokyselinové sekvence byly získány s využitím databáze UniProt (Universal Protein Resource) (Bateman *et al.*, 2017). Proteinové domény a funkční místa byly následně analyzovány pomocí databáze ELM (The Eukaryotic Linear Motif resource for Functional Sites in Proteins) (Dinkel *et al.*, 2016). Získaná data byla graficky zpracována v programu DOG (Domain Graph) (Ren *et al.*, 2009).

4.4.2 Navržení *attB* PCR primerů

Aby byl PCR produkt vhodným substrátem pro BP rekombinační reakci s donorovým vektorem, je zapotřebí do něj nejprve inkorporovat *attB* místa, a to prostřednictvím PCR primerů.

Vedoucí (forward) primer musí na 5' konci obsahovat čtyři guaniny, po kterých následuje 25 bp dlouhé *attB1* místo. Primer je zakončen 18–25 bp genově specifické sekvence. Aby byl zachován čtecí rámec při N-terminální fúzi, je nutné za *attB1* místo přidat navíc dva nukleotidy tak, aby nevznikl stop kodon (Obrázek 12).

5' – GGGG–ACA–AGT–TTG–TAC–AAA–AAA–GCA–GGC–TNN + 18–25 bp genově specifické sekvence – 3'
attB1 místo

Obrázek 12: Sekvence *attB* forward primeru pro Gateway způsob klonování (převzato a upraveno podle uživatelské příručky Gateway technologie, Invitrogen).

Zpětný (reverse) primer musí rovněž obsahovat na 5' konci čtyři guaniny. Ty jsou ale v tomto případě následovány 25 bp dlouhým *attB2* místem. Primer opět zakončuje 18–25 bp genově specifické sekvence. Pro zachování čtecího rámce při C-terminální fúzi je třeba za *attB2* místo přidat navíc ještě jeden nukleotid (Obrázek 13).

5' – GGGG–AC–CAC–TTT–GTA–CAA–GAA–AGC–TGG–GTN + 18–25 bp genově specifické sekvence – 3'
attB2 místo

Obrázek 13: Sekvence *attB* reverse primeru pro Gateway způsob klonování (převzato a upraveno podle uživatelské příručky Gateway technologie, Invitrogen).

4.4.3 Příprava *attB*-PCR produktů

Sekvence zájmového genu byla amplifikována spolu s rekombinačními *attB* místy pomocí PCR s Q5 High-Fidelity DNA polymerázou s proofreading aktivitou.

Složení PCR reakční směsi (výsledná koncentrace): 1x Q5 reakční pufr, 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ dNTP směs, 0,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ forward primer, 0,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ reverse primer, templátová DNA (<1 μg), 0,02 $\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ Q5 High-Fidelity DNA polymeráza, 1x Q5 High GC Enhancer, sterilní redestilovaná voda. Podmínky PCR jsou uvedeny v Tabulce 1.

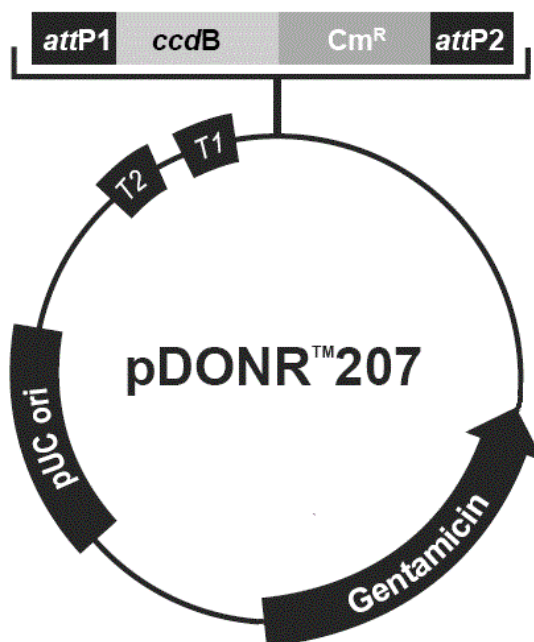
Tabulka 1: Podmínky PCR pro přípravu *attB*-PCR produktů (Q5 High-Fidelity DNA Polymerase).

Proces	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	98	30 s	1
PCR amplifikace	98	10 s	34
	61	30 s	
	72	60 s	
Závěrečná elongace	72	5 min	1

Produkty PCR byly následně separovány pomocí horizontální elektroforézy v gelu připraveném z 1% (w/v) agarózy, 1x TAE pufru a 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ethidium bromidu. Elektroforéza probíhala při napětí 80 V za pokojové teploty. Pro orientační stanovení velikosti fragmentů DNA byl použit GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. Získané produkty PCR byly vizualizovány pomocí UV záření o vlnové délce 360 nm, poté byly vyřezány z gelu a purifikovány s použitím soupravy QIAquick Gel Extraction Kit podle instrukcí výrobce.

4.4.4 BP reakce

BP rekombinační reakce umožňuje přenos připraveného *attB*-PCR produktu do donorového vektoru nesoucího *attP* místa za vzniku vstupního klonu s *attL* místy. V tomto případě byl jako donorový vektor použit pDONR207 o velikosti 5585 bp od společnosti Invitrogen (Obrázek 14).



Obrázek 14: Mapa donorového vektoru pDONR207 (převzato a upraveno podle Invitrogen), *attP1*, *attP2* – specifická rekombinační místa, *ccdB* – gen pro negativní selekci, *Cm^R* – gen rezistence k chloramfenikolu, *Gentamicin* – gen rezistence ke Gentamicinu, *T1*, *T2* – transkripční terminační sekvence, *pUC ori* – replikační počátek.

BP reakční směs obsahovala *attB*-PCR produkt ($\geq 10 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$), donorový vektor pDONR207 ($150 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$), TE pufr (pH 8) a 1x Gateway BP Clonase II Enzyme Mix. Směs byla inkubována při pokojové teplotě do následujícího dne. BP reakce byla poté zastavena přidáním proteinázy K ($2 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) a směs byla inkubována 10 min při teplotě 37 °C.

4.4.5 Transformace bakterií *Escherichia coli*

Chemicky kompetentní buňky *Escherichia coli* byly transformovány produkty BP reakce pomocí tzv. heat shock metody pro namnožení plazmidové DNA.

Ke 100 μl alikvótu chemicky kompetentních buněk *E. coli* (TOP 10), které byly uchovávány při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, bylo přidáno 10 μl produktu BP reakce. Následovala inkubace 30 min na ledu. Bakterie byly transformovány pomocí teplotního šoku, kdy byly nejprve vystaveny teplotě $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 45 s a poté byly okamžitě přemístěny na led na 2 min. Ke směsi bylo dále přidáno 800 μl LB média a následovala inkubace 1 h při teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Směs byla centrifugována 1 min při 6000 rpm. Vzniklý pelet byl resuspendován ve 100 μl LB média a rozetřen na Petriho misku s LB médiem obsahujícím příslušné selekční antibiotikum (Gentamicin $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$). Kultivace bakterií probíhala přes noc v termostatu při teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Narostlé bakteriální kolonie byly přeneseny do 5 ml tekutého LB média obsahujícího selekční antibiotikum a následně kultivovány přes noc na orbitální třepače při 220 rpm a teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Úspěšnost BP reakce a transformace byla ověřena pomocí tzv. colony PCR s PerfectTaq Plus DNA polymerázou za použití specifických *attL* primerů. Sekvence *attL* primerů: (F) 5'-TCGCGTTAACGCTAGCATGGATCTC-3', (R) 5'-GTAACATCAGAGATTTTGAGACAC-3'.

Izolovaná kolonie byla přenesena do 50 μl sterilní redestilované vody. Bakteriální buňky byly poté lyzovány 10 min při teplotě $100\text{ }^{\circ}\text{C}$. Následovala centrifugace při 13 000 rpm po dobu 5 min. Vzniklý supernatant obsahující plazmidy byl odebrán a použit jako templát pro PCR.

Složení PCR reakční směsi (výsledná koncentrace): 1x PerfectTaq Plus reakční pufr, $200\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ dNTP směs, 1x PerfectLoad Dye Concentrate, $0,2\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ *attL* forward (F) primer, $0,2\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ *attL* reverse (R) primer, templátová DNA ($\leq 1\text{ }\mu\text{g}$), 1,25 U PerfectTaq Plus DNA polymeráza, sterilní redestilovaná voda. Podmínky PCR jsou uvedeny v Tabulce 2.

Tabulka 2: Podmínky PCR pro ověření úspěšnosti klonování (PerfectTaq Plus DNA Polymerase).

Proces	Teplota [$^{\circ}\text{C}$]	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94	3 min	1
PCR amplifikace	94	30 s	35
	54	30 s	
	72	80 s	
Závěrečná elongace	72	10 min	1

Z bakteriálních kolonií, ve kterých byla ověřena přítomnost inzertu byly izolovány plazmidy pomocí soupravy QIAprep Spin Miniprep Kit podle instrukcí výrobce. Čtecí rámec BP konstruktů byl následně ověřen sekvenováním, opět za použití specifických *attL* primerů.

4.4.6 LR reakce

Prostřednictvím LR rekombinační reakce byly cílové geny přeneseny ze vstupních klonů s *attL* místy do destinačních vektorů nesoucích *attR* místa za vzniku expresních klonů s *attB* místy. Přehled použitých destinačních vektorů spolu s jejich stručnými charakteristikami je uveden v Tabulce 3.

Tabulka 3: Přehled destinačních vektorů použitých pro LR reakci.

Označení vektoru	Promotor	Fúze	Rezistence		Zdroj
			Bakterie	Rostliny	
pH7WGF2,0	35S	N-term GFP	Spectinomycin	Hygromycin	VIB-UGent
pH7FWG2,0	35S	C-term GFP	Spectinomycin	Hygromycin	VIB-UGent
pK7WGR2,0	35S	N-term RFP	Spectinomycin	Fosfinotricin	VIB-UGent
pB7RWG2,0	35S	C-term RFP	Spectinomycin	Fosfinotricin	VIB-UGent

LR reakční směs obsahovala vstupní klon (150 ng), destinační vektor (150 ng· μ l⁻¹), TE pufr (pH 8) a 1x Gateway LR Clonase II Enzyme Mix. Směs byla inkubována při pokojové teplotě do následujícího dne. LR reakce poté byla zastavena přidáním proteinázy K (2 μ g· μ l⁻¹) a směs byla inkubována 10 min při teplotě 37 °C.

LR konstrukt byl následně vnesen opět pomocí heat shock metody do chemicky kompetentních buněk *Escherichia coli*, které byly kultivovány na LB médiu obsahujícím příslušná selekční antibiotika. Úspěšnost LR reakce a transformace byla stejně jako v předchozím případě ověřena pomocí colony PCR za použití specifických primerů bez *attB* míst pro zájmový gen. Z bakteriálních kolonií, ve kterých byla ověřena přítomnost inzertu byly izolovány plasmidy pomocí soupravy QIAprep Spin Miniprep Kit podle instrukcí výrobce.

4.4.7 Transformace bakterií *Agrobacterium tumefaciens*

Chemicky kompetentní buňky *Agrobacterium tumefaciens* byly transformovány produkty LR reakce pomocí tzv. freeze-thaw metody (An *et al.*, 1988).

Ke 100 μ l alikvótu chemicky kompetentních buněk *A. tumefaciens* (GV3101), které byly uchovávány při -80 °C, byl přidán 1 μ g plazmidové DNA (produkt LR reakce). Kultura byla inkubována při teplotě 37 °C po dobu 5 min. Poté byl přidán 1 ml YEB média a směs byla opět inkubována, a to 3 h při teplotě 28 °C za mírného třepání (300 rpm), které umožní expresi genů rezistence k antibiotikům. Následně byla směs centrifugována 30 s při 13 000 rpm a ke vzniklému peletu bylo přidáno 100 μ l YEB média. Směs byla resuspendována a rozetřena na Petriho misku s YEB médiem, které navíc obsahovalo selekční antibiotika podle typu vektoru, který byl při transformaci použit. Bakterie byly kultivovány v termostatu tři dny při teplotě 28 °C. Narostlé bakteriální kolonie byly přeneseny do 5 ml tekutého YEB média obsahujícího příslušná antibiotika a kultivovány přes noc na orbitální třepačce při 28 °C a 200 rpm.

Úspěšnost transformace byla ověřena pomocí tzv. colony PCR za použití příslušných primerů bez *attB* míst pro zájmový gen.

4.4.8 Transformace suspenzních buněčných kultur

Suspenzní buněčné kultury odvozené z rostlin *Arabidopsis thaliana* (*Ler*) byly transformovány pomocí *Agrobacterium tumefaciens* nesoucího daný konstrukt.

50 μ l bakteriální kultury bylo přeneseno do 5 ml YEB média s příslušnými antibiotiky a inkubováno přes noc na orbitální třepačce při 200 rpm a teplotě 28 °C. 100 μ l této kultury bylo poté rozetřeno na Petriho misku s tuhým YEB médiem a antibiotiky a inkubováno opět přes noc v termostatu při teplotě 28 °C.

Do dvoudenní buněčné suspenze byl přidán roztok acetosyringonu v DMSO tak, aby jeho výsledná koncentrace v suspenzi byla 100 μ mol \cdot l $^{-1}$. Následně byly do suspenze z misky přeneseny nakultivované bakterie. Kultivace buněčných kultur probíhala ve tmě na orbitální třepačce při 110 rpm a teplotě 24 °C.

Úspěšnost transformace byla pravidelně kontrolována vždy po dvou až třech dnech s použitím fluorescenčního mikroskopu. Suspenze byla promývána kultivačním médiem (AR NAA KIN) pro odstranění mrtvých buněk. Po šesti dnech byl do suspenze přidán Cefatoxim sodný (Claforan) (500 mmol \cdot l $^{-1}$), který usmrcuje buňky *A. tumefaciens*, a selekční antibiotika podle typu vneseného vektoru.

4.4.9 Transformace a selekce rostlin

Rostliny *Arabidopsis thaliana* (*Col-0*, *Ler*) byly transformovány modifikovanou metodou floral dip (Clough *et Bent*, 1998), pomocí *Agrobacterium tumefaciens* nesoucího plazmidu s vloženým genem.

100 μ l bakteriální kultury bylo naočkováno do 5 ml YEB média obsahujícího příslušná antibiotika. Bakterie byly kultivovány přes noc na orbitální třepačce při 200 rpm a teplotě 28 °C. Následující den byl 1 ml těchto kultur přenesen do 100 ml YEB média s antibiotiky. Inkubovány byly opět přes noc, a to při 200 rpm a teplotě 28 °C.

Bakteriální kultury byly následující den centrifugovány 20 min při 4500 rpm a 4 °C. Vzniklý pelet byl resuspendován v 5% (w/v) vodném roztoku sacharózy na požadovanou hodnotu OD, která je při vlnové délce 600 nm rovna 0,8 (tato hodnota představuje hodnotu ideální, rostliny je však možné transformovat v rozsahu hodnot 0,6–1,2). Dále byl přidán roztok acetosyringonu v DMSO do výsledné koncentrace 200 μ mol \cdot l $^{-1}$ a Silwet Star do výsledné koncentrace 0,05 %. Květenství rostlin byla ponořena do připravené suspenze na 2–3 s za jemného promíchávání a rostliny byly poté zakryty plastovým sáčkem do následujícího dne. Kultivovány byly ve skleníku za standardních podmínek.

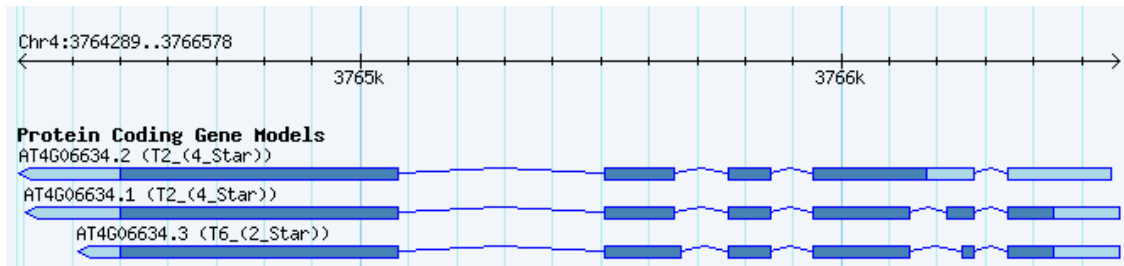
Identifikace transformovaných rostlin byla provedena za použití metody dle Harrison *et al.*, 2006. Získaná semena byla podrobena selekci vysetím na ½MS médium obsahující příslušná antibiotika podle typu vneseného vektoru. Jako negativní kontrola byla použita semena *Col-0* rezistentní k příslušným antibiotikům (Hygromycin, Fosfotricin). Před výsevem byla semena sterilizována. Nejprve byla přenesena na 10 min do 1 ml 70% ethanolu s 0,05% Tritonem X-100 za stálého promíchávání na třepačce. Poté byla promývána 5 min v 1 ml 96% ethanolu, opět na třepačce. Nakonec byla za sterilních podmínek v laminárním boxu vysušena a vyseta na médium s antibiotiky.

Kultivace semen probíhala za teplotní a světelné stratifikace: dva dny ve tmě při teplotě 4 °C, poté 6 h na světle při teplotě 21 °C, dva dny ve tmě při teplotě 21 °C a nakonec byla trvale umístěna na světle při teplotě 21 °C. Pozitivní selekce rostlin na médiu byla dále ověřena vizuálně s použitím fluorescenčního mikroskopu.

5 VÝSLEDKY

5.1 *In silico* analýza transkripčních variant proteinu AtYY1

Gen pro AtYY1 (AT4G06634) je lokalizován na chromozomu 4 a vytváří tři transkripční varianty (Obrázek 15). Kódující sekvence jednotlivých variant jsou uvedeny níže. Genomické sekvence a jejich strukturní charakteristiky jsou uvedeny v kapitole Přílohy (Příloha 1). Potřebná data byla získána z databáze EnsemblPlants (Kersey *et al.*, 2018).



Obrázek 15: Transkripční varianty proteinu AtYY1 a příslušná část chromozomu 4 (převzato z databáze TAIR10), jednotlivé obdélníky znázorňují exony, které jsou od sebe odděleny jednoduchými čarami představujícími introny. Světle modré oblasti vyznačují UTR (netranslatované oblasti).

>AT4G06634.1 AtYY1-1

```
ATGGATCATCAAAATTATCAATACCAAATCCTTTCGAGAGACGCCATCCTTAAATCCAAAGCTCCTGCTGTGAAG
TGGATCAAAGAAATGGGTACCACAGATATTGTTGCTACAGGTGGAAAGTGCATCTACACAAATGGGTCACAGAGGAT
ACTTTTAGCAGACTTAAAGAAAAAGAGAAAGAGCCTGATGTTCCCTGAGCCTGAACCTGAACCAACTACAGAGATTTTG
TTTCTCTGTAGTTATGATGGTTGCGGGAAGACTTCTTTGATGTTAGTGCATTGAGGAAACATTCTCATATCCATGGA
GAAAGACAATATGTTTGTGATCAGGAAGGATGTGAAAGAAATTTCTGGATAGTCAAAGTTGAAGAGACATTATCTT
ATTCATACTGGAGAGAGAAATTATATATGTACTTATGAAGGATGTGAAAGGCATCTCGTTGGATTTAACCTTAGG
TCTCACATGAAGACTCATTACAAAGAGAATTATCATATATGTCCTTACAGTGGGTGTGTGAAGAGATATGCTCATGAA
TACAAGCTAAAGAACCACGTTGCTGCCTACCATGAAAAGAATGGTGGGAGAGACTCCCAAATATACACCACGACA
GAGAAAGTATTAAGGACTGTCAAACACCTGCAACAGTTTGTGGCCCGTCTTCGGATCGGCCATACGCATGCCCTTAC
GAAGGGTGTGAGAAAGCTTACATACATGAGTACAAGCTTAAAGCTCCACTTGAAGAGAGAACATCCAGGGCATTTACAA
GAAGAGAACCGGATACCCCCACACTGAACAAGCACAATGGCAATGACAGGAATGAGATAGATGACGGGAGTGACCAA
GATGTTTACAGGAAACACGCTAGTAATGGGAAAGGCCAGACACATAAAACAACAGAGCAGAGCTAAGCCAAACATGAGG
ACACCACAGCCAAAGTTGGAAGAAAGGTTCTACCTCTTCGCCGCAAGCAAGGATTGCAAAAAAACCATGGCAA
GCAAAAGAAACTTTTGAAGAAGTAGAAAGAGAAGAAGAAGATAGCGAGGAGACAGAGGAAGATAGAGATAATGTG
GAGGATGGCTGGAGGTTTGGCGAAAACAACGAGGATGATGACGACGATGAAGAGACCGAGTATGAAGATTAG
```

1164 bp

>AT4G06634.2 AtYY1-2

```
ATGTTAAATTGTATCATTGTGTTGTTGTTATTACCAGAGGATACTTTTAGCAGACTTAAAGAAAAAGAGAAAGAGCCT
GATGTTCCCTGAGCCTGAACCTGAACCAACTACAGAGATTTTGTCTCTGTAGTTATGATGGTTGCGGGAAGACTTTC
TTTGTAGTTAGTGCATTGAGGAAACATTCTCATATCCATGGAGAAAGACAATATGTTTGTGATCAGGAAGGATGTGGA
AAGAAATTTCTGGATAGTTCAAAGTTGAAGAGACATTATCTTATTCATACTGGAGAGAGAAATTATATATGTACTTAT
GAAGGATGTGGAAGGCATTCTCGTTGGATTTAACCTTAGGTCTCACATGAAGACTCATTACAAAGAGAATTATCAT
ATATGTCCTTACAGTGGGTGTGTGAAGAGATATGTCATGAATACAAGCTAAAGAACCACGTTGCTGCCTACCATGAA
AAGAATGGTGGTGGAGAGACTCCCAAATATACACCACCAGCAGAGAAAAGTATTAAGGACTGTCAAACACCTGCAACA
GTTTGTGGCCCGTCTTCGGATCGGCCATACGCATGCCCTTACGAAGGGTGTGAGAAAGCTTACATACATGAGTACAAG
CTTAAGCTCCACTTGAAGAGAGAACATCCAGGGCATTACAAGAAGAGAACCGGATACCCCCACACTGAACAAGCAC
AATGGCAATGACAGGAATGAGATAGATGACGGGAGTGACCAAGATGTTTACAGGAAACACGCTAGTAATGGGAAAGGC
CAGACACATAAAACAACAGAGCAGAGCTAAGCCAAACATGAGGACACCACCAGCCAAAGTTGGAAGAAAGGTTCTACC
TCTTCGCCGCAAGCAAGGATTGCAAAAAAACCATGGCAAGCAAAAGAAACTTTTGAAGAAGTAGAAAGAGAAGAA
GAAGAAGATAGCGAGGAGACAGAGGAAGATAGAGATAATGTGGAGGATGGCTGGAGGTTTGGCGAAAACAACGAGGAT
GATGACGACGATGAAGAGACCGAGTATGAAGATTAG
```

1050 bp

>AT4G06634.3 AtYY1-3

```
ATGGATCATCAAATATCAATACCAAATCCTTTCGAGAGACGACCCATCCTTAAATCCAAAGCTCCTGCTGTGAAG
TGGATCAAAGAATGGGTACCACAAGATATTGTTGCTACAGAGGATACTTTTAGCAGACTTAAAGAAAAAGAGAAAGAG
CCTGATGTTCCCTGAGCCTGAACCTGAACCAACTACAGAGATTTTGTTCCTCTGTAGTTATGATGGTTGCGGGAAGACT
TTCTTTGATGTTAGTGCATTGAGGAAACATTCTCATATCCATGGAGAAAGACAATATGTTTGTGATCAGGAAGGATGT
GGAAAGAAATTTCTGGATAGTTCAAAGTTGAAGAGACATTATCTTATTCATACTGGAGAGAGAAATTATATATGTACT
TATGAAGGATGTGGAAAGTTGTGGATGCAGGCATTCTCGTTGGATTTTAACTTAGGTCACATGAAGACTCATTCA
CAAGAGAATTATCATATATGTCCTTACAGTGGGTGTGTGAAGAGATATGCTCATGAATACAAGCTAAAGAACCACGTT
GCTGCCTACCATGAAAAGAATGGTGGTGGAGAGACTCCCAAATATACACCACCAGCAGAGAAAGTATTAAGGACTGTC
AAAACACCTGCAACAGTTTGTGGCCCGTCTTCGGATCGGCCATACGCATGCCCTACGAAGGGTGTGAGAAAGCTTAC
ATACATGAGTACAAGCTTAAGCTCCACTTGAAGAGAGAACATCCAGGGCATTTACAAGAAGAGAACCGGGATACCCCC
ACACTGAACAAGCACAATGGCAATGACAGGAATGAGATAGATGACGGGAGTGACCAAGATGTTTACAGGAAACACGCT
AGTAATGGGAAAGCCAGACATAAACAACAGAGCAGACTAAGCCAAACATGAGGACACCACCACCAAAGTTGGA
AAGAAAGGTTCTACCTCTTCGCTGCCAAAGCAAGGATTGCAAAAAACCATGGCAAGCAAAAGAACTTTTGAAGAA
GTAGAAAGAGAAGAAGAAGATAGCGAGGAGACAGAGGAAGATAGAGATAATGTGGAGGATGGCTGGAGGTTTGGC
GAAAACAACGAGGATGATGACGACGATGAAGAGACCGAGTATGAAGATTAG
```

1143 bp

Pro výše uvedené kódující sekvence byl proveden multiple sequence alignment s použitím programu Clustal Omega k určení míry jejich vzájemné podobnosti. Získaná data jsou uvedena níže. Stejným způsobem byly také porovnány genomické sekvence. Tato data jsou opět uvedena v kapitole Přílohy (Příloha 2).

```
AtYY1-3      ATGGATCATCAAATATCAATACCAAATCCTTTCGAGAGACGACCCATCCTTAAATCC
AtYY1-1      ATGGATCATCAAATATCAATACCAAATCCTTTCGAGAGACGACCCATCCTTAAATCC
AtYY1-2      -----

AtYY1-3      AAAGCTCCTGCTGTGAAGTGGATCAAAGAATGGGTACCACAAGATATTGTTGCTAC----
AtYY1-1      AAAGCTCCTGCTGTGAAGTGGATCAAAGAATGGGTACCACAAGATATTGTTGCTACAGGT
AtYY1-2      -----ATGT-----T
                        *: *:

AtYY1-3      -----AGAGGATACTTTTAGCAGACTTAAAGAAAA
AtYY1-1      GGAAAGTGTCTCTA-CACAAATGGGTACAGAGGATACTTTTAGCAGACTTAAAGAAAA
AtYY1-2      AAATTGTATCATTGTGTTGTTGTTATTACCAGAGGATACTTTTAGCAGACTTAAAGAAAA
                        *****

AtYY1-3      AGAGAAAGAGCCTGATGTTCCCTGAGCCTGAACCTGAACCAACTACAGAGATTTTGTTC
AtYY1-1      AGAGAAAGAGCCTGATGTTCCCTGAGCCTGAACCTGAACCAACTACAGAGATTTTGTTC
AtYY1-2      AGAGAAAGAGCCTGATGTTCCCTGAGCCTGAACCTGAACCAACTACAGAGATTTTGTTC
                        *****

AtYY1-3      CTGTAGTTATGATGGTTGCGGGAAGACTTTCCTTTGATGTTAGTGCATTGAGGAAACATTC
AtYY1-1      CTGTAGTTATGATGGTTGCGGGAAGACTTTCCTTTGATGTTAGTGCATTGAGGAAACATTC
AtYY1-2      CTGTAGTTATGATGGTTGCGGGAAGACTTTCCTTTGATGTTAGTGCATTGAGGAAACATTC
                        *****

AtYY1-3      TCATATCCATGGAGAAAGACAATATGTTTGTGATCAGGAAGGATGTGGAAAGAAATTTCT
AtYY1-1      TCATATCCATGGAGAAAGACAATATGTTTGTGATCAGGAAGGATGTGGAAAGAAATTTCT
AtYY1-2      TCATATCCATGGAGAAAGACAATATGTTTGTGATCAGGAAGGATGTGGAAAGAAATTTCT
                        *****

AtYY1-3      GGATAGTTCAAAGTTGAAGAGACATTATCTTATTCATACTGGAGAGAGAAATTATATATG
AtYY1-1      GGATAGTTCAAAGTTGAAGAGACATTATCTTATTCATACTGGAGAGAGAAATTATATATG
AtYY1-2      GGATAGTTCAAAGTTGAAGAGACATTATCTTATTCATACTGGAGAGAGAAATTATATATG
                        *****
```

AtYY1-3 TACTTATGAAGGATGTGGAAAGTTGTGGATGCAGGCATTCTCGTTGGATTTTAACTTAG
AtYY1-1 TACTTATGAAGGATGTGGAA-----AGGCATTCTCGTTGGATTTTAACTTAG
AtYY1-2 TACTTATGAAGGATGTGGAA-----AGGCATTCTCGTTGGATTTTAACTTAG

AtYY1-3 GTCTCACATGAAGACTCATTACAAGAGAATTATCATATATGTCCTTACAGTGGGTGTGT
AtYY1-1 GTCTCACATGAAGACTCATTACAAGAGAATTATCATATATGTCCTTACAGTGGGTGTGT
AtYY1-2 GTCTCACATGAAGACTCATTACAAGAGAATTATCATATATGTCCTTACAGTGGGTGTGT

AtYY1-3 GAAGAGATATGCTCATGAATACAAGCTAAAGAACCACGTTGCTGCCTACCATGAAAAGAA
AtYY1-1 GAAGAGATATGCTCATGAATACAAGCTAAAGAACCACGTTGCTGCCTACCATGAAAAGAA
AtYY1-2 GAAGAGATATGCTCATGAATACAAGCTAAAGAACCACGTTGCTGCCTACCATGAAAAGAA

AtYY1-3 TGGTGGTGGAGAGACTCCCAAATATACACCACCAGCAGAGAAAGTATTAAGGACTGTCAA
AtYY1-1 TGGTGGTGGAGAGACTCCCAAATATACACCACCAGCAGAGAAAGTATTAAGGACTGTCAA
AtYY1-2 TGGTGGTGGAGAGACTCCCAAATATACACCACCAGCAGAGAAAGTATTAAGGACTGTCAA

AtYY1-3 AACACCTGCAACAGTTTGTGGCCCGTCTTCGGATCGGCCATACGCATGCCCTTACGAAGG
AtYY1-1 AACACCTGCAACAGTTTGTGGCCCGTCTTCGGATCGGCCATACGCATGCCCTTACGAAGG
AtYY1-2 AACACCTGCAACAGTTTGTGGCCCGTCTTCGGATCGGCCATACGCATGCCCTTACGAAGG

AtYY1-3 GTGTGAGAAAGCTTACATACATGAGTACAAGCTTAAGCTCCACTTGAAGAGAGAACATCC
AtYY1-1 GTGTGAGAAAGCTTACATACATGAGTACAAGCTTAAGCTCCACTTGAAGAGAGAACATCC
AtYY1-2 GTGTGAGAAAGCTTACATACATGAGTACAAGCTTAAGCTCCACTTGAAGAGAGAACATCC

AtYY1-3 AGGGCATTTACAAGAAGAGAACCGGGATACCCCCACACTGAACAAGCACAATGGCAATGA
AtYY1-1 AGGGCATTTACAAGAAGAGAACCGGGATACCCCCACACTGAACAAGCACAATGGCAATGA
AtYY1-2 AGGGCATTTACAAGAAGAGAACCGGGATACCCCCACACTGAACAAGCACAATGGCAATGA

AtYY1-3 CAGGAATGAGATAGATGACGGGAGTGACCAAGATGTTTACAGGAAACACGCTAGTAATGG
AtYY1-1 CAGGAATGAGATAGATGACGGGAGTGACCAAGATGTTTACAGGAAACACGCTAGTAATGG
AtYY1-2 CAGGAATGAGATAGATGACGGGAGTGACCAAGATGTTTACAGGAAACACGCTAGTAATGG

AtYY1-3 GAAAGGCCAGACACATAAACAACAGAGCAGAGCTAAGCCAAACATGAGGACACCACCAGC
AtYY1-1 GAAAGGCCAGACACATAAACAACAGAGCAGAGCTAAGCCAAACATGAGGACACCACCAGC
AtYY1-2 GAAAGGCCAGACACATAAACAACAGAGCAGAGCTAAGCCAAACATGAGGACACCACCAGC

AtYY1-3 CAAAGTTGGAAGAAAGGTTCTACCTCTTCGCCTGCCAAAGCAAGGATTGCAAAAAAACC
AtYY1-1 CAAAGTTGGAAGAAAGGTTCTACCTCTTCGCCTGCCAAAGCAAGGATTGCAAAAAAACC
AtYY1-2 CAAAGTTGGAAGAAAGGTTCTACCTCTTCGCCTGCCAAAGCAAGGATTGCAAAAAAACC

AtYY1-3 ATGGCAAGCAAAAGAAACTTTTGAAGAAGTAGAAAAGAGAAGAAGAAGATAGCGAGGA
AtYY1-1 ATGGCAAGCAAAAGAAACTTTTGAAGAAGTAGAAAAGAGAAGAAGAAGATAGCGAGGA
AtYY1-2 ATGGCAAGCAAAAGAAACTTTTGAAGAAGTAGAAAAGAGAAGAAGAAGATAGCGAGGA

AtYY1-3 GACAGAGGAAGATAGAGATAATGTGGAGGATGGCTGGAGGTTTGGCGAAAACAACGAGGA
AtYY1-1 GACAGAGGAAGATAGAGATAATGTGGAGGATGGCTGGAGGTTTGGCGAAAACAACGAGGA
AtYY1-2 GACAGAGGAAGATAGAGATAATGTGGAGGATGGCTGGAGGTTTGGCGAAAACAACGAGGA

AtYY1-3 TGATGACGACGATGAAGAGACCGAGTATGAAGATTAG
AtYY1-1 TGATGACGACGATGAAGAGACCGAGTATGAAGATTAG
AtYY1-2 TGATGACGACGATGAAGAGACCGAGTATGAAGATTAG

Z databáze UniProt byly získány aminokyselinové sekvence jednotlivých transkripčních variant, pro které byl v rámci této databáze proveden multiple sequence alignment uvedený níže (AtYY1-1: Q2V3L3, AtYY1-2: Q2V3L3-2, AtYY1-3: F4JGT7). C2H2 zinc finger domény jsou v textu zvýrazněny fialovou barvou a coiled-coil domény zelenou barvou. Sekvence byly dále analyzovány pomocí databáze ELM pro identifikaci proteinových domén a funkčních oblastí. Výstupní hodnoty byly následně graficky zpracovány v programu DOG (Obrázek 16).

Q2V3L3	YY1_ARATH	1	MDHQNYQYQNPFFERRPILKSKAPAVKWKIEWVPQDIVATGGKCHLHKWVTEDTFSRLKEK	60
Q2V3L3-2	YY1_ARATH	1	-----MLNCIIVL LLLPEDTF SRLKEK	22
F4JGT7	F4JGT7_ARATH	1	MDHQNYQYQNPFFERRPILKSKAPAVKWKIEWVPQDIVAT-----EDTF SRLKEK	49

Q2V3L3	YY1_ARATH	61	EKEPDVPEPEPEPTTEILFLCSYDGGCGKTFDFVSALRKHSHIHGERQYVCDQEGCGKKFL	120
Q2V3L3-2	YY1_ARATH	23	EKEPDVPEPEPEPTTEILFLCSYDGGCGKTFDFVSALRKHSHIHGERQYVCDQEGCGKKFL	82
F4JGT7	F4JGT7_ARATH	50	EKEPDVPEPEPEPTTEILFLCSYDGGCGKTFDFVSALRKHSHIHGERQYVCDQEGCGKKFL	109

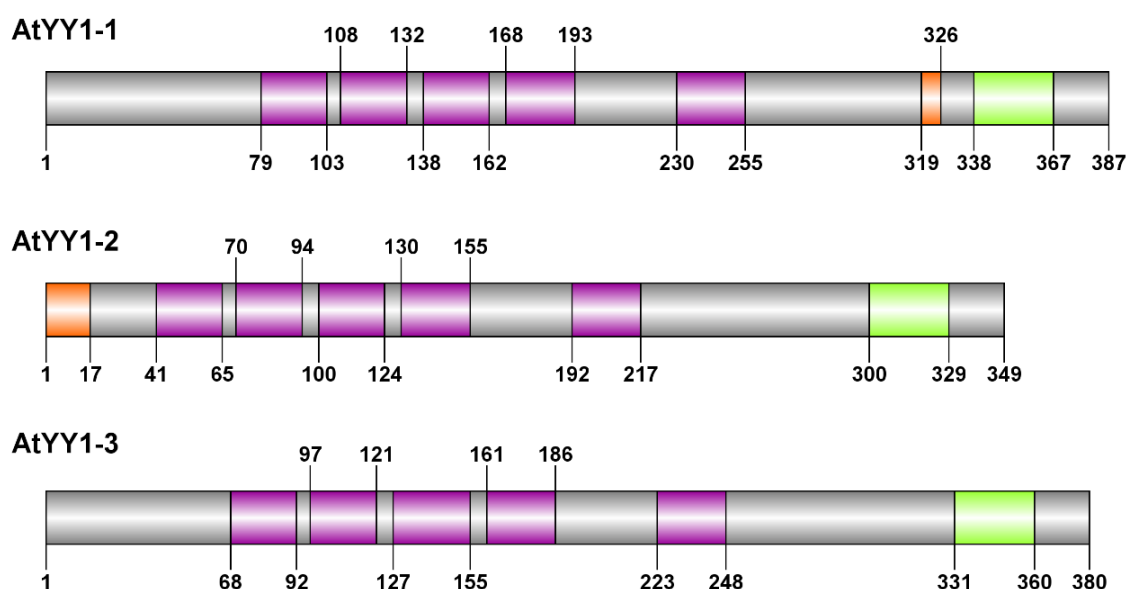
Q2V3L3	YY1_ARATH	121	DSSKLRHYLIHTGERNYICTYEGCGK----AFSLDFNLRSHMKTHSQENYHICPYSGCV	176
Q2V3L3-2	YY1_ARATH	83	DSSKLRHYLIHTGERNYICTYEGCGK----AFSLDFNLRSHMKTHSQENYHICPYSGCV	138
F4JGT7	F4JGT7_ARATH	110	DSSKLRHYLIHTGERNYICTYEGCGKLMQAFSLDFNLRSHMKTHSQENYHICPYSGCV	169

Q2V3L3	YY1_ARATH	177	KRYAHEYKLNHVAAYHEKNGGGETPKYTPPAEKVLRVKTPTATVCGPSSDRPYACPYEG	236
Q2V3L3-2	YY1_ARATH	139	KRYAHEYKLNHVAAYHEKNGGGETPKYTPPAEKVLRVKTPTATVCGPSSDRPYACPYEG	198
F4JGT7	F4JGT7_ARATH	170	KRYAHEYKLNHVAAYHEKNGGGETPKYTPPAEKVLRVKTPTATVCGPSSDRPYACPYEG	229

Q2V3L3	YY1_ARATH	237	CEKAYIHEYKLLHLKREHPGHLQEENADTPTLNKHNGNDRNEIDGSDQDVYRKHASNG	296
Q2V3L3-2	YY1_ARATH	199	CEKAYIHEYKLLHLKREHPGHLQEENADTPTLNKHNGNDRNEIDGSDQDVYRKHASNG	258
F4JGT7	F4JGT7_ARATH	230	CEKAYIHEYKLLHLKREHPGHLQEENADTPTLNKHNGNDRNEIDGSDQDVYRKHASNG	289

Q2V3L3	YY1_ARATH	297	KGQTHKQQRAPKNMRTPPAKVGKGGSTSSPAKARIAKKPWQAKETFEEVEREEEDSEE	356
Q2V3L3-2	YY1_ARATH	259	KGQTHKQQRAPKNMRTPPAKVGKGGSTSSPAKARIAKKPWQAKETFEEVEREEEDSEE	318
F4JGT7	F4JGT7_ARATH	290	KGQTHKQQRAPKNMRTPPAKVGKGGSTSSPAKARIAKKPWQAKETFEEVEREEEDSEE	349

Q2V3L3	YY1_ARATH	357	TEEDRDNVEDGWRFGENNEDDDDEETEYED	387
Q2V3L3-2	YY1_ARATH	319	TEEDRDNVEDGWRFGENNEDDDDEETEYED	349
F4JGT7	F4JGT7_ARATH	350	TEEDRDNVEDGWRFGENNEDDDDEETEYED	380



Obrázek 16: Grafické znázornění proteinových domén a funkčních oblastí u tří transkripčních variant AtYY1 (zpracováno v programu DOG), fialovou barvou jsou označeny C2H2 zinc finger domény, zelenou barvou coiled-coil domény a oranžovou barvou signální peptidy.

5.2 Navržení *attB* PCR primerů

Pro Gateway způsob klonování byly navrženy *attB* PCR primery na základě znalosti sekvencí jednotlivých transkripčních variant, a to tak, aby splňovaly standardní požadavky pro primery (délka 20–25 bp, báze G nebo C na 3' konci, poměr bází GC: 40–60 %, melting/hybridizační teplota: 50–65 °C) a také požadavky Gateway technologie. Primery byly navrženy s použitím programu OligoAnalyzer 3.1 a dodány firmou Eurofins Genomics (Německo).

Pro vizualizaci proteinu v rostlinných buňkách byly připraveny GFP a RFP fúzní varianty, přičemž fúze byla provedena na N-konci i C-konci pro každou transkripční variantu. Souhrn sekvencí *attB* primerů použitých pro Gateway způsob klonování je uveden v Tabulce 4.

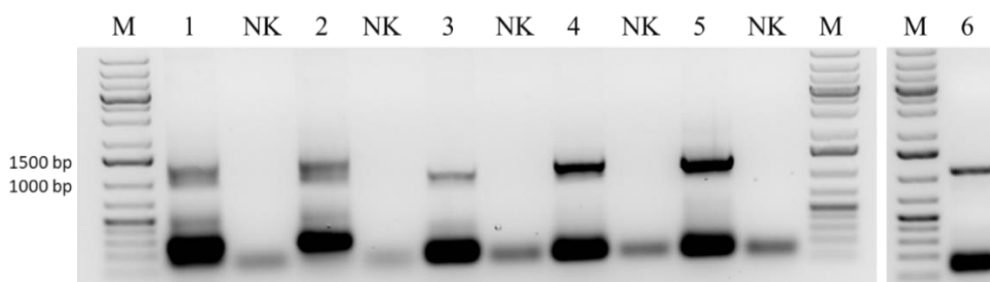
Tabulka 4: Sekvence *attB* primerů použitých pro Gateway způsob klonování.

Transkripční varianta	Fúze	<i>attB</i> primery (forward + reverse)
AtYY1-1	N-term	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT TCATGGAT CATCAAATTATCAATACC + GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT CTCAATCT TCATACTCGGTCTCTTC
	C-term	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT TCATGGAT CATCAAATTATCAATACC + GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT CATCTTCA TACTCGGTCTCTTC
AtYY1-2	N-term	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT TCATGTTA AATTGTATCATTGTGTTGTTG + GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT CTCAATCT TCATACTCGGTCTCTTC
	C-term	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT TCATGTTA AATTGTATCATTGTGTTGTTG + GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT CATCTTCA TACTCGGTCTCTTC
AtYY1-3	N-term	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT TCATGGAT CATCAAATTATCAATACC + GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT CTCAATCT TCATACTCGGTCTCTTC
	C-term	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT TCATGGAT CATCAAATTATCAATACC + GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT CATCTTCA TACTCGGTCTCTTC

Všechny sekvence jsou uvedeny ve směru 5'→3'. 5' konec primeru vždy začíná sekvencí GGGG, kterou následuje sekvence *attB* míst (zvýrazněna podtržením) a genově specifická sekvence (vyznačena tučným písmem). Pro dodržení čtecího rámce byly k *attB1* místu navrženy dva nukleotidy (C a T, vyznačeny modře) tak, aby nevznikl stop kodon. K *attB2* místu byl navíc syntetizován jeden nukleotid (C, vyznačen rovněž modře). Start kodon je označen červenou barvou a stop kodon zelenou barvou.

5.3 Příprava *attB*-PCR produktů

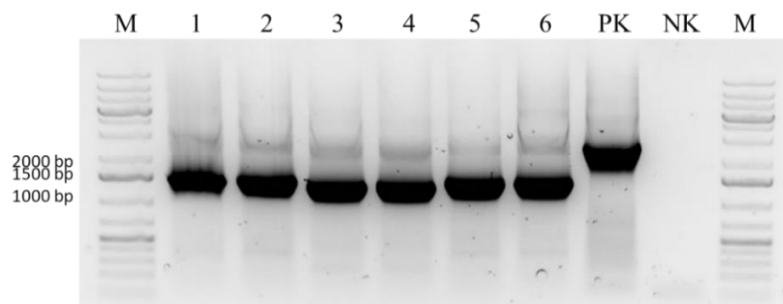
Sekvence cDNA tří transkripčních variant proteinu YY1 byly amplifikovány spolu s rekombinačními *attB* místy pomocí PCR metody s příslušnými *attB* vedoucími (forward) a zpětnými (revers) primery za použití Q5 High-Fidelity DNA polymerázy. Produkty PCR byly následně separovány pomocí agarózové gelové elektroforézy a vizualizovány (Obrázek 17). Získané produkty byly z gelu vyřezány a purifikovány pomocí QIAprep Spin Miniprep Kitu.



Obrázek 17: Detekce *attB*-PCR produktů transkripčních variant AtYY1. **M** – marker relativní molekulové hmotnosti (GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, ready-to-use), **NK** – negativní kontrola, **1** – AtYY1-1 N-term (1164 bp + *attB* místa), **2** – AtYY1-1 C-term (1164 bp + *attB* místa), **3** – AtYY1-2 C-term (1050 bp + *attB* místa), **4** – AtYY1-3 N-term (1143 bp + *attB* místa), **5** – AtYY1-3 C-term (1143 bp + *attB* místa), **6** – AtYY1-2 N-term (1050 bp + *attB* místa).

5.4 BP reakce a transformace bakterií *Escherichia coli*

Dále byla provedena BP rekombinační reakce, při které byly purifikované *attB*-PCR produkty vloženy do donorového vektoru pDONR207 za vzniku vstupních klonů s *attL* rekombinačními místy. Následovala transformace chemicky kompetentních buněk *Escherichia coli* (TOP 10) produkty BP reakce, a to prostřednictvím heat shock metody. Úspěšnost BP reakce a transformace *E. coli* byla ověřena pomocí colony PCR s PerfectTaq Plus DNA polymerázou za použití specifických *attL* primerů. Produkty PCR byly separovány pomocí agarózové gelové elektroforézy a vizualizovány (Obrázek 18).



Obrázek 18: Detekce *attL*-PCR produktů transkripčních variant AtYY1 pro ověření úspěšnosti BP reakce a transformace *E. coli*. **M** – marker relativní molekulové hmotnosti (GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, ready-to-use), **NK** – negativní kontrola, **PK** – pozitivní kontrola: pDONR207::8TPX (2277 bp), **1** – pDONR207::AtYY1-1 N-term (1164 bp + 100 bp *attL* místa), **2** – pDONR207::AtYY1-1 C-term (1164 bp + 100 bp *attL* místa), **3** – pDONR207::AtYY1-2 N-term (1050 bp + 100 bp *attL* místa), **4** – pDONR207::AtYY1-2 C-term (1050 bp + 100 bp *attL* místa), **5** – pDONR207::AtYY1-3 N-term (1143 bp + 100 bp *attL* místa), **6** – pDONR207::AtYY1-3 C-term (1143 bp + 100 bp *attL* místa).

Z bakteriálních kolonií, ve kterých byla ověřena přítomnost inzertu byly konstrukty izolovány a purifikovány pomocí QIAprep Spin Miniprep Kitu. Koncentrace DNA u všech purifikovaných attL-PCR produktů byla změřena pomocí spektrofotometru NanoDrop ND-1000. Čtecí rámec BP konstruktů byl následně ověřen sekvenováním, opět za použití specifických attL primerů.

Sekvence byla provedena technikou pracovníci na pracovišti Ústavu experimentální botaniky AV ČR v Olomouci. Získané sekvence byly dále analyzovány pomocí programu Clustal Omega. Při srovnání výsledků sekvenace produktů BP reakce s daty uvedenými v databázi TAIR10 byla zjištěna shoda sekvence pouze pro transkripční varianty AT4G06634.1 a AT4G06634.2. Transkripční variantu AT4G06634.3 se naklonovat nepodařilo.

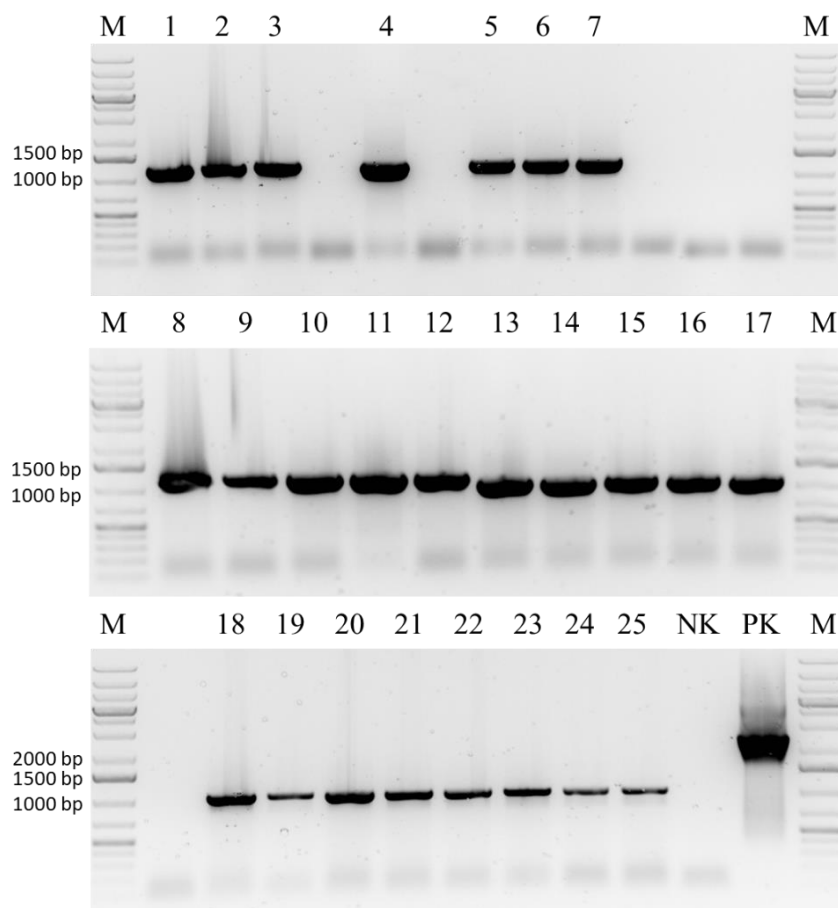
5.5 LR reakce a transformace bakterií *Escherichia coli*

Pro transkripční varianty 1 a 2 byla provedena LR rekombinační reakce, při které byly cílové geny přeneseny ze vstupních klonů s attL místy (BP konstrukty) do destinačních vektorů nesoucích attR místa za vzniku expresních klonů s attB místy. Jednotlivé varianty konstruktů jsou uvedeny v Tabulce 5.

Tabulka 5: Varianty produktů LR rekombinační reakce.

Transkripční varianta	Fúze	Destinační vektor
AtYY1-1	N-term GFP	pH7WGF2,0
	N-term RFP	pK7WGR2,0
	C-term GFP	pH7FWG2,0
	C-term RFP	pB7RWG2,0
AtYY1-2	N-term GFP	pH7WGF2,0
	N-term RFP	pK7WGR2,0
	C-term GFP	pH7FWG2,0
	C-term RFP	pB7RWG2,0

LR konstrukt byl následně vnesen opět pomocí heat shock metody do chemicky kompetentních buněk *Escherichia coli* (TOP 10). Úspěšnost LR reakce a transformace byla stejně jako v předchozím případě ověřena pomocí colony PCR za použití specifických primerů bez attB míst pro zájmový gen. Sekvence primerů bez attB míst jsou uvedeny v kapitole Přílohy (Příloha 3). Produkty PCR byly separovány pomocí agarózové gelové elektroforézy a vizualizovány (Obrázek 19).

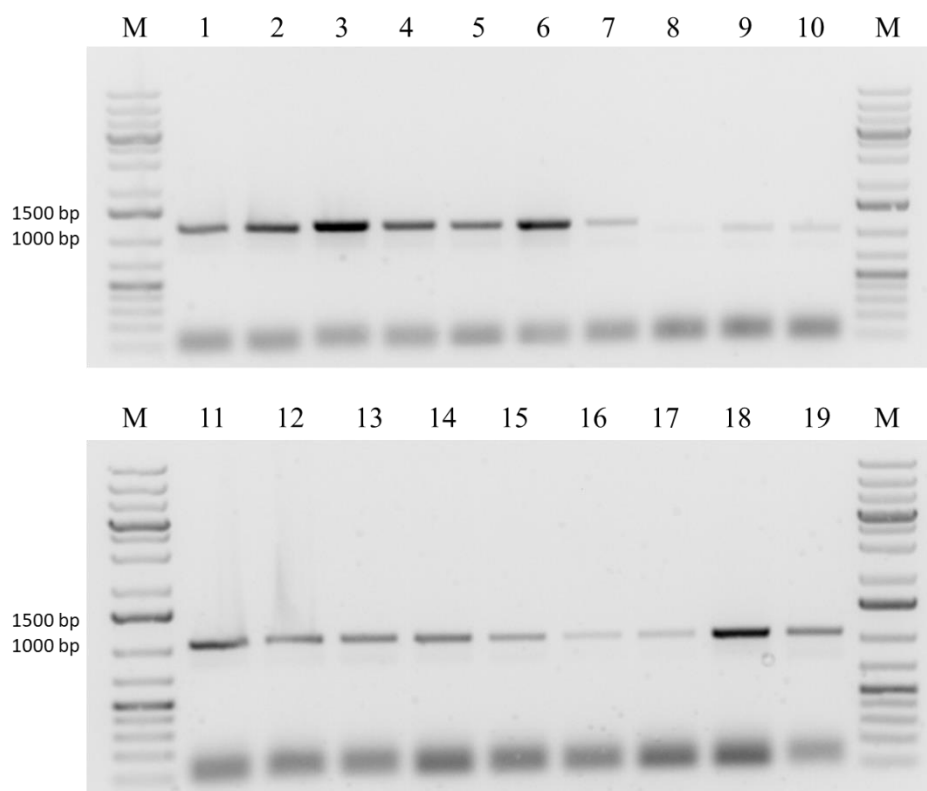


Obrázek 19: Detekce PCR produktů transkripčních variant AtYY1 pro ověření úspěšnosti LR reakce a transformace *E. coli*. **M** – marker relativní molekulové hmotnosti (GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, ready-to-use), **NK** – negativní kontrola, **PK** – pozitivní kontrola: pDONR207::8TPX (2277 bp), **1–3** pH7WGF2,0::AtYY1-1 N-term GFP (1164 bp), **4** – pK7WGR2,0::AtYY1-1 N-term RFP (1164 bp), **5–7** pH7FWG2,0::AtYY1-1 C-term GFP (1164 bp), **8–12** pB7RWG2,0::AtYY1-1 C-term RFP (1164 bp), **13–17** pH7WGF2,0::AtYY1-2 N-term GFP (1050 bp), **18–19** pK7WGR2,0::AtYY1-2 N-term RFP (1050 bp), **20–22** pH7FWG2,0::AtYY1-2 C-term GFP (1050 bp), **23–25** pB7RWG2,0::AtYY1-2 C-term RFP (1050 bp).

Z bakteriálních kolonií, ve kterých byla ověřena přítomnost a správná velikost inzertu byly izolovány plazmidy pomocí QIAprep Spin Miniprep Kitu.

5.6 Transformace bakterií *Agrobacterium tumefaciens*

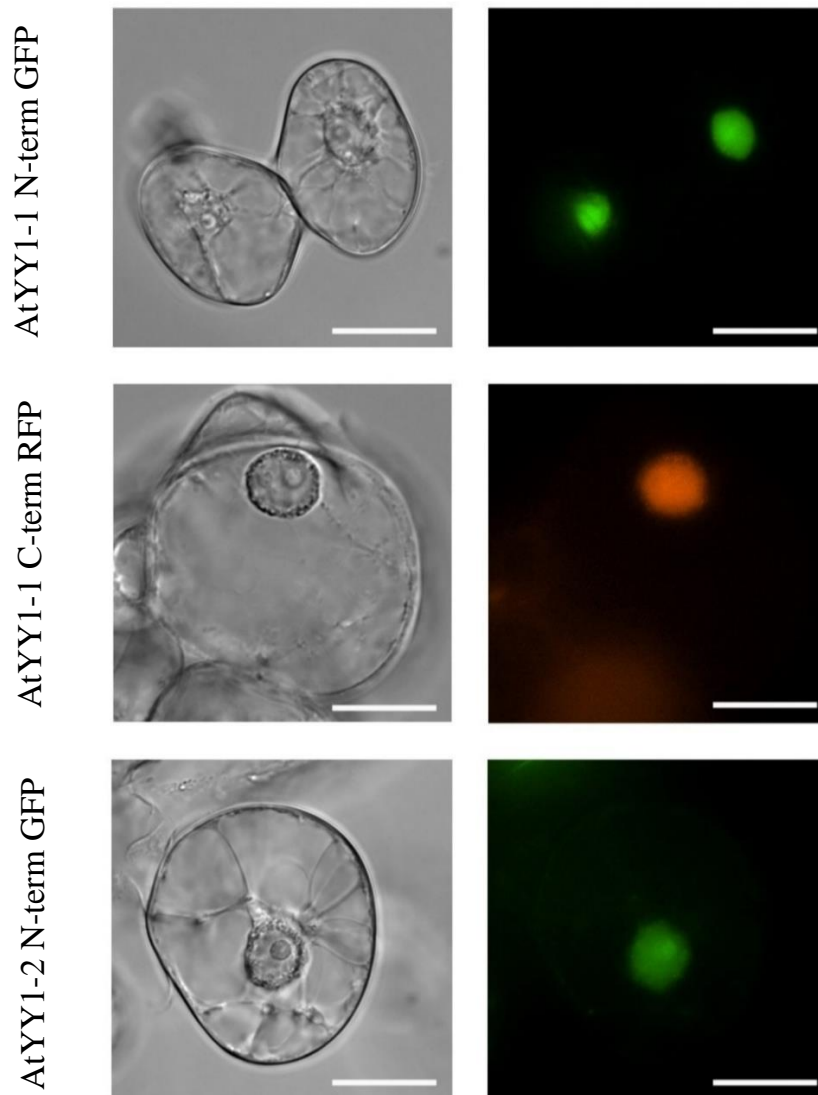
Izolovanými plazmidy (LR konstrukty) byly transformovány chemicky kompetentní buňky *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101) pomocí freeze-thaw metody. Úspěšnost transformace byla ověřena prostřednictvím colony PCR za použití příslušných primerů bez *attB* míst pro zájmový gen. Produkty PCR byly opět separovány pomocí agaróзовé gelové elektroforézy a vizualizovány (Obrázek 20). Jediným konstruktem, kterým se nepodařilo transformovat *A. tumefaciens* byl pK7NGR2,0::AtYY1-1 N-term RFP.



Obrázek 20: Detekce PCR produktů transkripčních variant AtYY1 pro ověření úspěšnosti transformace *A. tumefaciens*. **M** – marker relativní molekulové hmotnosti (GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, ready-to-use), **1–3** pH7WGF2,0::AtYY1-1 N-term GFP (1164 bp), **4** – pH7FWG2,0::AtYY1-1 C-term GFP (1164 bp), **5–7** pB7RWG2,0::AtYY1-1 C-term RFP (1164 bp), **8–10** pH7WGF2,0::AtYY1-2 N-term GFP (1050 bp), **11–12** pK7WGR2,0::AtYY1-2 N-term RFP (1050 bp), **13–15** pH7FWG2,0::AtYY1-2 C-term GFP (1050 bp), **16–19** pB7RWG2,0::AtYY1-2 C-term RFP (1050 bp).

5.7 Transformace suspenzních buněčných kultur

Expres získaných konstruktů (viz Obrázek 18, produkty označené čísly 3, 4, 6, 9, 11, 14 a 18) byla ověřena pomocí transformace suspenzní buněčné kultury *Arabidopsis thaliana* (*Ler*) pomocí *Agrobacterium tumefaciens* nesoucím příslušný konstrukt. Po sedmi dnech kokultivace *A. tumefaciens* a buněk *Ler* byla pozorována exprese GFP/RFP fúzních proteinů u variant AtYY1-1 N-term GFP, AtYY1-1 C-term RFP a AtYY1-2 N-term GFP (Obrázek 21). Buněčné kultury s pozorovatelnou expresí konstruktů, a tedy pozitivním výsledkem transformace, byly nadále kultivovány s příslušnými antibiotiky (viz Tabulka 3), které působí jako selekční faktor a antibiotikem pro odbourání *A. tumefaciens* (Claforan). Podařilo se tak odvodit stabilní suspenzní kulturu, která bude sloužit k dalším experimentům.

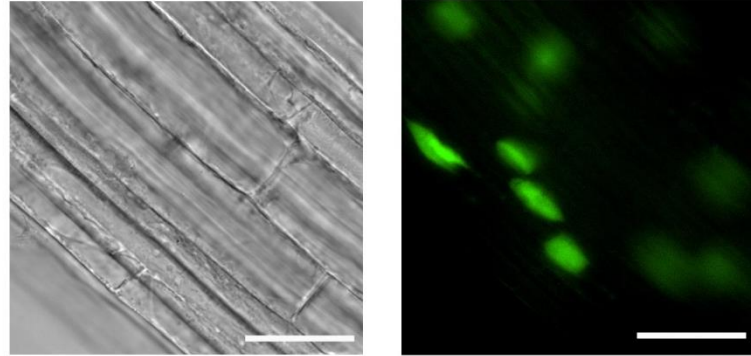
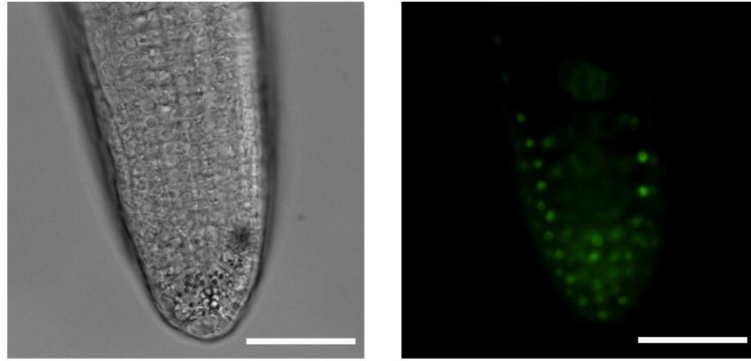


Obrázek 21: Lokalizace konstruktů AtYY1-1 N-term GFP, AtYY1-1 C-term RFP a AtYY1-2 N-term GFP v interfázních jádrech buněk suspenzní kultury odvozené od rostliny *Arabidopsis thaliana* ekotyp *Landsberg erecta* (*Ler*). Pro každý z konstruktů je uvedena fotografie v DIC a po excitaci fúzovaného fluorescenčního proteinu zářením příslušné vlnové délky. Použité zvětšení 40x, měřítko = 20 μ m.

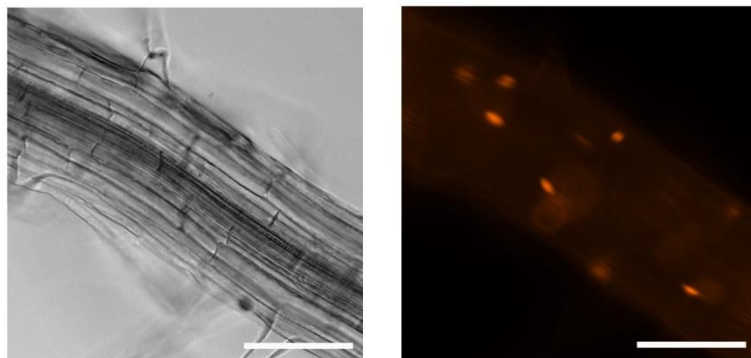
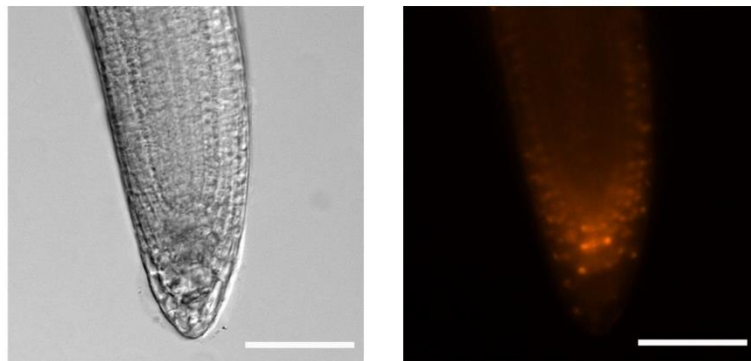
5.8 Transformace a selekce rostlin

Pro ověření exprese konstruktů (viz Obrázek 18, produkty označené čísly 3, 4, 6, 9, 11, 14 a 18) v rostlinách byly pomocí *Agrobacterium tumefaciens* nesoucího daný LR konstrukt transformovány rostliny *Arabidopsis thaliana* (*Col-0*, *Ler*) modifikovanou metodou floral dip. V případě rostlin byla semena transformovaných rostlin podrobena selekci vysetím na $\frac{1}{2}$ MS médium obsahující příslušná antibiotika podle typu vneseného vektoru (viz Tabulka 3). Pozitivní selekce rostlin na médiu byla dále ověřena vizuálně s použitím fluorescenčního mikroskopu. Transformace rostlin se zdařila pouze pro varianty AtYY1-1 C-term RFP a AtYY1-1 N-term GFP u ekotypu *Columbia* (Obrázek 22). Pro transkripční varianty 1 a 2 u AtYY1 tak byla potvrzena lokalizace v interfázním jádře.

AtYY1-1 N-term GFP



AtYY1-1 C-term RFP



Obrázek 22: Lokalizace konstruktů AtYY1-1 N-term GFP a AtYY1-1 C-term RFP v interfázních jádrech buněk rostliny *Arabidopsis thaliana* ekotyp *Columbia* (*Col-0*). Pro oba konstrukty je uvedena fotografie kořenové špičky a elongační zóny kořene, a to v DIC a po excitaci fúzovaného fluorescenčního proteinu zářením příslušné vlnové délky. Použité zvětšení 20x (s výjimkou snímku elongační zóny kořene u varianty AtYY1-1 N-term GFP, kde bylo použito zvětšení 40x), měřítko = 50 μm .

6 DISKUZE

V pracovní skupině, které jsem byla při zpracování své bakalářské práce součástí, je cílem charakterizace jaderných proteinů rostlin a jednou ze zájmových skupin proteinů jsou také architekturální proteiny, které se podílí na organizaci chromatinu v jádře. Ke studiu byl protein YY1 vybrán právě pro jeho funkce spojené s utvářením DNA smyček a interakcí s CTCF proteinem, který se spolu s SMC proteiny (např. kohezinem) podílí na regulaci genové exprese stabilizací chromatinových smyček (Vietri Rudan *et al.*, 2015). Tyto funkce však byly doposud experimentálně ověřeny pouze u živočichů. U rostlin je protein YY1 zmiňován především v souvislosti s regulací genové exprese za přítomnosti stresových faktorů a s jeho rolí v signální dráze kyseliny abscisové. Pro charakterizaci transkripčních variant AtYY1 v rámci této práce byla nejprve provedena analýza *in silico* a následně byly vytvořeny vhodné konstrukty pro ověření lokalizace proteinu v rostlinných buňkách.

V rámci *in silico* analýzy byla prokázána vysoká podobnost všech tří transkripčních variant AtYY1. Aminokyselinové sekvence jsou téměř totožné, přičemž jeden z rozdílů představuje zkrácený N-konec u transkripční varianty 2, kde je navíc přítomen i signální peptid. Signální peptid byl rovněž identifikován u transkripční varianty 1 poblíž C-konce. V oblasti domén zůstávají sekvence také téměř zcela zachovány pro všechny varianty. Výjimkou je pouze transkripční varianta 3, která se nepatrně liší počtem aminokyselin v rámci jedné zinc finger domény. Každá z transkripčních variant AtYY1 nese čtyři po sobě následující zinc finger domény a jednu samostatnou zinc finger doménu. Dále je také pro všechny varianty společná přítomnost C-terminální coiled-coil domény, která je u proteinů obecně významná z hlediska dimerizace.

Nejvyšší podobnost byla prokázána u transkripčních variant 1 a 3. Tato podobnost může být také důvodem, proč se variantu 3 nepodařilo naklonovat. Podobnost v rámci zinc finger domén u rostlinného a lidského YY1 (UniProt: P25490) je rovněž vysoká. Jejich srovnání bylo provedeno pomocí programu Clustal Omega. V případě transkripčních variant 1 a 2 jsou sekvence čtyř po sobě následujících zinc finger domén z 53,5 % identické se sekvencemi zinc finger domén lidského YY1. U varianty 3 je identita zinc finger domén rovna 51,4 %. Tyto hodnoty tak potvrzují, že se jedná o evolučně vysoce konzervovaný protein, a to především v oblasti domén.

Pro ověření lokalizace jednotlivých transkripčních variant AtYY1 v rostlinných buňkách byly nejprve vytvořeny vhodné konstrukty pomocí Gateway technologie. Binární T-DNA vektory, které se mohou replikovat v *E. coli* i *A. tumefaciens* bývají obecně velké a klonování tak může být časově náročné a obtížné. Tato metoda představuje poměrně rychlou a spolehlivou alternativu pro klonování sekvencí do velkých plazmidů.

V rámci experimentální analýzy bylo cílem navržení příslušných *attB* PCR primerů pro jednotlivé transkripční varianty následované samotným klonováním a přenosem vytvořených konstruktů pomocí *A. tumefaciens* do rostlin a suspenzních buněčných kultur *A. thaliana* za účelem lokalizace proteinu v buňce s využitím fluorescenční mikroskopie. Tyto cíle byly naplněny pouze částečně. Naklonovat sekvence se podařilo pro transkripční varianty 1 a 2, v případě poslední varianty se klonování nezdařilo. Důvodem pro to mohla být, jak již bylo zmíněno výše, vysoká podobnost s transkripční variantou 1. U transkripčních variant 1 a 2 byla potvrzena lokalizace v interfázním jádře.

Lokalizační analýzy související s YY1 již byly provedeny dříve. V rámci těchto studií bylo zjištěno, že YY1 mění subcelulární lokalizaci v průběhu buněčného cyklu, přičemž primárně je lokalizován v cytoplazmě a do jádra se přemísťuje na počátku S fáze (Palko *et al.*, 2004). V pozdní S fázi se vrací zpět do cytoplazmy a do jádra se dostává opět až v pozdní telofázi, kdy asociuje s dekonzenzovanými chromozomy a pravděpodobně se tak podílí na označování aktivovaných a potlačovaných genů (Rizkallah *et Hurt*, 2009). Tento stav byl ale zjištěn pouze u živočišného proteinu YY1. V rámci dalších studií by tak mohly být provedeny lokalizační analýzy transkripčních variant AtYY1 spojené s jejich distribucí v buňce v průběhu mitózy.

7 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo charakterizovat tři transkripční varianty AtYY1 (AT4G06634). Nejprve byly příslušné sekvence porovnány v rámci *in silico* analýzy. Následně byly pomocí Gateway® technologie vytvořeny vhodné konstrukty, které byly pomocí *Agrobacterium tumefaciens* přeneseny do rostlin a suspenzních buněčných kultur *Arabidopsis thaliana* pro ověření lokalizace proteinu v rostlinných buňkách.

Porovnáním sekvencí jednotlivých transkripčních variant AtYY1 bylo zjištěno, že všechny tři sekvence vykazují vysokou míru podobnosti, a to především v oblastech zinc finger domén. V rámci experimentální analýzy byly cíle naplněny pouze částečně. Byla prokázána lokalizace v interfázním jádře pro transkripční varianty 1 a 2. Transkripční variantu 3 se ale naklonovat nepodařilo. Důvodem může být také specifčnost exprese jednotlivých transkripčních variant pro určitý typ rostlinných pletiv a orgánů, pro ověření této hypotézy budou proto provedeny další experimenty. Materiál získaný v průběhu experimentu bude v budoucnu sloužit k dalšímu výzkumu jaderných proteinů u rostlin.

8 LITERATURA

- Alexander, Karen E., a Rode Rizkallah. „Aurora A Phosphorylation of YY1 during Mitosis Inactivates Its DNA Binding Activity". *Scientific Reports* 7, č. 1 (30. srpen 2017): 10084. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10935-5>.
- Allouche, Abdelkader, Gregory Nolens, Annalisa Tancredi, Laurence Delacroix, Julie Mardaga, Viviana Fridman, Rosita Winkler, Jacques Boniver, Philippe Delvenne, a Dominique Y Begon. „The combined immunodetection of AP-2 α and YY1 transcription factors is associated with ERBB2 gene overexpression in primary breast tumors". *Breast Cancer Research : BCR* 10, č. 1 (2008): R9. <https://doi.org/10.1186/bcr1851>.
- An, Gynheung, Paul R. Ebert, Amitava Mitra, a Sam B. Ha. „Binary Vectors". In *Plant Molecular Biology Manual*, 29–47. Springer, Dordrecht, 1989. https://doi.org/10.1007/978-94-009-0951-9_3.
- Atchison, Michael L. „Function of YY1 in Long-Distance DNA Interactions". *Frontiers in Immunology* 5 (10. únor 2014). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00045>.
- Basu, Arindam, Frank H. Wilkinson, Kristen Colavita, Colin Fennelly, a Michael L. Atchison. „YY1 DNA Binding and Interaction with YAF2 Is Essential for Polycomb Recruitment". *Nucleic Acids Research* 42, č. 4 (1. únor 2014): 2208–23. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1187>.
- Bateman, Alex, Maria Jesus Martin, Claire O'Donovan, Michele Magrane, Emanuele Alpi, Ricardo Antunes, Benoit Bely, et al. „UniProt: The Universal Protein Knowledgebase". *Nucleic Acids Research* 45, č. D1 (4. leden 2017): D158–69. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1099>.
- Baumeister, Peter, Shengzhan Luo, William C. Skarnes, Guangchao Sui, Edward Seto, Yang Shi, a Amy S. Lee. „Endoplasmic Reticulum Stress Induction of the Grp78/BiP Promoter: Activating Mechanisms Mediated by YY1 and Its Interactive Chromatin Modifiers". *Molecular and Cellular Biology* 25, č. 11 (červen 2005): 4529–40. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.11.4529-4540.2005>.
- Begon, Dominique Y., Laurence Delacroix, Douglas Vernimmen, Pascale Jackers, a Rosita Winkler. „Yin Yang 1 Cooperates with Activator Protein 2 to Stimulate ERBB2 Gene Expression in Mammary Cancer Cells". *The Journal of Biological Chemistry* 280, č. 26 (1. červenec 2005): 24428–34. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503790200>.
- Berardini Tanya Z., Reiser Leonore, Li Donghui, Mezheritsky Yarik, Muller Robert, Strait Emily, a Huala Eva. „The arabidopsis information resource: Making and mining the “gold standard” annotated reference plant genome". *genesis* 53, č. 8 (22. červenec 2015): 474–85. <https://doi.org/10.1002/dvg.22877>.
- Brooks, Tracy A., Samantha Kendrick, a Laurence Hurley. „Making Sense of G-Quadruplex and i-Motif Functions in Oncogene Promoters". *The FEBS Journal* 277, č. 17 (září 2010): 3459–69. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07759.x>.
- Cassandri, Matteo, Artem Smirnov, Flavia Novelli, Consuelo Pitolli, Massimiliano Agostini, Michal Malewicz, Gerry Melino, a Giuseppe Raschella. „Zinc-Finger Proteins in Health and Disease". *Cell Death Discovery* 3 (13. listopad 2017): 17071. <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2017.71>.

- Clough, Steven J., a Andrew F. Bent. „Floral Dip: A Simplified Method For Agrobacterium-Mediated Transformation Of Arabidopsis Thaliana". *The Plant Journal* 16, č. 6 (1. prosinec 1998): 735–43. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1998.00343.x>.
- Deng, Z., M. Wan, P. Cao, A. Rao, S. D. Cramer, a G. Sui. „Yin Yang 1 Regulates the Transcriptional Activity of Androgen Receptor". *Oncogene* 28, č. 42 (22. říjen 2009): 3746–57. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.231>.
- Deplancke, Bart, Daniel Alpern, a Vincent Gardeux. „The Genetics of Transcription Factor DNA Binding Variation". *Cell* 166, č. 3 (28. červenec 2016): 538–54. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.012>.
- Dinkel, Holger, Kim Van Roey, Sushama Michael, Manjeet Kumar, Bora Uyar, Brigitte Altenberg, Vladislava Milchevskaya, et al. „ELM 2016--Data Update and New Functionality of the Eukaryotic Linear Motif Resource". *Nucleic Acids Research* 44, č. D1 (4. leden 2016): D294-300. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1291>.
- Dixon, Jesse R., Siddarth Selvaraj, Feng Yue, Audrey Kim, Yan Li, Yin Sen, Ming Hu, Jun S. Luis, a Bing Ren. „Topological Domains in Mammalian Genomes Identified by Analysis of Chromatin Interactions". *Nature* 485, č. 7398 (11. duben 2012): 376–80. <https://doi.org/10.1038/nature11082>.
- Donohoe, Mary E., Li-Feng Zhang, Na Xu, Yang Shi, a Jeannie T. Lee. „Identification of a Ctf cofactor, Yy1, for the X Chromosome Binary Switch". *Molecular Cell* 25, č. 1 (12. leden 2007): 43–56. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.11.017>.
- Gibcus, Johan H., a Job Dekker. „The Hierarchy of the 3D Genome". *Molecular Cell* 49, č. 5 (7. březen 2013): 773–82. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.02.011>.
- Gibson, T. J., J. P. Postma, R. S. Brown, a P. Argos. „A Model for the Tertiary Structure of the 28 Residue DNA-Binding Motif ('zinc Finger') Common to Many Eukaryotic Transcriptional Regulatory Proteins". *Protein Engineering* 2, č. 3 (září 1988): 209–18.
- Gordon, S., G. Akopyan, H. Garban, a B. Bonavida. „Transcription Factor YY1: Structure, Function, and Therapeutic Implications in Cancer Biology". *Oncogene* 25, č. 8 (23. únor 2006): 1125–42. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209080>.
- Green, Douglas R. „Apoptotic Pathways: Paper Wraps Stone Blunts Scissors". *Cell* 102, č. 1 (7. červenec 2000): 1–4. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00003-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00003-9).
- Harrison, Samuel J., Ellie K. Mott, Kate Parsley, Sue Aspinall, John C. Gray, a Amanda Cottage. „A rapid and robust method of identifying transformed Arabidopsis thaliana seedlings following floral dip transformation". *Plant Methods* 2 (6. listopad 2006): 19. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-2-19>.
- Harrison, Stephen C. „A Structural Taxonomy of DNA-Binding Domains". *Nature* 353, č. 6346 (říjen 1991): 715–19. <https://doi.org/10.1038/353715a0>.
- Hartley, J. L., G. F. Temple, a M. A. Brasch. „DNA Cloning Using in Vitro Site-Specific Recombination". *Genome Research* 10, č. 11 (listopad 2000): 1788–95.
- Huang, Weiwei, Philip J. Smaldino, Qiang Zhang, Lance D. Miller, Paul Cao, Kristin Stadelman, Meimei Wan, et al. „Yin Yang 1 Contains G-Quadruplex Structures in Its Promoter and 5'-UTR and Its Expression Is Modulated by G4 Resolvase 1". *Nucleic Acids Research* 40, č. 3 (únor 2012): 1033–49. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr849>.

- Hurst, H. C. „Transcription Factors 1: BZIP Proteins". *Protein Profile* 2, č. 2 (1995): 101–68.
- Kersey, Paul Julian, James E. Allen, Alexis Allot, Matthieu Barba, Sanjay Boddu, Bruce J. Bolt, Denise Carvalho-Silva, et al. „Ensembl Genomes 2018: An Integrated Omics Infrastructure for Non-Vertebrate Species". *Nucleic Acids Research* 46, č. D1 (4. leden 2018): D802–8. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1011>.
- Ko, Chiung-Yuan, Hey-Chi Hsu, Meng-Ru Shen, Wen-Chang Chang, a Ju-Ming Wang. „Epigenetic Silencing of CCAAT/Enhancer-Binding Protein Delta Activity by YY1/Polycomb Group/DNA Methyltransferase Complex". *The Journal of Biological Chemistry* 283, č. 45 (7. listopad 2008): 30919–32. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804029200>.
- Krishna, S. Sri, Indraneel Majumdar, a Nick V. Grishin. „Structural Classification of Zinc Fingers: Survey and Summary". *Nucleic Acids Research* 31, č. 2 (15. leden 2003): 532–50. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg161>.
- Lai, Zhibing, Craig M. Schluttenhofer, Ketaki Bhide, Jacob Shreve, Jyothi Thimmapuram, Sang Yeol Lee, Dae-Jin Yun, a Tesfaye Mengiste. „MED18 Interaction with Distinct Transcription Factors Regulates Multiple Plant Functions". *Nature Communications* 5 (2014): 3064. <https://doi.org/10.1038/ncomms4064>.
- Laity, J. H., B. M. Lee, a P. E. Wright. „Zinc Finger Proteins: New Insights into Structural and Functional Diversity". *Current Opinion in Structural Biology* 11, č. 1 (únor 2001): 39–46.
- Landy, A. „Dynamic, Structural, and Regulatory Aspects of Lambda Site-Specific Recombination". *Annual Review of Biochemistry* 58 (1989): 913–49. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.58.070189.004405>.
- Latchman, David S. „Transcription factors: An overview". *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 29, č. 12 (1. prosinec 1997): 1305–12. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(97\)00085-X](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(97)00085-X).
- Lazarovici, Allan, Tianyin Zhou, Anthony Shafer, Ana Carolina Dantas Machado, Todd R. Riley, Richard Sandstrom, Peter J. Sabo, et al. „Probing DNA Shape and Methylation State on a Genomic Scale with DNase I". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, č. 16 (16. duben 2013): 6376–81. <https://doi.org/10.1073/pnas.1216822110>.
- Li, Tian, Xiu-Yun Wu, Hui Li, Jian-Hui Song, a Jin-Yuan Liu. „A Dual-Function Transcription Factor, AtYY1, Is a Novel Negative Regulator of the Arabidopsis ABA Response Network". *Molecular Plant* 9, č. 5 (02 2016): 650–61. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.02.010>.
- Liu, Xiao, Cheol-Koo Lee, Joshua A. Granek, Neil D. Clarke, a Jason D. Lieb. „Whole-genome comparison of Leu3 binding in vitro and in vivo reveals the importance of nucleosome occupancy in target site selection". *Genome Research* 16, č. 12 (prosinec 2006): 1517–28. <https://doi.org/10.1101/gr.5655606>.
- Mackay, J. P., a M. Crossley. „Zinc Fingers Are Sticking Together". *Trends in Biochemical Sciences* 23, č. 1 (leden 1998): 1–4.

- Mai, R.-T., T.-S. Yeh, C.-F. Kao, S.-K. Sun, H.-H. Huang, a Y.-H. Wu Lee. „Hepatitis C Virus Core Protein Recruits Nucleolar Phosphoprotein B23 and Coactivator P300 to Relieve the Repression Effect of Transcriptional Factor YY1 on B23 Gene Expression". *Oncogene* 25, č. 3 (19. leden 2006): 448–62. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209052>.
- Matthews, K S. „DNA looping." *Microbiological Reviews* 56, č. 1 (březen 1992): 123–36.
- Meijsing, Sebastiaan H., Miles A. Pufall, Alex Y. So, Darren L. Bates, Lin Chen, a Keith R. Yamamoto. „DNA Binding Site Sequence Directs Glucocorticoid Receptor Structure and Activity". *Science (New York, N.Y.)* 324, č. 5925 (17. duben 2009): 407–10. <https://doi.org/10.1126/science.1164265>.
- Palko, Linda, Hank W. Bass, Maroun J. Beyrouthy, a Myra M. Hurt. „The Yin Yang-1 (YY1) Protein Undergoes a DNA-Replication-Associated Switch in Localization from the Cytoplasm to the Nucleus at the Onset of S Phase". *Journal of Cell Science* 117, č. Pt 3 (26. leden 2004): 465–76. <https://doi.org/10.1242/jcs.00870>.
- Panne, Daniel. „The Enhanceosome". *Current Opinion in Structural Biology* 18, č. 2 (duben 2008): 236–42. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2007.12.002>.
- Petrella, Brenda L., a Constance E. Brinckerhoff. „PTEN suppression of YY1 induces HIF-2 α activity in von Hippel Lindau null renal cell carcinoma". *Cancer biology & therapy* 8, č. 14 (červenec 2009): 1389–1401.
- Ren, Jian, Longping Wen, Xinjiao Gao, Changjiang Jin, Yu Xue, a Xuebiao Yao. „DOG 1.0: Illustrator of Protein Domain Structures". *Cell Research* 19, č. 2 (únor 2009): 271–73. <https://doi.org/10.1038/cr.2009.6>.
- Rizkallah, Raed, a Myra M. Hurt. „Regulation of the Transcription Factor YY1 in Mitosis through Phosphorylation of Its DNA-binding Domain". *Molecular Biology of the Cell* 20, č. 22 (15. listopad 2009): 4766–76. <https://doi.org/10.1091/mbc.E09-04-0264>.
- Shi, Y., E. Seto, L. S. Chang, a T. Shenk. „Transcriptional Repression by YY1, a Human GLI-Krüppel-Related Protein, and Relief of Repression by Adenovirus E1A Protein". *Cell* 67, č. 2 (18. říjen 1991): 377–88.
- Shi, Yang, Jeng-Shin Lee, a Katherine M. Galvin. „Everything you have ever wanted to know about Yin Yang 1....." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1332, č. 2 (18. duben 1997): F49–66. [https://doi.org/10.1016/S0304-419X\(96\)00044-3](https://doi.org/10.1016/S0304-419X(96)00044-3).
- Sievers, Fabian, a Desmond G. Higgins. „Clustal Omega for Making Accurate Alignments of Many Protein Sequences". *Protein Science: A Publication of the Protein Society* 27, č. 1 (leden 2018): 135–45. <https://doi.org/10.1002/pro.3290>.
- Siggers, Trevor, Michael H. Duyzend, Jessica Reddy, Sidra Khan, a Martha L. Bulyk. „Non-DNA-Binding Cofactors Enhance DNA-Binding Specificity of a Transcriptional Regulatory Complex". *Molecular Systems Biology* 7 (6. prosinec 2011): 555. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.89>.
- Song, Guisheng, a Li Wang. „Nuclear Receptor SHP Activates MiR-206 Expression via a Cascade Dual Inhibitory Mechanism". *PLoS One* 4, č. 9 (1. září 2009): e6880. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006880>.

- Spitz, François, a Eileen E. M. Furlong. „Transcription Factors: From Enhancer Binding to Developmental Control". *Nature Reviews. Genetics* 13, č. 9 (září 2012): 613–26. <https://doi.org/10.1038/nrg3207>.
- Splinter, Erik, Helen Heath, Jurgen Kooren, Robert-Jan Palstra, Petra Klous, Frank Grosveld, Niels Galjart, a Wouter de Laat. „CTCF Mediates Long-Range Chromatin Looping and Local Histone Modification in the Beta-Globin Locus". *Genes & Development* 20, č. 17 (1. září 2006): 2349–54. <https://doi.org/10.1101/gad.399506>.
- Stormo, G. D. „DNA Binding Sites: Representation and Discovery". *Bioinformatics (Oxford, England)* 16, č. 1 (leden 2000): 16–23.
- Struhl, Kevin. „Helix-Turn-Helix, Zinc-Finger, and Leucine-Zipper Motifs for Eukaryotic Transcriptional Regulatory Proteins". *Trends in Biochemical Sciences* 14, č. 4 (1. duben 1989): 137–40. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(89\)90145-X](https://doi.org/10.1016/0968-0004(89)90145-X).
- Sui, Guangchao, El Bachir Affar, Yujiang Shi, Chrystelle Brignone, Nathan R. Wall, Peng Yin, Mary Donohoe, et al. „Yin Yang 1 Is a Negative Regulator of P53". *Cell* 117, č. 7 (25. červen 2004): 859–72. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.06.004>.
- Vietri Rudan, Matteo, a Suzana Hadjur. „Genetic Tailors: CTCF and Cohesin Shape the Genome During Evolution". *Trends in Genetics* 31, č. 11 (1. listopad 2015): 651–60. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.09.004>.
- Vietri Rudan, Matteo, Christopher Barrington, Stephen Henderson, Christina Ernst, Duncan T. Odom, Amos Tanay, a Suzana Hadjur. „Comparative Hi-C Reveals that CTCF Underlies Evolution of Chromosomal Domain Architecture". *Cell Reports* 10, č. 8 (26. únor 2015): 1297–1309. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.02.004>.
- Vinson, C. R., P. B. Sigler, a S. L. McKnight. „Scissors-Grip Model for DNA Recognition by a Family of Leucine Zipper Proteins". *Science (New York, N.Y.)* 246, č. 4932 (17. listopad 1989): 911–16.
- Wang, Huating, Ramiro Garzon, Hao Sun, Katherine J. Ladner, Ravi Singh, Jason Dahlman, Alfred Cheng, et al. „NF-KappaB-YY1-MiR-29 Regulatory Circuitry in Skeletal Myogenesis and Rhabdomyosarcoma". *Cancer Cell* 14, č. 5 (4. listopad 2008): 369–81. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.10.006>.
- Weintraub, Abraham S., Charles H. Li, Alicia V. Zamudio, Alla A. Sigova, Nancy M. Hannett, Daniel S. Day, Brian J. Abraham, et al. „YY1 Is a Structural Regulator of Enhancer-Promoter Loops". *Cell* 171, č. 7 (14. prosinec 2017): 1573-1588.e28. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.008>.
- Wieschaus, E., C. Nusslein-Volhard, a H. Kluding. „Krüppel, a Gene Whose Activity Is Required Early in the Zygotic Genome for Normal Embryonic Segmentation". *Developmental Biology* 104, č. 1 (červenec 1984): 172–86.
- Wilkinson, Frank H., Kyoungsook Park, a Michael L. Atchison. „Polycomb Recruitment to DNA in Vivo by the YY1 REPO Domain". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, č. 51 (19. prosinec 2006): 19296–301. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603564103>.
- Wolf, Beni B., a Douglas R. Green. „Suicidal Tendencies: Apoptotic Cell Death by Caspase Family Proteinases". *Journal of Biological Chemistry* 274, č. 29 (16. červenec 1999): 20049–52. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.29.20049>.

- Wolfe, S. A., L. Nekludova, a C. O. Pabo. „DNA Recognition by Cys2His2 Zinc Finger Proteins". *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 29 (2000): 183–212. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.29.1.183>.
- Wu, Xiu-Yun, a Tian Li. „A Casein Kinase II Phosphorylation Site in AtYY1 Affects Its Activity, Stability, and Function in the ABA Response". *Frontiers in Plant Science* 8 (13. březen 2017). <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00323>.
- Wu, Xueping, Yongsheng Cheng, Tian Li, Zhao Wang, a Jin-Yuan Liu. „In Vitro Identification of DNA-Binding Motif for the New Zinc Finger Protein AtYY1". *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica* 44, č. 6 (červen 2012): 483–89. <https://doi.org/10.1093/abbs/gms020>.
- Wunderlich, Zeba, a Leonid A. Mirny. „Different Gene Regulation Strategies Revealed by Analysis of Binding Motifs". *Trends in Genetics: TIG* 25, č. 10 (říjen 2009): 434–40. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2009.08.003>.
- Yang, W. M., C. Inouye, Y. Zeng, D. Bearss, a E. Seto. „Transcriptional Repression by YY1 Is Mediated by Interaction with a Mammalian Homolog of the Yeast Global Regulator RPD3". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, č. 23 (12. listopad 1996): 12845–50.
- Yant, S. R., W. Zhu, D. Millinoff, J. L. Slightom, M. Goodman, a D. L. Gumucio. „High Affinity YY1 Binding Motifs: Identification of Two Core Types (ACAT and CCAT) and Distribution of Potential Binding Sites within the Human Beta Globin Cluster". *Nucleic Acids Research* 23, č. 21 (11. listopad 1995): 4353–62.
- Yesudhas, Dhanusha, Maria Batool, Muhammad Ayaz Anwar, Suresh Panneerselvam, a Sangdun Choi. „Proteins Recognizing DNA: Structural Uniqueness and Versatility of DNA-Binding Domains in Stem Cell Transcription Factors". *Genes* 8, č. 8 (1. srpen 2017): 192. <https://doi.org/10.3390/genes8080192>.
- Zhang, Qiang, Daniel B. Stovall, Kazushi Inoue, a Guangchao Sui. „The Oncogenic Role of Yin Yang 1". *Critical Reviews in Oncogenesis* 16, č. 3–4 (2011): 163–97.
- Zhang, Wei, Chao Xu, Chuanbing Bian, Wolfram Tempel, Lissete Crombet, Farrell MacKenzie, Jinrong Min, Zhonglai Liu, a Chao Qi. „Crystal Structure of the Cys2His2-Type Zinc Finger Domain of Human DPF2". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 413, č. 1 (16. září 2011): 58–61. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.08.043>.
- Zhou, Q., R. W. Gedrich, a D. A. Engel. „Transcriptional Repression of the C-Fos Gene by YY1 Is Mediated by a Direct Interaction with ATF/CREB". *Journal of Virology* 69, č. 7 (červenec 1995): 4323–30.
- Zhu, Weidong, Samuel Y. Olson, a Hermes J. Garbán. „Transcription Regulator Yin-Yang 1: From Silence to Cancer". *Critical reviews in oncogenesis* 16, č. 3–4 (2011): 227–38.
- Zlatanova, Jordanka, a Paola Caiafa. „CTCF and Its Protein Partners: Divide and Rule?" *Journal of Cell Science* 122, č. Pt 9 (1. květen 2009): 1275–84. <https://doi.org/10.1242/jcs.039990>.

9 PŘÍLOHY

Příloha 1: Genomické sekvence transkripčních variant AtYY1 (kódující sekvence jsou vyznačeny červenou barvou).

AT4G06634.1 AtYY1-1

Exony: 6, kódující exony: 6, délka transkriptu: 1654 bp, délka proteinu: 387 aa.

AT4G06634.2 AtYY1-2

Exony: 5, kódující exony: 4, délka transkriptu: 1731 bp, délka proteinu: 349 aa.

AT4G06634.3 AtYY1-3

Exony: 6, kódující exony: 6, délka transkriptu: 1367 bp, délka proteinu: 380 aa.

>AT4G06634.1 AtYY1-1 genomická DNA

```
AACCGGGACTCCATTATCAAAGTATTGCTTAAGGTCCTCTCTCTATCGTTCTTTCCCCAGAACCTAATCTCCCC
CAAATCCTGATTCAATCGTACTCAAACCTCACAAAGGAACCACCTTTACCCAAATAAATCAATGGATCATCAAATTA
TCAATACCAAATCCTTTTCGAGAGACGACCCATCCTTAAATCCAAAGCTCCTGCTGTGAAGTGGATCAAAGAATGGTA
CTTTTCTGATTCCATCATTATACGTCTTTTAGATTACAGATTCTTAAAGTTTTCTCCTTTGTTTTAGGGTACCACAA
GATATTGTTGCTACAGGTGGAAGGTGTCATCTACACAAATGGGTACAGGTGAAATGTGATGTTTTAATCTAATTTT
CATGTTTGTGAATGTTAAATTGTATCATTGTGTTGTTGTTATTACCAGAGGATACTTTTAGCAGACTTAAAGAAAAAG
AGAAAGAGCCTGATGTTCTGAGCCTGAACCTGAACCAACTACAGAGATTTTGTCTCTGTAGTTATGATGGTTGCG
GGAAGACTTTCTTTGATGTTAGTGCATTGAGGAAACATTCTCATATCCATGGAGAAAGACAATATGTTTGTGATCAGG
AAGGATGTGGAAGGTTTAAATAATATCCTCTCTTTGGTTTGGCTTACACACTCACTTTCATGATATATTGAAGCCATC
TTGTTTTTGTTTTTTGTAAACAGAAATTTCTGGATAGTTCAAAGTTGAAGAGACATTATCTTATTCATACTGGAGAGAG
AAATATATATGTACTTATGAAGGATGTGGAAGGTGATTGATTTTGATCACTCTCACTAGCTTAGTTTATTTGGTGT
ATAATTAGGCAATTAGGCAAAGGATTGTGTTGCGTGTTTTAGTAACTTTCTGTAGTTGTGGATGCAGGCATTCTCGT
TGGATTTTAACTTAGGTCTCACATGAAGACTCATTACAAGAGAATTATCATATATGTCCTTACAGTGGGTGTGTGA
AGAGATATGCTCATGAATACAAGCTAAAGAACCACGTTGCTGCCTACCATGAAAAGGTATCATTACTCATTGATTAC
TCATTTCGATAGAGTGTGCATGAAAATATGTTTTTTTTCTTGTGCTAAGACAGAGCAGCTCCTTAGTCAGAGTCTAGCTC
CACGTTGCTTTTGTGACTTCACCTTGTGTGGTTAGTTTTTACGCTTGGGTGTAGTTTTTCGTAGCTAGAAGTAGGCGT
AAATACTATCGTTGAGGTTTTAGTAATCTCATTTCGATGCTAACTTTCTTTCTGGAGTAGAGAAGTCTAATTGATTTAA
AGTCGCATTTTCTACTACCTTCTACTGTATCTACACTGTATTAGTAGGTTGAAAGTTGTAGATGACGCATAGACAGA
ACTTTGCATCGGTTCTATCATGTTTACACCCTTATATTATCCATATTTGTAAGAATCTTAGAACTTATCTCTCTCAAT
TTCACAACCTGTTTAAACAGAAATGGTGGTGGAGAGACTCCAAATATACACCACCAGCAGAGAAAGTATTAAGGACTGT
CAAAACACCTGCAACAGTTTGTGGCCGTCTTCGGATCGGCCATACGCATGCCCTTACGAAGGGTGTGAGAAAGCTTA
CATACATGAGTACAAGCTTAAGCTCCACTTGAAGAGAGAACATCCAGGGCATTTACAAGAAGAGAACGCGGATACCCC
CACACTGAACAAGCACAATGGCAATGACAGGAATGAGATAGATGACGGGAGTGACCAAGATGTTTACAGGAAACACGC
TAGTAATGGGAAAGGCCAGACACATAAACAACAGAGCAGAGCTAAGCCAAACATGAGGACACCACCAGCCAAAGTTGG
AAAGAAAGGTTCTACCTCTTCGCTGCCAAAGCAAGGATTGCAAAAAACCATGGCAAGCAAAGAAACTTTTGAAGA
AGTAGAAAGAGAAGAAGAAGATAGCGAGGAGACAGAGGAAGATAGAGATAATGTGGAGGATGGCTGGAGGTTTGG
CGAAAACAACGAGGATGATGACGACGATGAAGAGACCGAGTATGAAGATTAGTTTGTGACTTCGTTCTAAGCCATAGGAG
ACCTTTTTTGGTTACGTCCCTTCTTTATGCGAAGGTGGCTTTTTAGTAGCTTTGTTTCTTACTCTTCTTTTTCG
TTTGCCTTGACACTCTTCTTCAATTTAAAGCTTTGTACAGTATCCGTTAACATTTTTGAAAACCTTTTCTTTTAGTTT
TGGTCAACTTTTTGA
```

2277 bp

>AT4G06634.2 AtYY1-2 genomická DNA

TCAAAGTATTGCTTAAGGTCTCTCTCTCTATCGTTCTTTTCCCAGAACCCTAATCTCCCCAAATCCTGATTCAAT
CGTACTCAAACCTCACAAAGGAACCACCTTTACCCAAATAAATCAATGGATCATCAAATTTATCAATACCAAATCCT
TTCGAGAGACGCCATCCTTAAATCCAAAGCTCCTGCTGTGAAGTGGATCAAAGAATGGGTACCACAAGATATTGTT
GCTACAGGTGAAAGTGTCTATCTACACAAATGGGTACAGGTGAAATTGTGATGTTTTAATCTAATTTTCATGTTTTG
GAATGTTAAATTTGTATCATTGTGTGTTGTTATTACCAGAGGATACTTTTAGCAGACTTAAAGAAAAAGAAAGAGC
CTGATGTTCCCTGAGCCTGAACCTGAACCAACTACAGAGATTTTGTCTCTGTAGTTATGATGGTTGCGGGAAGACTT
TCTTTGATGTTAGTGCATTGAGGAAACATTCTCATATCCATGGAGAAAAGACAATATGTTTGTGATCAGGAAGGATGTG
GAAAGAAATTTCTGGATAGTTCAAAGTTGAAGAGACATTATCTTATTCATACTGGAGAGAGAAATTATATATGTACTT
ATGAAGGATGTGGAAAGGCATTCTCGTTGGATTTTAACTTAGGTCTCACATGAAGACTCATTACAAAGAGAATTATC
ATATATGCTCCTTACAGTGGGTGTGTGAAGAGATATGCTCATGAATACAAGCTAAAGAACCACGTTGCTGCCTACCATG
AAAAGAATGGTGGTGGAGAGACTCCCAAATATACACCACCAGCAGAGAAAAGTATTAAGGACTGTCAAAACACCTGCAA
CAGTTTGTGGCCCGTCTTCGGATCGGCCATACGCATGCCCTTACGAAGGGTGTGAGAAAAGCTTACATACATGAGTACA
AGCTTAAGCTCCACTTGAAGAGAGAACATCCAGGGCATTACAAGAAGAGAACCGGATACCCCACTGAACAAGC
ACAATGGCAATGACAGGAATGAGATAGATGACGGGAGTGACCAAGATGTTTACAGGAAACACGCTAGTAATGGGAAAG
GCCAGACACATAAAACAACAGAGCAGAGCTAAGCCAAACATGAGGACACCACCAGCCAAAGTTGAAAGAAAGGTTCTA
CCTCTTCGCTGCCAAAGCAAGGATTGCAAAAAACCATGGCAAGCAAAGAACTTTTGAAGAAGTAGAAAGAGAAG
AAGAAGAAGATAGCGAGGAGACAGAGGAAGATAGAGATAATGTGGAGGATGGCTGGAGGTTTGGCGAAAACAACGAGG
ATGATGACGACGATGAAGAGACCGAGTATGAAGATTAGTTTGTGCTCGTCTAAGCCATAGGAGACCTTTTTGGTTAC
GTCCCTTCTCTTTATGCGAAGGTGGCTTTTTAGTAGCTTTGTTTCTTGACTCTTCTCTTTTTCGTTTGCCTTGACACT
CTTCTTCATTTAAAGCTTTGTACAGTATTCCGTTAACATTTTTGAAAACCTTTTCTTTTAGTTTTGGTCAACTTTTTG
AAAGATTTTTTTTT

1574 bp

>AT4G06634.3 AtYY1-3 genomická DNA

AACCGGGACTCCATTATCAAAGTATTGCTTAAGGTCTCTCTCTCTATCGTTCTTTTCCCAGAACCCTAATCTCCCC
CAAATCCTGATTCAATCGTACTCAAACCTCACAAAGGAACCACCTTTACCCAAATAAATCAATGGATCATCAAATTTA
TCAATACCAAATCCTTTTCGAGAGACGCCATCCTTAAATCCAAAGCTCCTGCTGTGAAGTGGATCAAAGAATGGTA
CTTTTCTGATTCCATCACTTATACGTCTTTTAGATACAGATTTAAAAGTTTTCTCCTTTGTTTTAGGGTACCACAA
GATATTGTTGCTACAGGTGAAAGTGTCTATCTACCAAATGGGTACAGGTGAAATGTGATGTTTTAATCTAATTTT
CATGTTTGTGAATGTTAAATTTGTATCATTGTGTGTTGTTATTACCAGAGGATACTTTTAGCAGACTTAAAGAAAAAG
AGAAAGAGCCTGATGTTCCCTGAGCCTGAACCTGAACCAACTACAGAGATTTGTTTCTCTGTAGTTATGATGGTTGCG
GGAAGACTTTCTTTGATGTTAGTGCATTGAGGAAACATTCTCATATCCATGGAGAAAAGACAATATGTTTGTGATCAGG
AAGGATGTGAAAGGTTTAAATAATATCCTCTCTTTGGTTTGGCTTACACACTCACTTTCATGATATATTGAAGCCATC
TTGTTTTTGTTTTTTGTAAACAGAAATTTCTGGATAGTTCAAAGTTGAAGAGACATTATCTTATTCATACTGGAGAGAG
AAATATATATGTACTTATGAAGGATGTGAAAGGTGATTGATTTTGTATCACTCTCACTAGCTTAGTTTATTTGGTGT
ATAATTAGGCAATTAGGCAAAGGGATTGTGTTGCGTGTTTTAGTAACTTTCTGTAGTTGTGGATGCAGGCATTCTCGT
TGGATTTTAACTTAGGTCTCACATGAAGACTCATTACAAAGAGAATTATCATATATGCTCCTTACAGTGGGTGTGTGA
AGAGATATGCTCATGAATACAAGCTAAAGAACCACGTTGCTGCCTACCATGAAAAGGTATCATTACTCATTGATTAC
TCATTTCGATAGAGTGTATGAAAATATGTTTTTTTCTTGTGCTAAGACAGAGCAGCTCCTTAGTCAGAGTCTAGCTC
CACGTTGCTTTTGTGACTTCACCTTGTGTGTTAGTTTTTACGCTTGGGTGTAGTTTTTTCGTAGCTAGAAGTAGGCGT
AAATACTATCGTTGAGGTTTTAGTAATCTCATTTCGATGCTAACTTTCTTTCTGGAGTAGAGAAGTCTAATTGATTTAA
AGTCGATTTTCTACTACCTTCTACTGTATCTACACTGTATTAGTAGGTTGAAAGTTGTAGATGACGCATAGACAGA
ACTTTGCATCGGTTCTATCATGTTTACACCTTATATTATCCATATTTGTAAGAATCTTAGAACCTTATCTCTCTCAAT
TTCACAACCTGTTTAAACAGAAATGGTGGTGGAGAGACTCCCAAATATACACCACCAGCAGAGAAAAGTATTAAGGACTGT
CAAAACACCTGCAACAGTTTGTGGCCCGTCTTCGGATCGGCCATACGCATGCCCTTACGAAGGGTGTGAGAAAGCTTA
CATACATGAGTACAAGCTTAAGCTCCACTTGAAGAGAGAACATCCAGGGCATTTACAAGAAGAGAACGCGGATACCCC
CACACTGAACAAGCACAATGGCAATGACAGGAATGAGATAGATGACGGGAGTGACCAAGATGTTTACAGGAAACACGC
TAGTAATGGGAAAGGCCAGACACATAAAACAACAGAGCAGAGCTAAGCCAAACATGAGGACACCACCAGCCAAAGTTGG
AAAGAAAGGTTTACCTCTTCGCTGCCAAAGCAAGGATTGCAAAAAACCATGGCAAGCAAAGAACTTTTGAAGA
AGTAGAAAGAGAAGAAGAAGATAGCGAGGAGACAGAGGAAGATAGAGATAATGTGGAGGATGGCTGGAGGTTTTGG
CGAAAACAACGAGGATGATGACGACGATGAAGAGACCGAGTATGAAGATTAGTTTTGAGCTTCGTCTAAGCCATAGGAG
ACCTTTTTGGTTACGTCCCTTCTCTTTATGCGAAGGTGGCTTTTTAGTAGCTTTGTTTT

2165 bp

Příloha 2: Multiple sequence alignment pro genomické sekvence transkripčních variant AtYY1 (zpracováno v programu Clustal Omega).

```
AtYY1-2 -----TCAAAGTATTGCTTAAGGTCTCTCTTCTCTATCGTTCCTTTTCCC
AtYY1-1 AACCGGGACTCCATTATCAAAGTATTGCTTAAGGTCTCTCTTCTCTATCGTTCCTTTTCCC
AtYY1-3 AACCGGGACTCCATTATCAAAGTATTGCTTAAGGTCTCTCTTCTCTATCGTTCCTTTTCCC
*****

AtYY1-2 CAGAACCCTAATCTCCCCAAATCCTGATTCAATCGTACTCAAACCTCACAAAGGAACCA
AtYY1-1 CAGAACCCTAATCTCCCCAAATCCTGATTCAATCGTACTCAAACCTCACAAAGGAACCA
AtYY1-3 CAGAACCCTAATCTCCCCAAATCCTGATTCAATCGTACTCAAACCTCACAAAGGAACCA
*****

AtYY1-2 CCTTTACCCAAATAAATCAATGGATCATCAAAATTATCAATACCAAATCCTTTCGAGAG
AtYY1-1 CCTTTACCCAAATAAATCAATGGATCATCAAAATTATCAATACCAAATCCTTTCGAGAG
AtYY1-3 CCTTTACCCAAATAAATCAATGGATCATCAAAATTATCAATACCAAATCCTTTCGAGAG
*****

AtYY1-2 ACGACCCATCCTTAAATCCAAAGCTCCTGCTGTGAAGTGGATCAAAGAATG-----
AtYY1-1 ACGACCCATCCTTAAATCCAAAGCTCCTGCTGTGAAGTGGATCAAAGAATGGTACTTTTC
AtYY1-3 ACGACCCATCCTTAAATCCAAAGCTCCTGCTGTGAAGTGGATCAAAGAATGGTACTTTTC
*****

AtYY1-2 -----
AtYY1-1 TGATTCCATCACTTATACGCTTTTAGATTACAGATTCTTAAAAGTTTCTCCTTTGTTTT
AtYY1-3 TGATTCCATCACTTATACGCTTTTAGATTACAGATTCTTAAAAGTTTCTCCTTTGTTTT

AtYY1-2 --GGTACCACAAGATATTGTTGCTACAGGTGAAAGTGTCTACACAAATGGGTCACA
AtYY1-1 AGGGTACCACAAGATATTGTTGCTACAGGTGAAAGTGTCTACACAAATGGGTCACA
AtYY1-3 AGGGTACCACAAGATATTGTTGCTACAGGTGAAAGTGTCTACACAAATGGGTCACA
*****
AtYY1-2 GGTGAAATTGTGATGTTTTAATCTAATTTTCATGTTTGTGAATGTTAAATTGTATCATTG
AtYY1-1 GGTGAAATTGTGATGTTTTAATCTAATTTTCATGTTTGTGAATGTTAAATTGTATCATTG
AtYY1-3 GGTGAAATTGTGATGTTTTAATCTAATTTTCATGTTTGTGAATGTTAAATTGTATCATTG
*****

AtYY1-2 TGTGTTGTTTATTACCAGAGGATACTTTTAGCAGACTTAAAGAAAAAGAGAAAGAGCCTG
AtYY1-1 TGTGTTGTTTATTACCAGAGGATACTTTTAGCAGACTTAAAGAAAAAGAGAAAGAGCCTG
AtYY1-3 TGTGTTGTTTATTACCAGAGGATACTTTTAGCAGACTTAAAGAAAAAGAGAAAGAGCCTG
*****

AtYY1-2 ATGTTCCCTGAGCCTGAACCTGAACCAACTACAGAGATTTTGTCTCTGTAGTTATGATG
AtYY1-1 ATGTTCCCTGAGCCTGAACCTGAACCAACTACAGAGATTTTGTCTCTGTAGTTATGATG
AtYY1-3 ATGTTCCCTGAGCCTGAACCTGAACCAACTACAGAGATTTTGTCTCTGTAGTTATGATG
*****

AtYY1-2 GTTGCGGGAAGACTTTCTTTGATGTTAGTGCATTGAGGAAACATTCTCATATCCATGGAG
AtYY1-1 GTTGCGGGAAGACTTTCTTTGATGTTAGTGCATTGAGGAAACATTCTCATATCCATGGAG
AtYY1-3 GTTGCGGGAAGACTTTCTTTGATGTTAGTGCATTGAGGAAACATTCTCATATCCATGGAG
*****

AtYY1-2 AAAGACAATATGTTTGTGATCAGGAAGGATGTGAAAGAA-----
AtYY1-1 AAAGACAATATGTTTGTGATCAGGAAGGATGTGAAAGGTTTAAATAATATCCTCTCTTTG
AtYY1-3 AAAGACAATATGTTTGTGATCAGGAAGGATGTGAAAGGTTTAAATAATATCCTCTCTTTG
*****

AtYY1-2 -----
AtYY1-1 GTTTGGCTTACACACTCACTTTCATGATATATGAAGCCATCTTGTTTTTGTTTTTTGTGA
AtYY1-3 GTTTGGCTTACACACTCACTTTCATGATATATGAAGCCATCTTGTTTTTGTTTTTTGTGA

AtYY1-2 -----ATTTCTGGATAGTTCAAAGTTGAAGAGACATTATCTTATTCACTGGAGAGAG
AtYY1-1 ACAGAAATTTCTGGATAGTTCAAAGTTGAAGAGACATTATCTTATTCACTGGAGAGAG
AtYY1-3 ACAGAAATTTCTGGATAGTTCAAAGTTGAAGAGACATTATCTTATTCACTGGAGAGAG
*****
```

AtYY1-2 AAATTATATATGTACTTATGAAGGATGTGGAA-----
AtYY1-1 AAATTATATATGTACTTATGAAGGATGTGGAAAGGTGATTGATTTTGATCACTCTCACTA
AtYY1-3 AAATTATATATGTACTTATGAAGGATGTGGAAAGGTGATTGATTTTGATCACTCTCACTA

AtYY1-2 -----
AtYY1-1 GCTTAGTTTATTTGGTGTATAATTAGGCAATTAGGCAAAGGGATTGTGTTGCGTGTTTTA
AtYY1-3 GCTTAGTTTATTTGGTGTATAATTAGGCAATTAGGCAAAGGGATTGTGTTGCGTGTTTTA

AtYY1-2 -----AGGCATTCTCGTTGGATTTTAACCTTAGGTCTCACA
AtYY1-1 GTAACCTTCTGTAGTTGTGGATGCAGGCATTCTCGTTGGATTTTAACCTTAGGTCTCACA
AtYY1-3 GTAACCTTCTGTAGTTGTGGATGCAGGCATTCTCGTTGGATTTTAACCTTAGGTCTCACA

AtYY1-2 TGAAGACTCATTACACAAGAGAATTATCATATATGTCCTTACAGTGGGTGTGTGAAGAGAT
AtYY1-1 TGAAGACTCATTACACAAGAGAATTATCATATATGTCCTTACAGTGGGTGTGTGAAGAGAT
AtYY1-3 TGAAGACTCATTACACAAGAGAATTATCATATATGTCCTTACAGTGGGTGTGTGAAGAGAT

AtYY1-2 ATGCTCATGAATACAAGCTAAAGAACCACGTTGCTGCCTACC-----
AtYY1-1 ATGCTCATGAATACAAGCTAAAGAACCACGTTGCTGCCTACCATGAAAAGGTATCATTAC
AtYY1-3 ATGCTCATGAATACAAGCTAAAGAACCACGTTGCTGCCTACCATGAAAAGGTATCATTAC

AtYY1-2 -----
AtYY1-1 TCATTTGATTACTCATTCGATAGAGTGTGATGAAAATATGTTTTTTTCTTGTGCTAAGA
AtYY1-3 TCATTTGATTACTCATTCGATAGAGTGTGATGAAAATATGTTTTTTTCTTGTGCTAAGA

AtYY1-2 -----
AtYY1-1 CAGAGCAGCTCCTTAGTCAGAGTCTAGCTCCACGTTGCTTTTGTGACTTCACTTTGTGTG
AtYY1-3 CAGAGCAGCTCCTTAGTCAGAGTCTAGCTCCACGTTGCTTTTGTGACTTCACTTTGTGTG

AtYY1-2 -----
AtYY1-1 GTTAGTTTTTACGCTTGGGTGTAGTTTTTTCGTAGCTAGAAGTAGGCGTAAATACTATCGT
AtYY1-3 GTTAGTTTTTACGCTTGGGTGTAGTTTTTTCGTAGCTAGAAGTAGGCGTAAATACTATCGT

AtYY1-2 -----
AtYY1-1 TGAGGTTTTAGTAATCTCATTCGATGCTAACTTTCTTTCTGGAGTAGAGAAGTCTAATTG
AtYY1-3 TGAGGTTTTAGTAATCTCATTCGATGCTAACTTTCTTTCTGGAGTAGAGAAGTCTAATTG

AtYY1-2 -----
AtYY1-1 ATTAAAAGTCGCATTTTCTACTACCTTCTTACTGTATCTACACTGTATTAGTAGGTTGAA
AtYY1-3 ATTAAAAGTCGCATTTTCTACTACCTTCTTACTGTATCTACACTGTATTAGTAGGTTGAA

AtYY1-2 -----
AtYY1-1 AGTTGTAGATGACGCATAGACAGAACTTTGCATCGGTTCTATCATGTTTACACCTTATA
AtYY1-3 AGTTGTAGATGACGCATAGACAGAACTTTGCATCGGTTCTATCATGTTTACACCTTATA

AtYY1-2 -----ATGAAAA
AtYY1-1 TTATCCATATTTGTAAGAATCTTAGAACTTATCTCTCAATTTCACTTGTTTAACA
AtYY1-3 TTATCCATATTTGTAAGAATCTTAGAACTTATCTCTCAATTTCACTTGTTTAACA
* * *

AtYY1-2 GAATGGTGGTGGAGAGACTCCCAAATATACACCACCAGCAGAGAAAAGTATTAAGGACTGT
AtYY1-1 GAATGGTGGTGGAGAGACTCCCAAATATACACCACCAGCAGAGAAAAGTATTAAGGACTGT
AtYY1-3 GAATGGTGGTGGAGAGACTCCCAAATATACACCACCAGCAGAGAAAAGTATTAAGGACTGT

AtYY1-2 CAAAACACCTGCAACAGTTTGTGGCCCGTCTTCGGATCGGCCATACGCATGCCCTTACGA
AtYY1-1 CAAAACACCTGCAACAGTTTGTGGCCCGTCTTCGGATCGGCCATACGCATGCCCTTACGA
AtYY1-3 CAAAACACCTGCAACAGTTTGTGGCCCGTCTTCGGATCGGCCATACGCATGCCCTTACGA

AtYY1-2 AGGGTGTGAGAAAGCTTACATACATGAGTACAAGCTTAAGCTCCACTTGAAGAGAGAACA
AtYY1-1 AGGGTGTGAGAAAGCTTACATACATGAGTACAAGCTTAAGCTCCACTTGAAGAGAGAACA
AtYY1-3 AGGGTGTGAGAAAGCTTACATACATGAGTACAAGCTTAAGCTCCACTTGAAGAGAGAACA

AtYY1-2 TCCAGGGCATTACAAGAAGAGAACGCGGATACCCCCACACTGAACAAGCACAATGGCAA
AtYY1-1 TCCAGGGCATTACAAGAAGAGAACGCGGATACCCCCACACTGAACAAGCACAATGGCAA
AtYY1-3 TCCAGGGCATTACAAGAAGAGAACGCGGATACCCCCACACTGAACAAGCACAATGGCAA

AtYY1-2 TGACAGGAATGAGATAGATGACGGGAGTGACCAAGATGTTTACAGGAAACACGCTAGTAA
AtYY1-1 TGACAGGAATGAGATAGATGACGGGAGTGACCAAGATGTTTACAGGAAACACGCTAGTAA
AtYY1-3 TGACAGGAATGAGATAGATGACGGGAGTGACCAAGATGTTTACAGGAAACACGCTAGTAA

AtYY1-2 TGGGAAAGGCCAGACACATAAACAACAGAGCAGAGCTAAGCCAAACATGAGGACACCACC
AtYY1-1 TGGGAAAGGCCAGACACATAAACAACAGAGCAGAGCTAAGCCAAACATGAGGACACCACC
AtYY1-3 TGGGAAAGGCCAGACACATAAACAACAGAGCAGAGCTAAGCCAAACATGAGGACACCACC

AtYY1-2 AGCCAAAGTTGAAAGAAAGGTTCTACCTCTTCGCCTGCCAAAGCAAGGATTGCAAAAAA
AtYY1-1 AGCCAAAGTTGAAAGAAAGGTTCTACCTCTTCGCCTGCCAAAGCAAGGATTGCAAAAAA
AtYY1-3 AGCCAAAGTTGAAAGAAAGGTTCTACCTCTTCGCCTGCCAAAGCAAGGATTGCAAAAAA

AtYY1-2 ACCATGGCAAGCAAAGAAACTTTTGAAGAAGTAGAAAGAGAAGAAGAAGATAGCGA
AtYY1-1 ACCATGGCAAGCAAAGAAACTTTTGAAGAAGTAGAAAGAGAAGAAGAAGATAGCGA
AtYY1-3 ACCATGGCAAGCAAAGAAACTTTTGAAGAAGTAGAAAGAGAAGAAGAAGATAGCGA

AtYY1-2 GGAGACAGAGGAAGATAGAGATAATGTGGAGGATGGCTGGAGGTTTGGCGAAAACAACGA
AtYY1-1 GGAGACAGAGGAAGATAGAGATAATGTGGAGGATGGCTGGAGGTTTGGCGAAAACAACGA
AtYY1-3 GGAGACAGAGGAAGATAGAGATAATGTGGAGGATGGCTGGAGGTTTGGCGAAAACAACGA

AtYY1-2 GGATGATGACGACGATGAAGAGACCGAGTATGAAGATTAGTTGAGCTTCGTCTAAGCCA
AtYY1-1 GGATGATGACGACGATGAAGAGACCGAGTATGAAGATTAGTTGAGCTTCGTCTAAGCCA
AtYY1-3 GGATGATGACGACGATGAAGAGACCGAGTATGAAGATTAGTTGAGCTTCGTCTAAGCCA

AtYY1-2 TAGGAGACCTTTTGGTTACGTCCCTTCTCTTTATGCGAAGGTGGCTTTTTAGTAGCTTT
AtYY1-1 TAGGAGACCTTTTGGTTACGTCCCTTCTCTTTATGCGAAGGTGGCTTTTTAGTAGCTTT
AtYY1-3 TAGGAGACCTTTTGGTTACGTCCCTTCTCTTTATGCGAAGGTGGCTTTTTAGTAGCTTT

AtYY1-2 GTTTCCTTGACTCTTCTTCTTTTCGTTTGCCCTTGACACTCTTCTTCATTTAAAGCTTTGTA
AtYY1-1 GTTTCCTTGACTCTTCTTCTTTTCGTTTGCCCTTGACACTCTTCTTCATTTAAAGCTTTGTA
AtYY1-3 GTTTC-----

AtYY1-2 CAGTATTCGTTAACATTTTGA AACCTTTTCTTTTAGTTTGGTCAACTTTTTGAAAG
AtYY1-1 CAGTATTCGTTAACATTTTGA AACCTTTTCTTTTAGTTTGGTCAACTTTTTGAAAG
AtYY1-3 -----

AtYY1-2 ATTTTTTTTT
AtYY1-1 -----
AtYY1-3 -----

Příloha 3: Primery bez *attB* míst pro transkripční varianty AtYY1.

Transkripční varianta	Primer (forward + reverse)
AtYY1-1	ATGGATCATCAAAATTATCAATACC + ATCTTCATACTCGGTCTCTTC
AtYY1-2	ATGTTAAATTGTATCATTGTGTTGTTG + ATCTTCATACTCGGTCTCTTC

Všechny sekvence jsou uvedeny ve směru 5'→3'.