

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Vlastnosti proteinu fosfolipáza D alfa 1 u rostliny

Arabidopsis thaliana

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Marie Josefíková
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Ing. Pavol Vadovič, Ph.D.
Rok:	2018

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne.....

.....
Marie Josefíková

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala především vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Pavlu Vadovičovi, Ph.D. za věnovaný čas v průběhu celé práce, ochotu, cenné rady a trpělivost během práce v laboratoři a při sepisování této práce. Díky patří také celému oddělení buněčné biologie a za možnost vypracování experimentální části na tomto oddělení. Na závěr bych chtěla poděkovat mé rodině a přátelům, kteří mi byli po celou dobu studia psychickou oporou.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Marie Josefíková
Název práce	Vlastnosti proteinu fosfolipáza D alfa 1 u rostliny <i>Arabidopsis thaliana</i>
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Ing. Pavol Vadovič, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2018

Abstrakt

Bakalářská práce je zaměřena na studium regulačních mechanismů u modelové rostliny *Arabidopsis thaliana*. V teoretické části jsou popsány enzymy fosfolipasy, především fosfolipasa D alfa 1 (PLD α -1), kaskády mitogen aktivovaných proteinkinasy a stabilní transformace u rostlin. Fosfolipasa D alfa 1 hydrolyzuje fosfatidylcholin, což vede ke tvorbě kyseliny fosfatidové a cholinu. PLD α -1 i kyselina fosfatidová hrají důležitou roli v mnoha buněčných procesech, zahrnujících jednak metabolické děje, působení fytohormonů nebo reakci na různé typy stresových podnětů. Podobně i kaskády mitogen aktivovaných proteinkinasy se uplatňují v klíčových procesech vývoje rostliny a fungují jako přenašeči vnějších i vnitřních stimulů. V této práci byla také zmíněna mitogen aktivovaná proteinkinasa 3 (MPK3), která je důležitou součástí MAP kaskády. V další části práce jsou shrnuty možnosti stabilní transformace rostlin.

Cílem experimentální části byla genotypizace jednoduchých *plda-1-1* mutantů a dvojitých mutantů *plda-1-1/mpk3-1* a ověření *plda-1-1/mpk3-1* dvojitých mutantů imunoblotovou analýzou. Cílem bylo také připravit transgenní rostliny *Arabidopsis thaliana* s mutovanou verzí proteinu fosfolipasy D alfa 1. Výsledky práce potvrdily úspěšné vyselektování rostlin s chybějícím PLD α -1 a MPK3 proteinem.

Klíčová slova	PLD α -1, MPK3, transformace, <i>Arabidopsis thaliana</i> , genotypizace, selekce
Počet stran	57
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname Marie Josefíková

Title Properties of the Phospholipase D alpha 1 enzyme in the *Arabidopsis thaliana*

Type of thesis Bachelor

Department Department of biochemistry

Supervisor Ing. Pavol Vadovič, Ph.D.

The year of presentation 2018

Abstract

Bachelor thesis is focused on the study of regulatory mechanisms presented in model plant *Arabidopsis thaliana*. The theoretical part describes phospholipases, especially phospholipase D alfa 1 (PLD α -1) and cascades of mitogen activated protein kinases. PLD α -1 hydrolyzes phosphatidylcholine, resulting in the formation of phosphatidic acid and choline. It plays an important role in many cellular processes, including developmental, cytoskeletal, signaling and stress related processes. MAPK cascades are crucial player in plant development processes and function as cell signal transducers. In this work, mitogen-activated protein kinase 3 (MPK3), which is part of the MAPK cascade, has been also studied. One of the section summarizes the possibilities of stable plant transformation.

The aim of the experimental part was to verify by genotyping simple *plda-1-1* and double *plda-1-1 / mpk3-1* mutant plants and confirm the absence of PLD α -1 and MPK3 proteins in *plda-1-1/mpk3-1* mutant plants by immunoblotting analysis. One of the ambition of the thesis was to prepare transgenic *plda-1-1* plants complemented with mutated PLD α -1 protein. The results of this work confirm the proper preparation of *plda-1-1/mpk3-1* mutant plants.

Keywords PLD α -1, MPK3, transformation, *Arabidopsis thaliana*, genotypization, selection

Number of pages 57

Language Czech

Obsah

1. ÚVOD.....	9
2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	11
2.1 <i>Arabidopsis thaliana</i>	11
2.2 Fosfolipasy	11
2.2.1 Fosfolipasy A	13
2.2.2 Fosfolipasa B	13
2.2.3 Fosfolipasa C	13
2.2.4 Fosfolipasa D	14
2.3 Transformace rostlin	18
2.3.1 Přímé metody vnášení transgenů	19
2.3.2 Nepřímé metody vnášení transgenů	20
2.4 MAP Kinasy rostlin	25
2.4.1 MAPK kaskáda	25
2.4.2 MAPK	26
2.4.3 MAPKK	27
2.4.4 MAPKKK	27
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	28
3.1 Materiál.....	28
3.1.1 Použité přístroje a software pro zpracování výsledků.....	28
3.1.2 Enzymy a chemikálie	28
3.1.3 Rostlinný materiál	28
3.2 Metody	29
3.2.1 Sterilizace a vysetí semen <i>Arabidopsis thaliana</i>	29
3.2.2 Příprava kultivačního MS média.....	29
3.2.3 Ověření přítomnosti T-DNA inzertu u rostlin mutálních v genu <i>plda-1-1</i>	29
3.2.4 PCR metoda	30
3.2.5 Elektroforéza v agarosovém gelu.....	31
3.2.6 Výsev semen <i>Arabidopsis thaliana</i>	32
3.2.7 Transformace pomocí metody floral dip.....	32
3.2.8 Příprava selekčních misek.....	33
3.2.9 Selektce T-DNA inzerčních mutantů	33
3.2.10 Ověření přítomnosti vneseného konstruktu S481A	33
3.2.11 Pozorování semen <i>Arabidopsis thaliana</i>	34

3.2.12	Selekce F3 generace dvojitéch mutantů <i>plda-1-1a mpk3-1</i>	34
3.2.13	Genotypová analýza <i>plda-1-1</i> a <i>mpk3-1</i> mutantů	34
3.2.14	Izolace proteinů.....	35
3.2.15	SDS-PAGE elektroforéza	36
3.2.16	Imunoblotová analýza	37
4.	VÝSLEDKY A DISKUZE	39
4.1	Ověření T-DNA inzertu v <i>plda-1-1</i> genu.....	39
4.2	Selekce a ověření transgenních T1 rostlin <i>Arabidopsis thaliana</i> s konstruktem <i>proPLDα1::PLDα1:YFP</i> s mutací S481A	41
4.3	Genotypizace rostlin dvojitéch mutantů v genech <i>plda-1-1/mpk3-1</i> v T2 generaci	44
4.4	Ověření nepřítomnosti PLDα-1 a MPK3 proteinů v mutantních rostlinách <i>plda-1-1/ mpk3-1</i> pomocí imunoblotové analýzy	47
5.	ZÁVĚR	51
6.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	52
7.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	56

CÍLE PRÁCE

TEORETICKÁ ČÁST

1. Zpracování literární rešerše na téma fosfolipasa D alfa 1 u *Arabidopsis thaliana*, její funkce a její role v buněčné signalizaci a role map kinásových signálních drah u *Arabidopsis thaliana* se zaměřením na map kinasu MPK3.
2. Zpracování literární rešerše na téma stabilní transformace rostliny *Arabidopsis thaliana* pomocí metody floral dip.

PRAKTICKÁ ČÁST

1. Napěstování rostlin *Arabidopsis thaliana* mutantní v genu *plda-1-1*, ověření T-DNA inzerce v *plda-1-1* genu pomocí genotypizace a selekce homozygotních mutantních rostlin.
2. Stabilní transformace vybraných *plda-1-1* mutantních rostlin pomocí metody floral dip s konstruktem kódujícím sekvenci genu *plda-1-1* s vnesenou mutací S481A pomocí *Agrobacterium tumefaciens*.
3. Selektce T1 generace komplementovaných rostlin pomocí rezistence k herbicidu BASTA a ověření přítomnosti vneseného konstruktů v T1 rostlinách pomocí PCR.
4. Selektce homozygotní linie dvojitého mutantů nesoucího mutaci v genech *plda-1-1* a *mpk3-1* v F2 generaci u *Arabidopsis thaliana* pomocí PCR.

1. ÚVOD

Rostliny jako sesilní organismy nejsou schopny uniknout měnícímu se životnímu prostředí (Colcombert a Hirt, 2008). Pro adaptaci si vyvinuly mechanismy, které jim umožňují přizpůsobit jejich růst, vývoj a celkovou fyziologii měnícím se vnějším podmínkám (Colcombert a Hirt, 2008). Tyto adaptace zahrnují rychlou a dynamickou regulaci enzymatických aktivit a modifikaci expresních genových programů. Jednou z nejběžnějších post-translačních modifikací u všech organismů je fosforylace cílových proteinů. Fosfolipasy jsou enzymy, které různým způsobem štěpí fosfolipidy za vzniku rozmanitých produktů mnohdy významných v buněčné signalizaci. Fosfolipasa D (PLD) hydrolyzuje fosfolipidy za vzniku kyseliny fosfatidové (PA) a cholinu a je zapojená v odpovědi na různé environmentální stresy (Yu *et al.*, 2010). Skupina fosfolipas D se ve vyšších rostlinách skládá z několika členů a každá z členů se projevuje rozdílnými vlastnostmi a rozdílnými požadavky na svou aktivitu (Li *et al.*, 2009). Molekulární a biochemické heterogenity rostlinných PLD hrají důležitou roli v časování, lokalizaci a množství produkované PA. PLD a PA ovlivňují mnohé buněčné procesy, jednak pomocí přímé vazby na cílový protein nebo nepřímo pomocí sprostředkujících partnerů (Li *et al.*, 2009).

Změny v environmentálním prostředí jsou v rostlinách zprostředkovány mitogen aktivovanými proteinkinasami (MAPK) (Colcombert a Hirt, 2008). Studie dokázaly, že MAPK nejsou zapojeny pouze v odpovědi na biotické a abiotické stimuly, ale hrají také důležitou roli v hormonálních a vývojových procesech. MAPK kaskády se skládají ze 3 kinas: MAP3K, MAP2K a MAPK, které se navzájem fosforylují. Signalizace prostřednictvím MAPK je organizována v komplexních propojených subcelulárních sítích (Šamajová *et al.*, 2013). Po aktivaci MAPK se signály přenášejí dál v buňce na cílové substráty v různých subcelulárních organelách. MAPK tak regulují různé buněčné procesy a zajišťují odpověď buňky na tyto vnější podněty (Šamajová *et al.*, 2013). Mitogen aktivovaná proteinkinasa 3 (MPK3) patří k nejlépe popsaným MAPK. Exprese genu *MPK3* je indukována environmentálním stresem (Mizoguchi *et al.*, 1996) a protein MPK3 je aktivován oxidativním stresem (Kovtun *et al.*, 2000).

Transformace rostlin je proces genetické manipulace, pomocí které jsou cizorodé geny vneseny do rostlinných buněk a stabilně integrovány do genomu rostlin (Zhang *et al.*, 2006). Pro oblast biologického a biotechnologického výzkumu je

významná bakterie *Agrobacterium tumefaciens*. Právě stabilní transformace *Arabidopsis thaliana* pomocí *A. tumefaciens* metodou floral dip byla využita v této bakalářské práci. Práce se také zaměřuje na získání základních dovedností v oblasti molekulární biologie a biochemie při zkoumání složek signálních drah u *Arabidopsis thaliana*, hlavně fosfolipasy D alfa 1 a map kinasy 3.

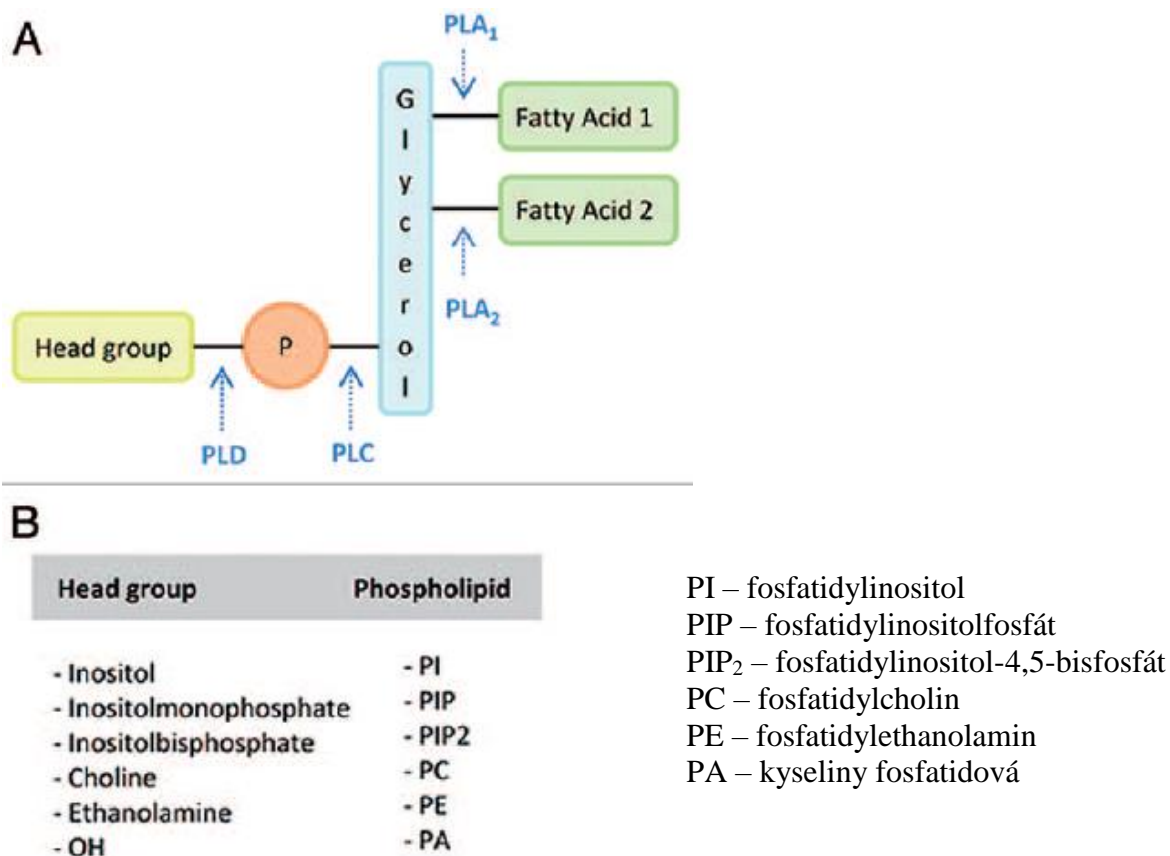
2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana (Huseníček rolní) je dvouděložná rostlina patřící do čeledi *Brassicaceae* (Brukvovité). Její rozšíření je kosmopolitní, lze ji nalézt v polohách od nížin až do hor a zejména na slunných stráních. Díky krátké generační době (lze získat i několik generací do roka), rychlému dozrání semen, nenáročnosti na prostor, velkému počtu potomků (z jedné rostliny lze získat až několik tisíc semen) a malé výšce se stala modelovou rostlinou, která se často využívá ve výzkumu. K pokusným experimentům byla poprvé využita Friedrichem Laibachem, který popsal správný počet chromozomů (Koornneef a Meinke, 2010). Jádru této rostliny obsahuje pouze 5 chromozomů. Genom obsahuje 25 498 genů, které kódují proteiny z 11 000 rodin (The Arabidopsis Initiative, 2000).

2.2 Fosfolipasy

Fosfolipasy jsou enzymy, které hydrolyzují fosfolipidy (mezi něž patří fosfatidylglycerol, fosfatidylcholin, fosfatidylethanolamin, fosfatidylinositol atd.) na mastné kyseliny a další substance (jako jsou cholin, inositol trifosfát). V přírodě jsou velmi rozšířené. Podle místa hydrolýzy a toho, jaký typ reakce katalyzují, jsou označeny jako fosfolipasy A, B, C a D (Obr. 1). Přestože všechny fosfolipasy využívají fosfolipidy jako substráty, liší se v místě a způsobu působení na substrát, fyziologických funkcích a v jejich regulaci (Ramrakhiani a Chand, 2011). Hrají klíčovou roli při přenosu vnějších i vnitřních podnětů v buňce, jsou důležité během mnohých buněčných činností, jako jsou proliferace, membránová integrita a buněčný transport. Komerční využití fosfolipas je v průmyslových odvětvích, jako je ropná rafinerie, výroba zdravých potravin, výroba kosmetiky a mohou být také použity jako diagnostické markery při mikrobiální infekci (Ramrakhiani a Chand, 2011).



Obr. 1 Schématické znázornění fosfolipidové struktury a místa štěpení fosfolipasami. (Canonne *et al.*, 2011).

A. Obecná struktura fosfolipidů se 2 mastnými acylovými řetězci vázanými na glycerolovou kostru.

B. Možné hlavní skupiny a výsledné fosfolipidy.

Obecné rozdělení fosfolipas

- Fosfolipasa A
 - Fosfolipasa A1 - štěpí acylový řetězec v SN-1 pozici.
 - Fosfolipasa A2 – štěpí acylový řetězec v SN-2 pozici za uvolnění kyseliny arachidonové.
- Fosfolipasa B – štěpí oba acylové řetězce SN-1 a SN-2. Tento enzym se nazývá lysofosfolipasa.
- Fosfolipasa C – štěpí řetězec před fosfátem za uvolnění diacylglycerolu a fosfátové skupiny navázané na inositol, ethanolamin.
- Fosfolipasa D – štěpí řetězec fosfolipidu po fosfátu za uvolnění kyseliny fosfatidové (PA) a zbytku (např. cholinu, inositolu, ethanolaminu atd.).

2.2.1 Fosfolipasy A

2.2.1.1 Fosfolipasa A1

Fosfolipasa A1 (PLA₁) je enzym, který hydrolyzuje fosfolipidy a produkuje lysofosfolipidy a mastné kyseliny (Richmond a Smith, 2011). PLA₁ specificky katalyzuje štěpení v pozici SN-1 fosfolipidů. Bylo prokázáno, že PLA₁ působí jako trávicí enzymy, mají centrální roli při udržování a recyklaci membrány nebo se uplatňují v regulaci buněčných mechanismů (Richmond a Smith, 2011).

2.2.1.2 Fosfolipasa A2

Fosfolipasa A2 (PLA₂) patří mezi enzymy, které uvolňují mastné kyseliny ze sekundární uhlíkové skupiny glycerolu. Specificky rozpoznává acylovou vazbu SN-2 fosfolipidů a štěpí vazbu za uvolnění kyseliny arachidonové a kyseliny lyzofosfatidové. Fosfolipasy A2 se v současné době skládají z 15 skupin a mnoha podskupin, nejvýznamnější jsou sekreční PLA₂ (sPLA₂) a cytosolická PLA₂ (cPLA₂) (Schaloske a Dennis, 2006).

2.2.2 Fosfolipasa B

Fosfolipasa B, známa jako lysofosfolipasa, je enzym s kombinací obou PLA₁ a PLA₂ aktivit. Mohou odštěpit acylový zbytek z uhlíku C1 i C2 fosfolipidu a z lysofosfolipidu. Mezi enzymatické aktivity fosfolipasy B (PLB) patří transacylasa, lipasa a acetylerasa (Saito, 2014). Hlavní charakteristiky PLB jsou velká molekulová hmotnost, nezávislost na vápenatých iontech a zmíněné enzymatické aktivity (Saito, 2014).

2.2.3 Fosfolipasa C

Fosfolipasa C (PLC) je enzym, který katalyzuje hydrolýzu membránového fosfolipidu fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu (PIP₂) a vytváří diacylglycerol a inositol-1,4,5-trifosfát (IP₃) do cytoplasmy (Cantley, 2013). Diacylglycerol (zůstává součástí membrány) a IP₃ (uvolňován do cytosolu) působí jako druhý posel a iniciuje další signální dráhy aktivací proteinkinasy C a zvyšuje intracelulární hladinu vápníku. Činnost PLC vyžaduje přítomnost vápníku (Canonne *et al*, 2011). V závislosti na koncentraci vápníku, je PLC

schopna využívat různé substráty. Při nízkých (mikromolárních) koncentracích Ca^{2+} jsou hydrolyzovány oba substráty fosfatidylinositol-4-fosfát (PI4P) a PIP_2 , zatímco při vyšších koncentracích (milimolárních) PLC raději využívá fosfatidylinositol (PI) (Canonne *et al.*, 2011).

2.2.4 Fosfolipasa D

2.2.4.1 Živočišné fosfolipasy

PLD živočišných buněk je kódována dvěma geny a existuje ve dvou formách: fosfolipasa D1 (PLD1) a fosfolipasa D2 (PLD2) (Kolesnikov *et al.*, 2012). PLD1 (120 kDa) je přítomna hlavně na endomembránách v buňce a vlivem extracelulárních podnětů je transportována k plazmatické membráně (Kolesnikov *et al.*, 2012). PLD2 (106 kDa) je lokalizována na plazmatické membráně, má nižší *in vivo* aktivitu než PLD1 a je mírně stimulována známými aktivátory PLD1 (Kolesnikov *et al.*, 2012). Oba enzymy jsou regulovány různými serin/threonin a tyrosin specifickými proteinkinasami, proteiny vázícími GTP, polyfosfoinositidy a hormony. Obě fosfolipasy, PLD1 a PLD2, vyžadují pro svou aktivitu kofaktor. Aktivita PLD1 je nízká a může být stimulována PIP_2 , fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfátem, protein kinasou C a GTP proteiny. Aktivita PLD2 je regulována fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátem a Ras-like GTPasou (RaI) a negativně regulována cytoskeletálními proteiny. Fosfolipasa D a produkt její katalytické reakce, kyselina fosfatidová, se podílejí na regulaci rozmanitého spektra buněčných procesů (kontrola intracelulárního membránového transportu, stimulace neuronů a srdce, migrace buněk a chemická odolnost).

2.2.4.2 Rostlinné fosfolipasy

V rostlinách je nejrozšířenějším fosfolipidem fosfatidylcholin (PC), který hraje roli při tvorbě zásobních lipidů a při metabolismu mastných kyselin (Hong *et al.*, 2016). PLD hydrolyzuje fosfodiesterovou vazbu na místě hlavní skupiny fosfolipidů, zejména PC, a tvoří rozpustný cholin a kyselinu fosfatidovou (PA) (Hong *et al.*, 2016). Aktivita PLD byla poprvé charakterizována v rostlinách (Hanahan a Chaikoff, 1947), přičemž byla zkoumána její role v membránovém katabolismu lipidů (Hong *et al.*, 2016).

2.2.4.3 Klasifikace a doménové struktury PLD

V *Arabidopsis thaliana* je 12 genů kódujících PLD, zatímco u savců jsou 2 geny a jeden gen je v kvasince *Saccharomyces cerevisiae* (Bargmann *et al.*, 2009). 12 genů *A. thaliana* je rozdělených do 6 tříd, které obsahují různý počet izoform: PLD α (3), β (2), γ (3), δ , ϵ a ζ (2) (Kolesnikov *et al.*, 2012). Izoformy α , β , γ , δ a ϵ jsou označeny jako C2-PLD díky přítomnosti katalytické C2 domény poblíž jejich N-konce (Eliáš *et al.*, 2002). Na rozdíl od uvedených PLD, dvě PLD ζ mají plekstrin homologní (PH) a phox homologní (PX) doménu (Eliáš *et al.*, 2002; Qin a Wang, 2002). C2 doména váže Ca^{2+} a fosfolipidy, které jsou nezbytné pro enzymovou aktivitu příslušných PLD (Hong *et al.*, 2016). C2 doména u C2-PLD obsahuje přibližně 130 aminokyselin (Wang *et al.*, 2006). Rozdíly v aminokyselinovém složení v C2 doméně PLD podmiňují rozdílné požadavky na množství Ca^{2+} potřebné k enzymové aktivitě PLD (Hong *et al.*, 2016). PLD ζ mají PX a PH domény blízko N-konce a svou strukturou se nejvíc podobají savčím PLD (Hong *et al.*, 2016). PX a PH domény mají různou vazebnou afinitu pro fosfoinositidy (Hong *et al.*, 2016). Všechny zkoumané eukaryotické PLD obsahují dvě katalytické HKD domény, které jsou nezbytné pro enzymovou aktivitu PLD. Mohou mezi sebou vzájemně interagovat a tím znásobovat svoji aktivitu (Qin a Wang, 2002). HKD motiv má vysoce konzervovanou HxKxxxD/E sekvenci (Hammond *et al.*, 1995; Koonin, 1996). Tyto dvě HKD domény jsou odděleny více než 300 aminokyselinami ve 12 PLD *Arabidopsis* (Qin a Wang, 2002). PLD α -1 má další tzv. DRY motiv mezi aminokyselinovými zbytky 562 a 586, který je podobný motivu v proteinech, které interagují s heterotrimerickou podjednotkou $G\alpha$ u G proteinu (Hong *et al.*, 2016). PLD α -1 tedy interaguje s $G\alpha$ podjednotkou a stimuluje její GTPasovou aktivitu (Zhao a Wang, 2004).

2.2.4.4 Katalytické vlastnosti a regulace aktivity PLD

Pro správnou funkci fosfolipasy D je vyžadována přítomnost Ca^{2+} , PIP_2 , oleátu, různých hodnot pH a různých druhů fosfolipidů jako substrátů (Hong *et al.*, 2016). Aktivita PLD byla charakterizována milimolární potřebou Ca^{2+} (Hong *et al.*, 2016). Když byl potlačen gen *pld α -1* primárně pro konvenční aktivitu PLD, byly objeveny i jiné PLD, které vyžadovaly jen mikromolární hladiny Ca^{2+} (Pappan *et al.*, 1997). Geny kódující PLD β 1, γ a ζ 1, byly identifikovány jako nezávislé na potřebě Ca^{2+} (Pappan *et al.*, 1997). Ca^{2+} se váže k C2 doméně a zlepšuje enzymatickou aktivitu PLD podporou lipidového substrátu

ke katalytickému místu (Zheng *et al.*, 2000; Qin *et al.*, 2002). PLD α -1, α 3 a ϵ jsou nejméně aktivní při milimolárních koncentracích vápenatých iontů, zatímco PLD β 1, γ 1, γ 2 a δ vyžadují mikromolární hodnoty Ca²⁺ ke své aktivitě (Hong *et al.*, 2016). Další klíčový kofaktor většiny PLD je PIP₂. Jeho vazbou se zvyšuje substrátová afinita enzymů PLD (Zheng *et al.*, 2002). PIP₂ je vyžadován pro aktivitu PLD β , γ a ζ (Hong *et al.*, 2016). PLD α a ϵ jsou aktivní i bez PIP₂ (Qin a Wang, 2002). Fosfolipasy typu C2-PLD využívají jako substráty PC, fosfatidylethanolamin (PE) a fosfatidylglycerol (PG). PLD α -1, α 3 a ϵ preferují PC před PE, PLD δ a γ 1 hydrolyzují PE více než PC (Hong *et al.*, 2016). Zatímco fosfolipasy PX/PH-PLD ζ 1 selektivně používají jako substrát PC (Qin a Wang, 2002). Transfosfatidylace je jedinečnou reakcí pro PLD, ve které PLD využívá primární alkohol (R-OH) místo vody (H-OH) k přijetí fosfatidylové skupiny (Hong *et al.*, 2016).

2.2.4.5 Subcelulární lokalizace a pletivová distribuce PLD

Subcelulární lokalizace se liší dle individuálních PLD (Li *et al.*, 2009; Fan *et al.*, 1999). PLD α -1 je nejrozšířenější PLD a je přítomna v rozpustných i v membránových frakcích (Hong *et al.*, 2016). Primárně se vyskytuje v cytosolu a po aplikaci stresového stimulu je schopna se relokovat na membrány (Novák *et al.*, 2018). PLD γ byla detekována na plazmatické membráně, intracelulárních membránách, jádře a v mitochondriích (Fan *et al.*, 1999). U *Arabidopsis* je výskyt PLD β 1 nízký, proto i její lokalizace je obtížná (Fan *et al.*, 1999). PLD ζ 2 se nachází na tonoplastu (Yamaryo *et al.*, 2008). PLD α 3, δ a ϵ jsou primárně asociovány s plazmatickou membránou (Hog *et al.*, 2009; Hong *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2012). Přesná subcelulární lokalizace ostatních PLD není zatím přesně známá (Hong *et al.*, 2016). Geny *pld* mají různé úrovně exprese v *Arabidopsis* (Hong *et al.*, 2016). PLD α -1 se nachází v orgánech jako květy, šesule, kmeny, listy a kořeny (Hong *et al.*, 2016). Exprese PLD α -1 je mnohem vyšší než PLD α 3 a ϵ (Hong *et al.*, 2009; Hong *et al.*, 2008). Jedinou výjimkou je pyl, ve kterém je exprese PLD α -1 nižší (Hong *et al.*, 2009). Exprese PLD α -1 se zvyšuje v odpovědi na vnější podnět (Hong *et al.*, 2016).

2.2.4.6 Buněčné a fyziologické funkce PLD

Aktivita PLD se rapidně zvyšuje v odpovědi na různé environmentální podněty (Hong *et al.*, 2016). Fosfolipasy D jsou zapojeny v rostlinném růstu, vývoji a odpovědi na abiotický či biotický stres (Hong *et al.*, 2016). Jedním z klíčových mechanismů PLD v rostlinách je produkce PA jako druhého posla (Wang *et al.*, 2006). Produkce PA fosfolipasou D byla pozorována při působení různých podmínek, jako ošetření kyselinou abscisovou (ABA) při působení abiotických stresů jako poranění, suchu a mrazu (Hong *et al.*, 2016). PLD interagují s různými proteiny, jako jsou inhibitory proteas, *Gα* podjednotka G proteinu, GAPC, aktin a tubulin (Hong *et al.*, 2016). Tyto interakce regulují aktivitu PLD a tvorbu PA a tedy buď přímo, nebo nepřímo ovlivňují zprostředkování buněčné odpovědi v různých biologických procesech. Některé izoformy PLD mohou přímo interagovat s mikrotubulami například PLD δ (Andreeva *et al.*, 2009; Ho *et al.*, 2009). Bylo prokázáno, že PA produkovaná PLD α -1, se váže na protein asociovaný s mikrotubulemi 65-1: MAP65-1 a tím stabilizuje kortikální mikrotubuly a zabezpečuje odolnost rostlin vůči solnému stresu (Zhang *et al.*, 2012). PA tvořená PLD α -1 proteinem se taky pomocí vazby na MPK6 protein podílí na odstranění Na⁺ iontů z buňky při působení solného stresu u *Arabidopsis thaliana* (Yu *et al.*, 2010).

2.2.4.7 Fosfolipasa D alfa 1

Tato práce se zabývá fosfolipasou D alfa 1 (PLD α -1). Kvůli jejímu širokému zastoupení a nadbytku v rostlinných tkáních je nejvíce studovaným předmětem zájmu v biochemických a funkčních studiích (Fan *et al.*, 1997). Fosfolipasa D α -1 je nejrozšířenější izoformou fosfolipas D u *A. thaliana*. K její aktivitě je potřebná milimolární koncentrace Ca²⁺ (Devaiah *et al.*, 2007). PLD α -1 je lokalizována v cytosolu a na intracelulárních membránách buněčných organel (Fan *et al.*, 1999; Novák *et al.*, 2018). PLD α -1 je přítomná v rozpustných i v membránových frakcích a její relativní rozdělení mezi oběma frakcemi se mění v závislosti na pletivech, vývojovém stádiu a vnějších faktorech (Dyer *et al.*, 1994). Aktivita PLD α je vyšší v metabolicky aktivnějších orgánech, jako jsou květy, šesule a kořeny a taky v sušších semenech a zralých listech (Fan *et al.*, 1999).

2.2.4.8 PLD α -1 a stres

Po působení kyseliny abscisové, PLD α -1 spouští buněčnou signalizaci prostřednictvím PA, kdy se PA váže na ABI1 protein (Abelson-interactor 1) a tím umožní uzavření stomat (Zhang *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2004; Mishra *et al.*, 2006). Dále je PA produkována PLD α -1 schopna vázat se a aktivovat na NADPH oxidasu a tím tvořit H₂O₂ (Zhang *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2004; Mishra *et al.*, 2006). H₂O₂ oxiduje cytosolickou redukovanou formu glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasy (GAPC) a oxidovaná forma GAPC interaguje s PLD δ a vede k její aktivaci (Hong *et al.*, 2016). PLD α -1 kromě vlastní tvorby PA nepřímo podporuje produkci H₂O₂ a pomocí PLD δ zesiluje tvorbu PA a zprostředkovává odpověď na H₂O₂ v ABA signalizaci (Hong *et al.*, 2016). PA tvořená PLD α -1 taky stimuluje mitogen-aktivovanou proteinkinasu 6 (MPK6) a reguluje buněčnou odpověď za působení solného stresu. Podobně PA interaguje s proteinem, který asociuje s mikrotubulmi MAP65-1 a ovlivňuje polymerizaci a depolymerizaci mikrotubulů (Bargmann *et al.*, 2009). Pomocí počítačové *in silico* analýzy byl v sekvenci PLD α -1 nalezen serin v pozici 481 jako místo možné fosforylace fosfolipasy D alfa 1 map kinasami. Z literatury však není dosud známo, jestli a případně jaká MAP kinasa může s PLD α -1 interagovat. Na základě našich předběžných interakčních analýz jsme zjistili, že právě MAP kinasa MPK3 interaguje s PLD α -1 (Vadovič *et al.*, nepublikované výsledky).

2.3 Transformace rostlin

Transformace rostlin je genetická manipulace, při které dochází k vnesení cizího genu do genomu rostlinné buňky. Transgenozí rostlin můžeme rozdělit na stabilní a transientní či přímou a nepřímou. Když je gen stabilně integrován do rostlinného genomu a změna genetické informace je přenášena na potomstvo, jedná se o transgenozí stabilní. Příkladem je transgenoze zprostředkována bakterií *Agrobacterium tumefaciens* pomocí metody floral dip u *Arabidopsis thaliana*. U transientní transformace není genetická informace začleňována do genomu hostitele a nepřenáší se na potomstvo. Nepřímé metody transformace využívají vektorem zprostředkovaný přenos genů, např. transfer pomocí bakterie – *Agrobacterium* nebo pomocí rostlinných virových vektorů. Přímá transgenoze využívá přímý přenos DNA bez využití mikroorganismů (Bent, 2000).

2.3.1 Přímé metody vnášení transgenů

2.3.1.1 Mikroprojektilová metoda

Transformační metoda pomocí mikroprojektilového přenosu DNA patří mezi nejvíce efektivní fyzikální metody pro přímý přenos cizorodé DNA do rostlinných buněk. Výhodou této metody je univerzálnost – může být využita také na přenos DNA do mikroorganismů a savčích buněk. U rostlin se využívá zejména na transientní transformaci jednoděložných rostlin a transformují se listy, kořeny, meristemická pletiva, nezralá embrya a buněčné suspenze atd. Při této metodě je za přetlaku helia vstřelována cizorodá DNA do rostlinného pletiva, které je během transformace ve vakuu. Jako nosiče se využívají mikročástice zlata, platiny nebo wolframu. Před samotnou transformací dochází k izolaci DNA obsahující transgen, k přípravě nosičových mikročástic zlata, pokrytí mikročástic zlata plazmidovou DNA a k přípravě rostlinného materiálu určeného na transformaci. Metoda mikroprojektilového přenosu DNA se využívá pro studium transientní exprese genů, k analýze promotorů a studiu mechanismů exprese genů. Nevýhodou této metody je vysoký počet kopií transgenů v cílovém organismu a časté poškození cílových pletiv v důsledku nedostatku kontroly rychlosti bombardování. (Pawlowski a Somers, 1996).

2.3.1.2 Další metody přímé transformace

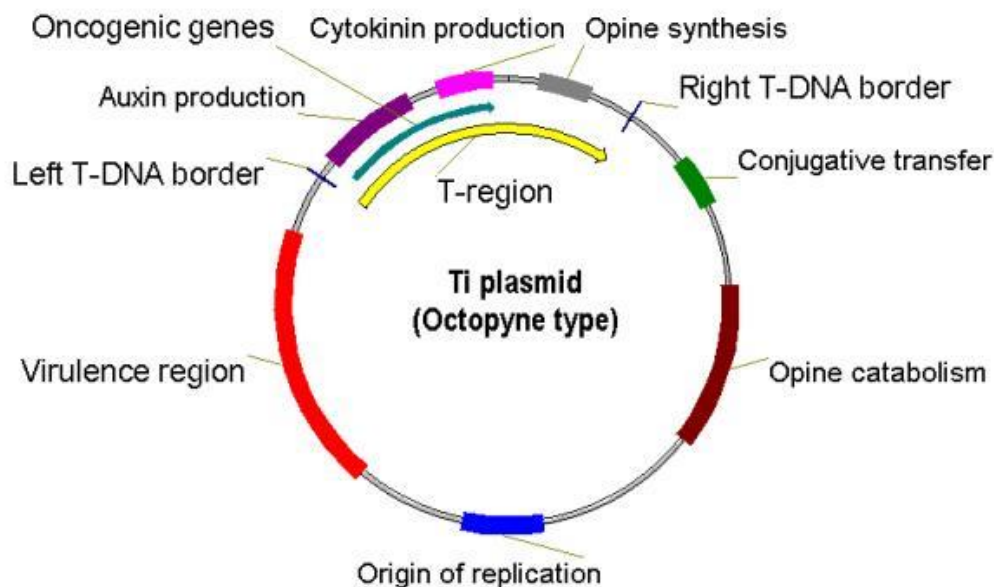
Mezi další transformační metody přímého přenosu patří mikroinjekce, přenos organelového genomu a transformace pomocí polyethylenglykolu. Mikroinjekce je přímá fyzikální metoda zahrnující mechanické vložení žádoucí DNA do cílové buňky, pletiva. Cílovou buňkou mohou být protoplasty, kalusy, embrya či meristémy. Metoda je založena na imobilizování cílové buňky (v agarose) a přenosu genu pomocí skleněné injekční pipety (Zhang a Yu, 2008). Protoplasty mohou být transformovány také pomocí polyethylenglykolu. Transformace je prováděna v přítomnosti vápenatých kationtů. Dochází ke stabilizaci plazmatické membrány protoplastů a membrána je propustná pro DNA. DNA vstupuje do jádra protoplastů a integruje se do genomu. Výhodou metody je její využití pro širokou škálu rostlinných druhů (Sheen *et al.*, 2014).

2.3.2 Nepřímé metody vnášení transgenů

V bakalářské práci se budu blíže zabývat transformací pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens*.

2.3.2.1 Transformace pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens*

Genetická transformace zprostředkovaná *Agrobacterium tumefaciens* je převládající technologie užívaná k produkci geneticky modifikovaných transgenních rostlin (Tzfira a Citovsky, 2006). *Agrobacterium tumefaciens* je gramnegativní bakterie patřící do čeledi *Rhizobiaceae*. Je to půdní patogenní bakterie přirozeně se vyskytující v kořenovém systému bobovitých rostlin. *A. tumefaciens* způsobuje tumorové nádory – crown gall u dvouděložných rostlin. *Agrobacterium* geneticky transformuje hostitelské buňky pomocí přenosu definovaného DNA segmentu z tumor-indukujícího (Ti) plazmidu (Obr. 2) do genomu hostitelské buňky (Tzfira a Citovsky, 2006). V přírodě přenesená transferová DNA (T-DNA) nese set onkogenů a geny opinové syntézy, jejichž exprese v rostlinných buňkách vede k neoplastickému růstu transformované tkáně a produkci opinů, derivátů aminokyselin, používaných bakterií jako zdroj dusíku (Tzfira a Citovsky, 2006). Mimo T-DNA se dále vyskytují geny pro opinový katabolismus a geny zúčastňující se transferu T-DNA z bakterie do rostlinné buňky. Rekombinantní kmeny *Agrobacterium*, ve kterých byly původní T-DNA geny nahrazeny geny zájmu, jsou nejefektivnějším zprostředkovatelem k zavedení genů zájmu do rostlin a k produkci transgenních rostlinných druhů (Tzfira a Citovsky, 2006). Molekulární mechanismus transferu T-DNA pomocí *Agrobacterium tumefaciens* do rostlinné buňky je znázorněn na Obr 3.



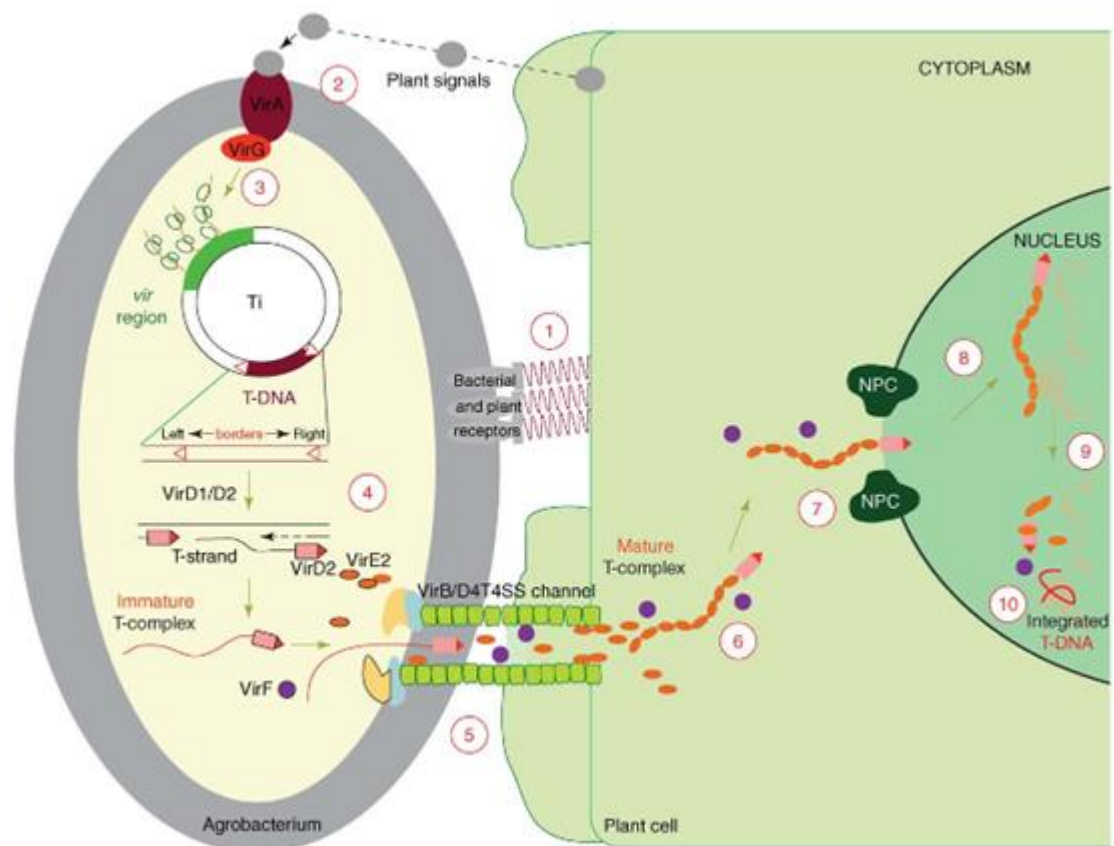
Obr. 2 Ti-plazmid (převzato

[zhttps://molbioandbiotech.files.wordpress.com/2007/08/ti_plasmid1.jpg](https://molbioandbiotech.files.wordpress.com/2007/08/ti_plasmid1.jpg))

Origin of replication - počátek replikace, virulence region – virulentní oblast, left T-DNA border – levá hranice T-DNA, right T-DNA border – pravá hranice T-DNA, auxin production – produkce auxinů, cytokinin production – produkce cytokininů, opine synthesis – syntéza opinů, oncogenic genes – geny způsobující nádory, conjugative transfer – konjugací přenos, opine catabolism – geny pro opinový katabolismus.

2.3.2.2 Proces genetické transformace

Agrobacterium infikuje poškozené nebo poraněné rostliny. Poraněné rostliny uvolňují látky fenolické povahy – acetosyringon, kyselina sinapová, kyselina lysergová, kyselina nerulová a acetovanilon. Díky těmto látkám rozpozná *Agrobacterium* poškozené místo. *A. tumefaciens* má jedinečnou schopnost přenosu segmentu DNA (T-DNA) z Ti-plazmidu do jádra infikované rostlinné buňky. T-DNA je ohraničena levou a pravou hranicí. Do rostlinné buňky se přenáší pouze T-DNA. Virulentní oblast se skládá ze 6 operonů, které jsou esenciální pro transfer T-DNA (*virA*, *virB*, *virD* a *virG*) a pro zvýšení eficiency transferu (*virC* a *virE*).



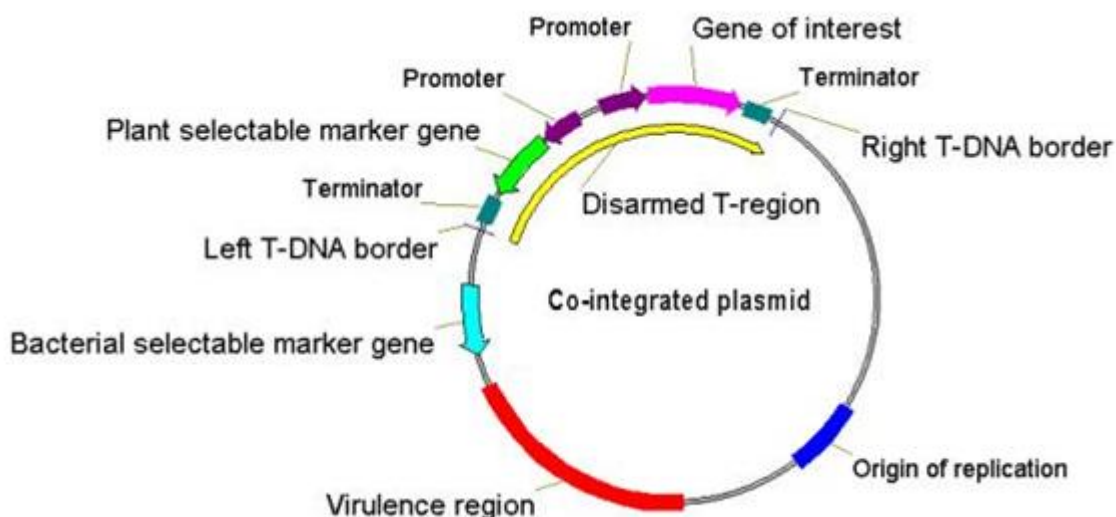
Obr. 3 Mechanismus transformace (Tzfira a Citovsky, 2006).

Transformační proces začíná přilnutím bakterie k rostlině, následuje indukce exprese vir oblasti pomocí specifických hostitelských signálů (Tzfira a Citovsky, 2006). Fenolické látky uvolňované rostlinnou buňkou rozpozná *Agrobacterium* pomocí VirA a VirG proteinů. VirG indukuje expresi všech *vir* genů. Jednořetězcová molekula T-DNA je vytvořena kombinací bakteriálních VirD1 a VirD2 proteinů (Tzfira a Citovsky, 2006). VirD2 je kovalentně navázán na 5'konec řetězce (Guo *et al.*, 2011). Poté je tento komplex přenesen do hostitelské buňky spolu s dalšími Vir proteiny. V cytoplasmě rostlinné buňky se T-DNA pokryje VirE2 proteiny, které ho chrání před nukleázami (Tzfira a Citovsky, 2006). T-DNA je transportována do jádra pomocí VirD2 a VirE2 proteinů (Tzfira a Citovsky, 2006). V jádře se Vir proteiny odpojí od řetězce a T-DNA se začlení do genomu hostitelské buňky (Tzfira a Citovsky, 2006).

2.3.2.3 Konstrukce binárních vektorů

Konstrukce transformačních vektorů je založena na původním Ti-plazmidu, z něhož byly odstraněny geny pro tvorbu fytohormonů a opinů. Mezi hraniční sekvence T-DNA se vloží cizorodá DNA, kterou chceme integrovat do rostlinného genomu (Obr. 4).

Principem konstrukce binárních vektorů je rozdělení rozsáhlého Ti-plazmidu na dva plazmidy menší tak, aby úsek virulence a T-DNA nebyly společně na jednom plazmidu. Menší plazmid se nazývá klonovací a obsahuje hraniční sekvence T-DNA. Mezi tyto sekvence se vklouje DNA určená k přenosu a selekční gen. Větší plazmid je označován jako pomocný a nese větší část Ti-plazmidu, která obsahuje geny potřebné pro infekci hostitele a přenos T-DNA.



Obr. 4 Transformační vektor

(převzato z <http://www.bios.net/daisy/AgroTran/g1/850.html>)

Bacterial selectable marker gene – bakteriální selekční gen, left T-DNA border – levá hranice T-DNA, right T-DNA – pravá hranice T-DNA, terminator – terminátor, plant selectable marker gene – rostlinný selekční gen, promoter – promotor, gene of interest – gen zájmu.

2.3.2.4 Selektované transgeny

K selekci transformovaných buněk je nutné, aby T-DNA obsahovala gen, který umožňuje selekci transformovaných buněk. K tomuto účelu se používají geny rezistence k látce, která se přidává do média. Rostliny, které neobsahují gen pro tuto rezistenci, nedokážou na selekčním médiu přežít a na médiu hynou. Za účelem selekce transformovaných buněk se využívají látky jako antibiotika a herbicidy, které způsobí smrt netransformovaných buněk.

Pozitivní selekční systémy jsou ty, které podporují růst transformovaných buněk (Miki a McHugh, 2004). Mohou to být antibiotika, herbicidy nebo analogy léku (Miki a McHough, 2004). Jedny z nejvíce používaných látek k selekci jsou antibiotika. Klonovací vektory nesou gen pro rezistenci k určitému antibiotiku, takže na médiu, které obsahuje dané antibiotikum, rostou pouze rostliny, které tento vektor obsahují (Labguide.cz). Gen neomycin fosfotransferasa (*nptII*), který uděluje rostlině rezistenci na kanamycin inhibicí syntézy proteinů, je typickým příkladem systému, který je toxický pro netransformované rostliny (Miki a McHugh, 2004). Druhým nejvyužívanějším antibiotikem, využívaný k selekci transformovaných rostlin, je Hygromycin B. Inhibuje proteinovou syntézu se širokospektrálním účinkem proti prokaryotům a eukaryotům (Miki a McHough, 2004). Je velmi toxický pro rostliny (Miky a McHough, 2004) i pro člověka. Gen hygromycin fosfotransferasa (*aphIV*) kóduje hygromycin B fosfotransferasu (Miki a McHough, 2004). Příkladem selekčního systému, kdy selekční substrát není toxický, je gen *manA*, který kóduje fosfomanosovou izomerazu (Miki a McHugh, 2004). V tomto případě, manosu jako substrát nejsou schopny využívat jako zdroj uhlíku netransformované buňky, ale jen transformované buňky s *manA* genem (Miki a McHough, 2004). Dalším příkladem pozitivního selekčního systému, který nevyžaduje přidavek vnějšího substrátu, ale podporuje selekční růst a diferenciaci transformovaného materiálu je gen isopentyl transferasa (*ipt*). Nadexprese *ipt* genu z Ti-plazmidu *Agrobacterium tumefaciens* zvyšuje hladinu cytokininu a vede ke vzniku výhonků z transformovaných rostlinných buněk (Kunkel *et al.*, 1999). Cytokininy patří mezi fytohormony a hrají důležitou roli v růstu a vývoji rostlin. Negativní selekční systémy byly popsány v rostlinách pro geny, které vedou ke smrti transformovaných buněk (Miki a McHough, 2004). Další možností pro selekci transformovaných rostlin je využití selekčních genů, které způsobují rezistenci k herbicidům. Mezi nejvýznamnější herbicidy patří glyfosát a fosfinitricin. Glyfosát je vyráběn pod názvem Roundup a používá se k hubení plevelu. Glyfosát je specifickým inhibitorem enzymu 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfát syntézy (EPSP) (Wang *et al.*, 2014) a selekční marker, který způsobuje rezistenci ke glyfosátu je glyfosát acetyltransferasa (*gat*) (Vikram a Koiwa, 2009). EPSP je součástí šikimátové dráhy rostlin, která umožňuje tvorbu aromatických aminokyselin (fenylalanin, tyrosin, tryptofan) (Vikram a Koiwa, 2009). Inhibicí tohoto enzymu dochází k poruchám funkce této dráhy a odumření rostlin. Pro rostliny má neblahý vliv nedostatek aminokyselin i degradace celé biochemické dráhy (Duke a Powles, 2008). Dalším významným herbicidem je

fosfinitricin (PPT), který jsem využila při své práci. Komerčně se prodává pod názvem BASTA a blokuje enzym glutaminsyntetasu. Glutaminsyntetasa způsobuje přeměnu kyseliny glutamové na glutamin. Gen rezistence bialaphos resistance (*bar*) kóduje enzym fosfinitricin N-acetyltransferasu (Miki a McHough, 2004). PPT je kompetitivní inhibitor glutaminsyntetasy, která jako jediný enzym katalyzuje asimilaci amoniaku na kyselinu glutamovou v rostlinách (Miki a McHough, 2004). Inhibice glutaminsyntetasy vede k akumulaci toxického amoniaku a způsobuje smrt rostlinných buněk (OECD, 1999).

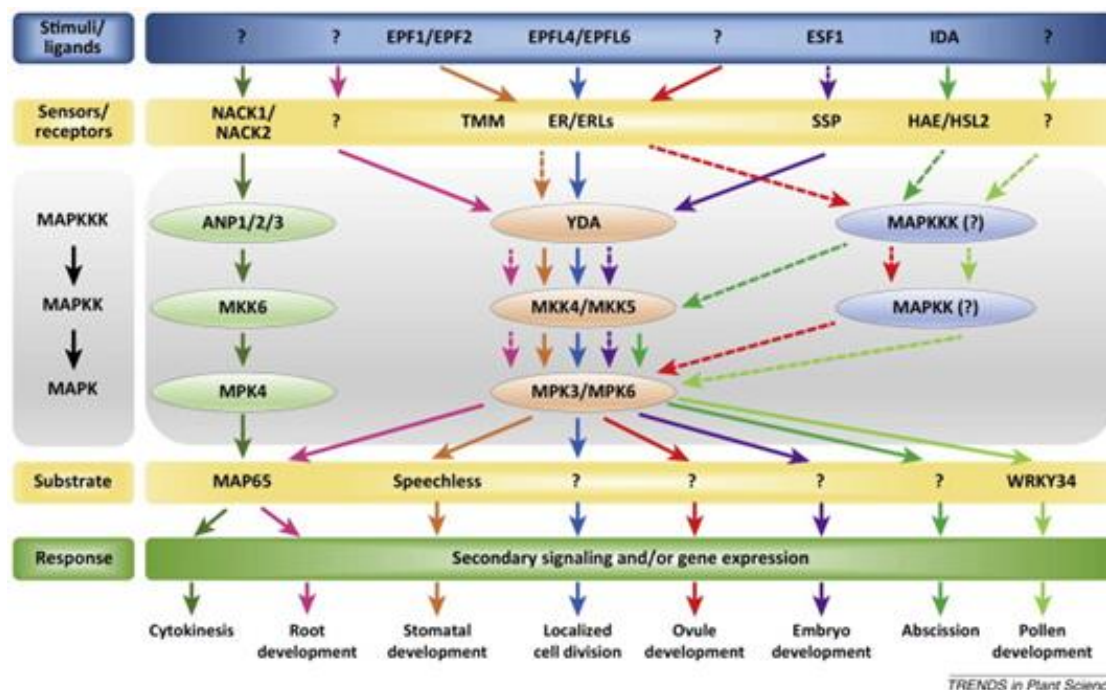
2.4 MAP Kinasy rostlin

Map kinasy (odvozené z mitogen-activated protein kinases – mitogenem aktivované proteinkinasy, MAPK) jsou enzymy patřící do skupiny kinas (Pearson *et al.*, 2001). Účastní se buněčných pochodů, jako je regulace exprese genů, mitóza, buněčná diferenciaci a proliferace a programovaná buněčná smrt (Pearson *et al.*, 2001). Rostlinné mapkinasy hrají roli v imunitě a odpovědi na různé druhy stresu (Xu a Zhang, 2015). MAPK kaskády jsou konzervované signální moduly, které se nachází ve všech eukaryotických buňkách, včetně rostlin, hub a zvířat (Colcombet a Hirt, 2008).

2.4.1 MAPK kaskáda

MAPK kaskáda se skládá ze třístupňového modelu: MAP3K, MAP2K a MAPK, které se fosforylují a aktivují navzájem specifickým způsobem (Colcombet a Hirt, 2008). V genomu *A. thaliana* se nachází asi 20 MAPKs, 10 MAPKK a přibližně 80 MAPKKK (Cheong a Kim, 2010). Studie rostlinných MAPKs se zaměřují na 3 nejčastěji studované rostlinné MAP kinasy: MPK3, MPK6 a MPK4 (Xu a Zhang, 2015). MAPK kaskády jsou zapojeny do téměř všech aspektů rostlinného růstu a vývoje, včetně gametogeneze, embryogeneze, morfogeneze, senescence, fertilizace a tvoření semen (Xu a Zhang, 2015). Mají rozhodující funkce v buněčné proliferaci a diferenciaci organismu a v odpovědi organismu na různé vnější i vnitřní podněty (Xu a Zhang, 2015). MPK tvoří koncové komponenty sekvenční MAPK kaskády a jsou aktivovány MAPK kinasami (MAPKK) dvojitou fosforylací konzervovaných aminokyselinových reziduí threoninu a tyrosinu v motivu TxY (Thr-x-Tyr, x je jakákoliv aminokyselina) lokalizovaného v aktivační smyčce (T-smyčka) mezi kinasovými podjednotkami VII a

VIII (Ichimura *et al.*, 2002). MAPKK jsou samy aktivovány MAPKK kinasami (MAPKKK) nebo fosforylací serinových nebo threoninových reziduí v T-smyčce (Ichimura *et al.*, 2002).



Obr. 5 Schéma znázorňující funkci mitogen-aktivovaných proteinkinas (MAPK) MPK3, MPK6 a MPK4 v různých rostlinných procesech u *Arabidopsis* (Xu a Zhang, 2015). Vlevo je znázorněna typická signalizační dráha zprostředkovaná MAPK. Po rozpoznání specifických molekul pro pletiva/buňku (např. peptidové ligandy), receptory proteinkinasy aktivují MAPK kaskády prostorově specifickým způsobem, a to buď přímo nebo prostřednictvím dalšího mediátoru. Aktivované MAPK fosforylují jejich substráty, což nakonec vede k buněčné proliferaci nebo diferenciaci ve specifických vývojových stádiích a tím regulují růst a vývoj rostlin. Podobně MAPK regulují i buněčnou signalizaci. Šipky s nepřerušenými čarami ukazují interakce, které jsou podpořeny genetickými nebo biochemickými důkazy. Otazníky označují neidentifikované signalizační komponenty. Jedna šipka může představovat několik kroků vůči neznámým komponentám v signalizačních drahách.

2.4.2 MAPK

U *Arabidopsis* je 20 různých MPK rozděleno do 4 skupin (A-D) (Ichimura *et al.*, 2002). U skupin A-C se v aktivační smyčce nachází TEY (Threonin-Glutamin-Tyrosin, Thr-Glu-Tyr) motiv, zatímco skupina D obsahuje motiv TDY (Threonin-Asparagin-Tyrosin, Thr-Asn-Tyr) (Ichimura *et al.*, 2002).

Skupina A se nejčastěji uplatňuje v odpovědích rostlin na environmentální a hormonální podněty (Hamel *et al.*, 2006; Colcombet a Hirt, 2008). Exprese genu *MPK3* je snadno indukována environmentálním stresem (Mizoguchi *et al.*, 1996) a MPK3 protein je také aktivován oxidativním stresem (Kovtun *et al.*, 2000).

2.4.2.1 MPK3

MPK3, která je součástí MAP kinasové kaskády, hraje důležitou roli v přenosu stresového signálu v rostlinných buňkách (Gao *et al.*, 2010). Patří do skupiny MAP kinas a je aktivována osmotickým stresem (Droillard *et al.*, 2002), podílí se na signalizaci za účasti kyseliny abscisové (Lu *et al.*, 2002) a je spojená s vrozenou imunitou rostlin a vývojem stomat (Gao *et al.*, 2010). Zvýšená transkripce *MPK3* nastává při vysokém zasolení půdy, při nízké teplotě, poranění (Mizoguchi *et al.*, 1996), osmotickém (Droillard *et al.*, 2002) a oxidativním stresu (Kovtun *et al.*, 2000).

2.4.3 MAPKK

Bylo identifikováno 21 rostlinných MAPKK (Ichimura *et al.*, 2002). Fosforylační místo rostlinných MKK se liší od živočišných proteinkinás (Ichimura *et al.*, 2002). Rostlinné MPKK obsahují sekvenci S/T-X₅-S/T, zatímco u živočichů je S/T-T₃-S/T (Ichimura *et al.*, 2002). Rostlinné MKK jsou rozděleny do 4 skupin A-D (Ichimura *et al.*, 2002).

2.4.4 MAPKKK

Skupina MAPKKK má větší rozmanitost a více členů ve srovnání s MPK a MKK (Ichimura *et al.*, 2002). Na základě aminokyselinové sekvence katalytické domény řadíme MAPK u *Arabidopsis* do 2 tříd: MEKK1-typ a RAF-typ (Ichimura *et al.*, 2002).

..

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Použité přístroje a software pro zpracování výsledků

Analytické pipety (Eppendorf), laminární box (Merci), fytotronová komora Weiss (Gallenkamp), autokláv Sterivap HP IL (MMM Group), laboratorní digestoř (M 1200, MERCI), analytické váhy (XA 110/2X, RADWAG), laboratorní předvážky S1502 (BEL Engineering), mikrovlnná trouba MGE23 (Hitachi), pH metr PC 2700 (Eutech Instruments), horizontální agarosová elektroforéza (Bio-Rad), lednice Liebherr (MED line), Thermocykler (MyCycler™ Personal Thermal Cycler Bio-Rad), spektrofotometr SmartSpec™ Plus (Bio-Rad), chlazená centrifuga Scanspeed 1730R (Labogene), vortex MIXER (Labnet International, Inc.), třepačka Orbital Shaker ES-20 (Biosan), vertikální elektroforéza denaturovaných proteinů SDS-PAGE (Bio-Rad), dokumentační zařízení Chemidoc™ MP systém, epifluorescenční mikroskop + ZEN software (Axio Imager M2, ZEISS), ImageLab 4.0.1 (Bio-Rad).

3.1.2 Enzymy a chemikálie

Ethanol 70%, etanol 96%, metanol, agarosa (Sigma), phytigel (Sigma), GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (ThermoFisher Scientific), Silwet STAR (AgroBio), Murashige & Skoog médium Basal salt mixture (Duchefa), Murashige & Skoog bez vitamínů (Duchefa), fosfinotricin (Duchefa), ticarcilin (Duchefa), sacharosa (Sigma), 6x Gel Loading Dye (ThermoFisher Scientific), akrylamid (Bio-Rad), Diluční pufr (ThermoFisher Scientific), β -merkptoethanol (Sigma), Midori green DNA Staining Solution, YEB médium, Bradfordovo činidlo (Serva), ECL substráty (Clarity™ Western ECL Sunstrat, Bio-Rad), Phire Plant Direct PCR kit (ThermoFisher Scientific).

3.1.3 Rostlinný materiál

- *Arabidopsis thaliana*, ekotyp Columbia (Col-0)
- *Arabidopsis thaliana* – T-DNA mutant *mpk3-1*, Salk 151594
- *Arabidopsis thaliana* – T-DNA mutant *plda-1-1*, Salk 067533

3.2 Metody

3.2.1 Sterilizace a vyšetí semen *Arabidopsis thaliana*

Celý proces byl prováděn v laminárním boxu po vysvícení UV zářením.

Semena rostlin *A. thaliana*, ekotyp Columbia (Col-0), mutantních v genu *plda-1-1*, v genu *mpk3-1* a dvojitých mutantních rostlin v genech *plda-1-1* a *mpk3-1* byla povrchově sterilizována. Semena byla umístěna v mikrozkuvkách, ke kterým byly přidány 2 ml 70% etanolu. Semena byla promývána po dobu 2 minut a poté byl etanol odebrán. Následovala povrchová sterilizace semen s roztokem 1% hypochloridu sodného (zásobní roztok 27 ml destilované vody; 3 ml 10% hypochloridu sodného a 30 μ l TWEENU) po dobu 8 minut. Poté byla semena 3 krát promyta 2 ml sterilní vody po dobu 2 minut. Semena byla po sterilizaci přenesena na připravený sterilní filtrační papír v Petriho miskách a byla ponechána uschnout. Výsev byl proveden nahodile šetrným klepáním do filtračního papíru, na kterém sterilizovaná semena uschnula. Misky byly přikryty víčkama a oblepeny parafinem. Misky se semeny byly umístěny do lednice na 48 h. Po 2 týdnech byly rostliny přesazeny do půdy.

3.2.2 Příprava kultivačního MS média

Semena byla vyseta na tuhé $\frac{1}{2}$ MS médium (Murashige a Skoog, 1962). Na přípravu 1 l $\frac{1}{2}$ MS média bylo do kádinky naváženo 10 g sacharosy, 2,15 g MS prášku, 6 g Phytagelu, bylo upraveno pH pomocí 0,1 mol.l⁻¹ KOH na 5,8 a objem byl doplněn na 1 litr přidáním destilované vody. Médium bylo poté sterilizováno autoklávováním.

3.2.3 Ověření přítomnosti T-DNA inzertu u rostlin mutantních v genu *plda-1-1*

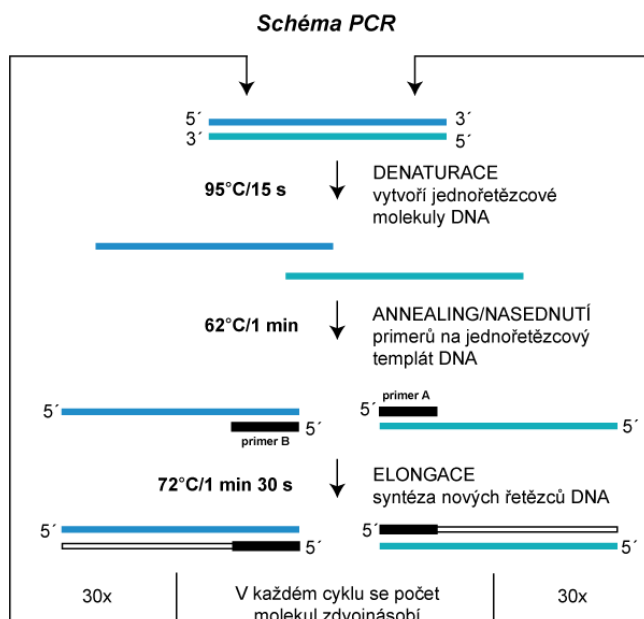
Před přesazením do půdy bylo nutné ověřit přítomnost T-DNA inzertu v *plda-1-1* genu u rostlin a potvrdit, že testované rostliny jsou homozygotní mutanti v *plda-1-1* genu. Na zjištění přítomnosti T-DNA inzertu u *plda-1-1* rostlin byla využita metoda PCR. Na izolaci DNA byl z rostliny odebrán kousek listu (o velikosti 2x2 mm). Rostlinný materiál byl umístěn do 0,6 ml mikrozkuvky, do které bylo předem napipetováno 20 μ l resuspendačního pufru (Tris-HCl, NaCl, EDTA, SDS, ThermoFisher, USA). List byl rozdrcen v pufru špičkou, a mikrozkuvky byly ponechány na ledu. Z mikrozkuvky byl odebrán vzorek pro PCR reakci.

3.2.4 PCR metoda

Polymerázová řetězová reakce (PCR, angl. Polymerase Chain Reaction) je metoda, která slouží k rychlému zmnožení vybraného úseku DNA. Přesný postup je znázorněn na Obr. 6. Vybraný úsek DNA musí být na začátku a na konci ohraničen tzv. primery. Primery se párují s templátovou DNA. Jako polymeráza byla v experimentech použita Phire Hot Start II DNA polymerasa (ThermoFisher, USA). Objem reakce byl nastaven na 10 μ l a cykly reakce jsou znázorněny v Tab. 1.

Tab. 1 Nastavení PCR v termocykleru.

Krok cyklu	Fáze	Teplota	Čas	Počet opakování
1	Počátek denaturace	98°C	5 min	1
2	Denaturace	98°C	5 s	35
3	Annealing	63°C	5 s	
4	Extenze	72°C	25 s	
5	Konečná extenze	72°C	1 min	1



Obr. 6 – Schéma průběhu PCR. (převzato z

http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=1485&typ=html).

Tab. 2 Sekvence primerů použitých při PCR metodě.

Primer	Sekvence primeru od 5 konce po 3 konec
Plda1-1LP_Fw	CCAAAAGAGTTGTCGCTGAAG
Plda1-1_3196_Rev	GGTTGTAAGGATTGGAGGCAGGTAGTCTGA
LBb1.3_Rev	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC
mpk3-1_SALK_LP fw	ATTTTTGTCAACAATGGCCTG
mpk3-1_SALK_RP rev	TCTGCCTTTTTCACGGAATATG

Očekávané velikosti jednotlivých PCR produktů:

Plda-1-1 gen – 870 bp

T-DNA inzert v *plda-1-1* genu – 350 bp

MPK3 gen – 1229 bp

T-DNA inzert v *mpk3-1* genu – 546 bp

3.2.5 Elektroforéza v agarosovém gelu

DNA fragmenty získané z PCR reakce byly analyzovány pomocí agarosové elektroforézy. Elektroforéza separuje částice na základě jejich elektrického náboje ve stejnosměrném elektrickém poli. Fragmenty DNA migrují v agarosovém gelu vlivem stejnosměrného elektrického pole tak, že záporně nabitě molekuly DNA putují od záporně nabitě elektrody (katody) ke kladně nabitě elektrodě (anodě). Rychlost pohybu molekul v elektrickém poli závisí na síle elektrického pole (E), celkovém náboji molekuly (z) a frikčním koeficientu (f). DNA je nutné na agarosovém gelu obarvit, aby byla viditelná. Proto se do gelu přidává barvivo Midori Green, což je analog barviva ethidium bromidu, které po navázání na DNA emituje fluorescenční záření v zelené oblasti. Po ozáření gelu ultrafialovým zářením se detekují příslušné bandy.

Nejprve byl připraven 1% agarosový gel v TAE pufru (složení TAE pufru 40 mmol.l⁻¹ Tris-acetát, 1 mmol.l⁻¹ EDTA, pH=8). Ke vzorkům z PCR byl napipetován vzorkovací pufr (6x DNA gel loading dye, složení bromfenolová modř, xylenkyanol FF; ThermoFisher) a pomocí pipety byla směs promíchána. Vzorky byly poté naneseny na agarosový gel, do kterého bylo pro vizualizaci DNA přidáno 5,5 µl/100 ml barviva Midori Green DNA Staining Solution. Nakonec byl nanesen marker 1 kb Plus DNA ladder (Thermo Scientific, USA). Elektroforéza v závislosti na velikosti gelu byla spuštěna při 80 V a 20 min při malém gelu (5x9 cm) a při velkém gelu (12x20 cm)

100 V po dobu 30 min. DNA fragmenty byly detekovány pomocí UV záření v přístroji UV transiluminátor a byly pořízeny snímky pomocí dokumentačního zařízení GeldocTM EZ systému a softwaru ImageLab (Bio-rad).

3.2.6 Výsev semen *Arabidopsis thaliana*

Homozygotní rostliny, které obsahovaly T-DNA inzert v *plda-1-1* genu byly následně přeneseny z ½ MS média do půdy a květináče byly přeneseny do fytotronu. Fytotron se využívá k pěstování rostlin za kontrolovaných podmínek. Rostliny byly kultivovány při teplotě 22°C (16 hod světlo/8 hod tma), relativní vlhkosti 68% a nechal se narůst do fertilního stavu (4 týdny).

3.2.7 Transformace pomocí metody floral dip

Transformační metoda, která byla použita v této práci, byla metoda floral dip. Ta je jednou z nejpoužívanějších metod umožňující transgenozí. Transgenoze umožňuje přenos genů o známé funkci do požadovaného organismu pomocí *Agrobacterium tumefaciens*. Na transformaci rostlin *Arabidopsis thaliana* byl použit protokol Zhang *et al.*, 2006. Netransformované rostliny v půdě byly přeneseny z fytotronu do laboratoře, aby se aklimatizovaly. Byly ostříhány všechny již vytvořené šesule a opylené květy. Pro transformaci jsou nejlepší neotevřené květy. Byla připravena kultura *A. tumefaciens*. Na stabilní transformaci *plda-1-1* mutantních rostlin byl použit připravený konstrukt obsahující *plda-1-1* gen pod nativním promotorem s vnesenou mutací S481A. Hlavním cílem byla záměna proteinu *plda-1-1* v aminokyselinové sekvenci na místě 481 serinu (S) za alanin (A). Kultura *Agrobacteria* byla naočkována a inkubována přes noc v 5 ml LB média (28°C, 200 rpm). Poté byla kultura přenesena do 2x250 ml YEB média a byla ponechána ke kultivaci přes noc při 28°C a 200 rpm. Dále bylo provedeno měření optické hustoty na spektrofotometru při 600 nm (OD₆₀₀). Naměřená hustota buněk se pohybovala v rozmezí 1,622-1,729. Před samotnou transformací bylo do roztoku přidáno smáčedlo Silwet STAR a roztok byl promíchán.

Rostliny byly ponořeny do bakteriální kultury na 5-10 s a pomocí ubrousku byl odstraněn z rostliny přebytečný roztok. Rostliny byly přikryty, ponechány přes noc ve tmě a poté byly přeneseny do fytotronu, kde se nechaly dozrát. Poté došlo ke sklizení

zralých šešulí se semeny. Pro účinnější transformaci byl proveden další floral dip po týdnu.

3.2.8 Příprava selekčních misek

Po dozrání semen z T0 generace transformovaných rostlin byla semena opět sterilizována. Vysterilizovaná semena byla naseta na *in vitro* selekční médium s obsahem fosfintotricinu. Použitá koncentrace fosfintotricinu byla 160 mg/L. Aby bylo předejito případným kontaminacím z *Agrobacterium tumefaciens*, byl přidán do média také ticarcilin (500 mg/L). Fosfintotricin byl využit jako herbicid pro selekci. Petriho misky byly zalepeny parafilmem a umístěny na 2 dny do lednice kvůli procesu stratifikace. Poté byly misky přeneseny do fytotronu. Podmínky byly 16 hodin světlo/8 hodin tma, teplota byla nastavena na 22 °C a relativní vlhkost na 68%. Po třech týdnech došlo k vyhodnocení nevhodnější koncentrace fosfintotricinu.

3.2.9 Selektce T-DNA inzerčních mutantů

Po 3 týdnech došlo k vyselektování odolných rostlin v T1 generaci. Transformované rostliny v T1 generaci, které přežily na selekčním médiu, by měly obsahovat gen rezistence vůči herbicidu fosfintotricinu (inhibuje enzym glutaminsyntetasu) a tudíž obsahovat vnesený konstrukt S481A. Účinek transformace se předpokládal 0,5%. Jedna miska sloužila jako kontrola a obsahovala vysazené Col-0 rostliny.

3.2.10 Ověření přítomnosti vneseného konstrukt S481A

Postup byl stejný, jako v případě ověření T-DNA inzertu u rostlin mutantních v genu *plda-1-1*. Z rostlin, které přežily na miskách s fosfintotricinem, byl odebrán malý kousek listu do mikrozkušavky, kde byla rozrušena struktura listu v 20 µl resuspendačního pufru. Z mikrozkušavky byly odebrány vzorky pro PCR reakci. DNA fragmenty získané z PCR reakce byly vyhodnoceny agarosovou elektroforézou.

3.2.11 Pozorování semen *Arabidopsis thaliana*

Semenáčky Col-0 a *plda-1-1* byly pozorovány pod binokulární lupou s fluorescenční lampou. Dokumentace byla pořízena prostřednictvím softwaru LAS V4-0 (Leica).

Druhá část bakalářské práce byla zaměřena na získání homozygotní F3 linie dvojitých mutantů v genech *plda-1-1/mpk3-1*.

3.2.12 Selektce F3 generace dvojitých mutantů *plda-1-1* a *mpk3-1*

V této části jsem začala pracovat s F2 generací mutantních rostlin v genech *plda-1-1/mpk3-1*.

3.2.13 Genotypová analýza *plda-1-1* a *mpk3-1* mutantů

Na genotypizaci byly jako kontrola použity rostliny Col-0, *plda-1-1* a *mpk3-1*. Z každé rostliny byl odebrán kus listu a vložen do 0,6 ml mikrozkušavky s 20 μ l dilučního pufru. List byl rozdrcen pomocí špičky a mikrozkušavky s extrahovanou DNA byly umístěny na led. Při PCR reakci dvojitých mutantů byly připraveny 4 reakční směsi. První dvě reakční směsi byly připraveny pro gen *PLD α -1* (Tab. 1), další dvě reakční směsi pro gen *MPK3* (Tab. 2). První reakční směs (MM1) byla připravena proti wild type *PLD α -1* genu a obsahovala LP jako Forward primer, P3196 jako Reverse primer pro amplifikaci *PLD α -1*. Druhá reakční směs (MM2) byla navržena pro detekci T-DNA inzertu v *PLD α -1* genu a lišila se kombinací primerů. Místo LP byl použit LBb1.3 primer pro identifikaci T-DNA. Podobně byly připraveny reakční směsi 3 (MM3) a 4 (MM4) pro amplifikaci genu *MPK3* a určení T-DNA inzertu v *MPK3* genu. Zde byl využit primer RP. Přesné objemy a další složky směsi jsou uvedeny v tabulkách (Tab. 3 a 4). Jako polymerasa byla použita Phire Hot Start II DNA polymerasa (ThermoFisher, USA).

Tab. 3 Složení reakčních směsí pro *PLD α -1*.

MM1-WT		MM2 – LBb 1.3	
H ₂ O	4 μ l	H ₂ O	4 μ l
2x PCR pufr	5 μ l	2x PCR pufr	5 μ l
Primer FW (LP)	0,25 μ l	Primer FW (LBb 1.3)	0,25 μ l
Primer Rev (3196)	0,25 μ l	Primer Rev (3196)	0,25 μ l
Phire Hot Start	0,2 μ l	Phire Hot Start	0,2 μ l
DNA	0,3 μ l	DNA	0,3 μ l

Tab. 4 Složení reakčních směsí pro *MPK3*.

MM3-WT		MM4 – LBb 1.3	
H ₂ O	4 μ l	H ₂ O	4 μ l
2x PCR pufr	5 μ l	2x PCR pufr	5 μ l
Primer FW (LP)	0,25 μ l	Primer FW (LBb 1.3)	0,25 μ l
Primer Rev (RP)	0,25 μ l	Primer Rev (RP)	0,25 μ l
Phire Hot Start	0,2 μ l	Phire Hot Start	0,2 μ l
DNA	0,3 μ l	DNA	0,3 μ l

Nastavení PCR v termocykleru dle Tab. 1.

Po PCR reakci byl připraven 1% agarosový gel, na který byly vzorky napipetovány. Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 100 V po dobu 30 min. Následně byl výsledek elektroforézy vyhodnocen pomocí dokumentačního zařízení GeldocTM EZ systému a softwaru ImageLab (Bio-Rad). Rostliny, které byly potvrzeny jako dvojitě mutanty v genech *plda-1-1* a *mpk3-1*, byly nasazeny do květináčů s hlínou a přeneseny do fytotronu (22 °C, 16 h světlo/8 h tma).

3.2.14 Izolace proteinů

Byl připraven extrakční pufr (50 ml = 30 mM Tris báze 0, 1817 g; 10% glycerol 5 ml; 150 mM NaCl 0, 438 g; 10 mM EDTA 0, 1861 g; 1 mM NaF 0, 5 ml; jako poslední se přidal 20 mM DTT 1 ml a 20 μ l/ml roztok inhibitorů proteas Complete v sterilní vodě). Listy a kořeny byly rozdrceny v třecí misce pomocí tekutého dusíku. Do mikrozkuhavek bylo napipetováno 100-200 μ l extrakčního pufru a byl přidán vzorek.

Inkubace 30 min při 4°C na ledě. Po extrakci proteinů byly vzorky centrifugovány při 13 000 rpm, 20 min, 4°C. Dále se pracovalo se supernatantem, který byl ihned odebrán z mikrozkušavek do nových zkumavek. K zjištění koncentrace proteinů byla využita Bradfordova metoda a spektrofotometrické měření při 595 nm.

3.2.15 SDS-PAGE elektroforéza

Vzorky byly naředěny na koncentraci 1 mg/ml a ke každému vzorku byl napipetován 4x Laemmli Sample Buffer a 5% β-merkaptoetanol. Vzorky byly ponechány 10 min denaturovat při 95°C a následně byly stočeny na stolní pikofuze. Byl připraven 10% StainFree gel (BioRad, USA) pro denaturující polyakrylamidovou elektroforézu v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE) podle Tab. 5. Jako poslední byl k roztoku přidán TEMED. Byla připravena aparatura pro SDS-PAGE a dělicí gel byl napipetován mezi dělicí skla přibližně 1 cm od vrchní hrany. Na něj byl napipetován zaostřovací gel a nakonec byl do gelu vložen hřebínek, který byl po ztuhnutí odstraněn.

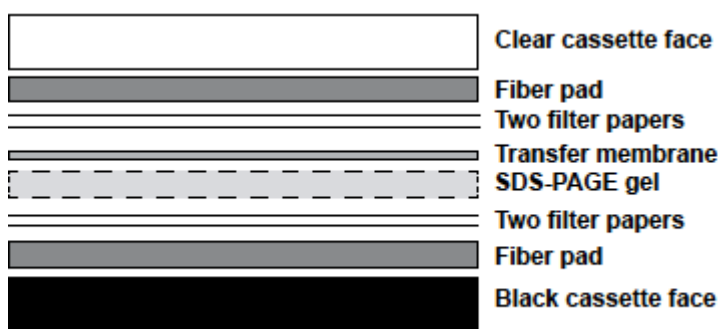
Tab. 5 Složení StainFree gelů (BioRad, USA) pro SDS-PAGE.

Dělicí gel (5 ml)		Zaostřovací gel (2 ml)	
Resolver A	2,5 ml	Stacker A	2 ml
Resolver B	2,5 ml	Stacker B	2 ml
10% APS (4 mg/400 µl)	0,025 ml	10% APS (4 mg/400 µl)	0,010 ml
TEMED	0,0025 ml	TEMED	0,002 ml

Připravený gel v aparátu byl vložen do elektroforetické vany, která byla naplněna Running puřrem. Do první jamky bylo napipetováno 5 µl proteinového standardu a do následujících jamek 10 µl vzorku. Následně byla spuřtěna SDS-PAGE elektroforéza při 120V po dobu, než se dané vzorky separovaly a než modrá barvička z Laemmli buffer doputovala na konec gelu.

3.2.16 Imunoblotová analýza

Pro imunoblotovou analýzu byly použity PVDF membrány (o velikosti 7x8,5 cm), které byly ponechány v metanolu po dobu 1 min a následně byly inkubovány v transferovém pufri. Gel z SDS-PAGE, houbičky a filtrační papíry byly inkubovány v transferovém pufri (1 l = 100 ml 10xTB/transfer buffer = Tris 30 g, glycin 144g/, 100 ml metanolu, 800 ml vody) a poté byla pro přenos proteinů na membrány připravena komůrka podle Obr. 7. Komůrka byla vložena do vany a doplněna transferovým pufrem a bylo vloženo do vany ledítko. Zařízení bylo připojeno k elektrickému napětí 24 V a přenos proteinů na membránu probíhal přes noc při 4°C.



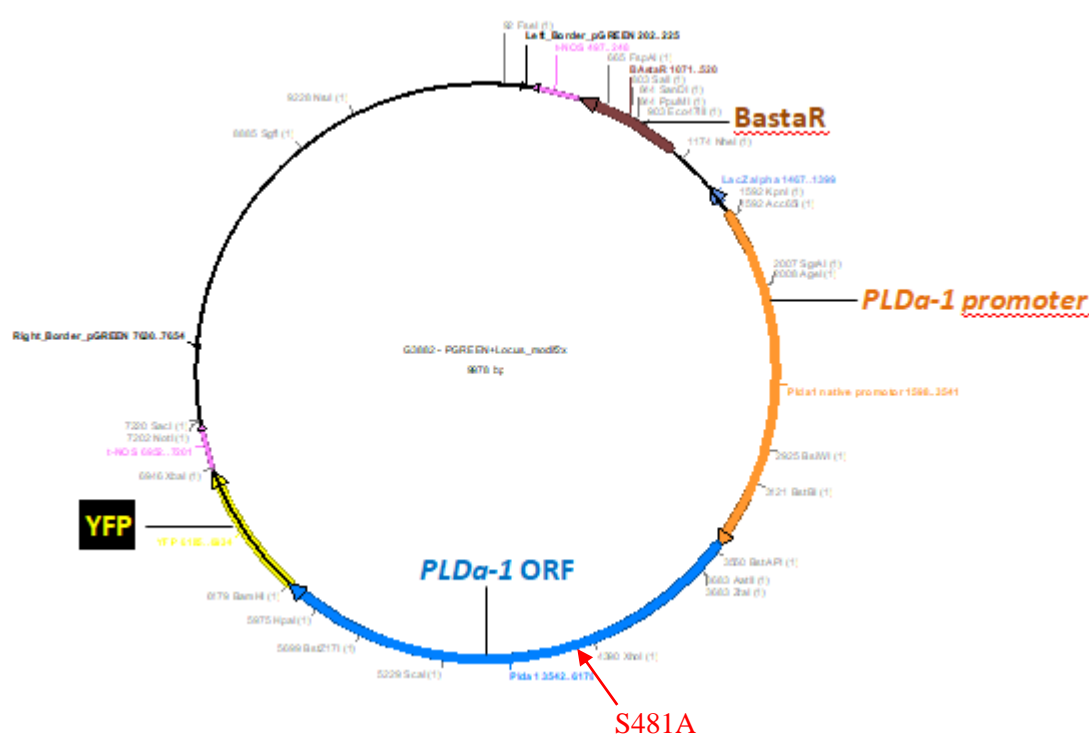
Obr. 7 Složení komůrky pro přenos proteinů na PVDF membránu (převzato z <http://capricorn.bc.edu/wp/pathways/protein-expression/western-blots/western-blot-exercises/>) Přenosová kazeta se skládala z houbičky, 2 filtračních papírů, gelu, PVDF membrány, 2 filtračních papírů a houbičky. Všechny komponenty musely být stále namočené v transferovém pufri. Membrána se položila na povrch gelu, který byl směrem vzhůru k PVDF membráně a nesměly být přítomny bubliny.

Po proběhnutí přenosu byly StainFree membrány zesnímány pomocí programu ImageLab 4.0.1. a systému ChemidocTM MP systému. Membrány byly dále promyty 2x po dobu 10 min TBST (1 l: 100 ml 10xTBS, 900 ml voda, 1 ml Tween). Následně byly membrány blokovány pomocí blokovacího roztoku, který byl složen ze 4% BSA a 4% sušeného mléka v TBST. Blokování probíhalo přes noc na třepačce při teplotě 4°C. Po skončení blokování byly obě membrány 3x promyty v TBST po dobu 10 min. Pro inkubaci s primární protilátkou byly připraveny roztoky primárních protilátek anti-MPK3 v ředění 1:2000 a anti-pld α -1/2 v ředění 1:3000 v 1% BSA v TBST. Inkubace s anti-MPK3 protilátkou probíhala 5 h a s anti-pld α -1/2 protilátkou 1,5 h na třepačce při laboratorní teplotě. Po inkubaci s primární protilátkou byly membrány promyty 6x v TBST po dobu 10 min. Poté byly membrány inkubovány se sekundárními protilátkami proti králíkovi. Sekundární protilátky byly naředěny v roztoku 1% BSA a

TBST v poměru 1:5000. Po inkubaci se sekundárními protilátkami, která trvala 1,5 h při laboratorní teplotě, byly membrány promyty v TBST, 3x10 min. Detekce membrán proběhla po inkubaci (1 min) membrán v roztoku křenové peroxidasy a chemiluminescenčního substrátu (ECL). Dokumentace byla provedena pomocí programu ImageLab a chemiluminescenční signál byl získán pomocí ChemiDoc™. Pro detekci nanesení rovnáného množství proteinů na mebráně byly membrány detekovány pomocí Stain-Free technologie na ChemiDoc™zařízení.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

První část práce byla zaměřena na přípravu a selekci transgenních *plda-1-1* rostlin *Arabidopsis thaliana* s vneseným konstruktem *proPLDa1::PLDa1:YFP*, který nesl mutaci v pozici 481, jež nahrazovala serin za alanin, S481A. Právě pozice 481 byla pomocí GPS2.1 softwarové analýzy určena jako potencionální fosforylační místo, kde může proběhnout fosforylace PLD α -1 proteinu za účasti MAP kinas. Záměrem práce bylo využít vyselektované transgenní rostliny na sledování případné změny v buněčné lokalizaci mutované verze PLD α -1-YFP (S481A) proteinu oproti přirozené (nemutované) formě PLD α -1-YFP proteinu.

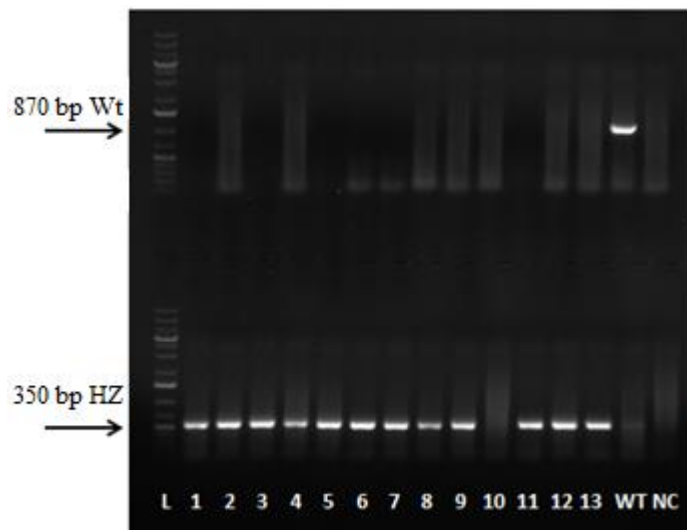


Obr. 8 Schématické znázornění konstruktu pGreen0229 s vloženým genem *proPLDa1::PLDa1:YFP* nesoucím mutaci S481A.

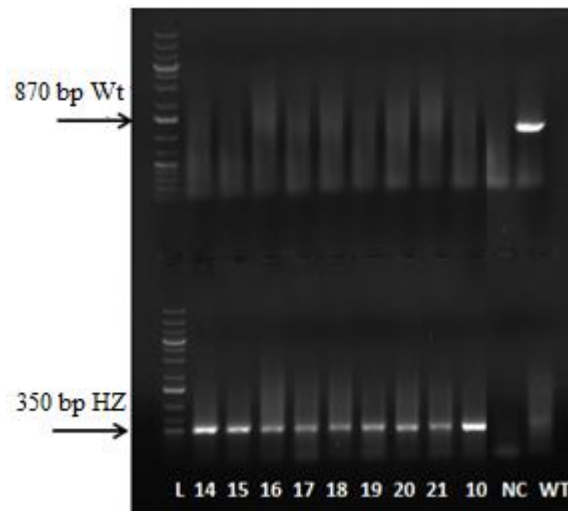
4.1 Ověření T-DNA inzertu v *plda-1-1* genu

Na začátku byla ověřována přítomnost T-DNA inzertu pomocí PCR reakce v *plda-1-1* genu u rostlin *Arabidopsis thaliana* – tedy jestli byly rostliny homozygotní mutanti v *plda-1-1* genu. Homozygotní rostliny byly použity na stabilní transformaci pomocí metody floral dip. Výsledné obrázky agarosového gelu jsou na obr. 9 a 10. Bylo testováno přibližně 20 *plda-1-1* mutantních rostlin 7 dní starých na *in vitro* miskách. Pro

detekci divokého typu *plda-1-1* genu byla jako kontrola v PCR reakci použita DNA z rostliny divokého typu Col-0. Pro ověření T-DNA inzertu v *plda-1-1* genu byla použita kombinace forward primer LBb1.3 a reverse primer P3196. Pro ověření divokého typu *plda-1-1* genu byla použita kombinace forward primer LP a reverse primer P3196. Jako negativní kontrola pro správnost pipetování a správný průběh PCR reakce byla použita v reakci namísto DNA vzorku dH₂O. Správná přítomnost T-DNA inzertu v *plda-1-1* genu byla ověřena pomocí agarosové elektroforézy. Očekávaná velikost PCR fragmentu pro T-DNA inzerci byla 350 bp a pro „wild type“ verzi *plda-1-1* genu 870 bp (Obr. 9 a 10). Všechny testované rostliny byly potvrzeny jako homozygotní mutanti rostliny v *plda-1-1* genu.



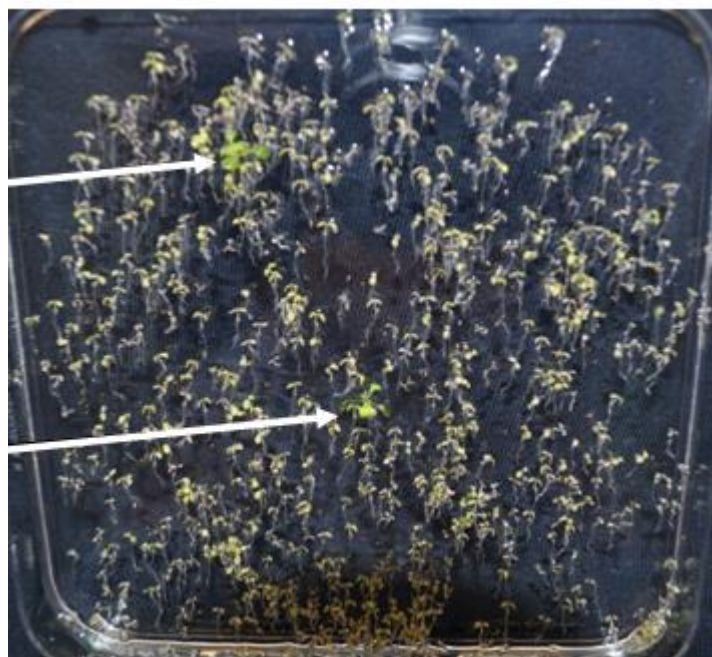
Obr. 9 Snímek agarosového gelu z horizontální elektroforézy. Ověření *plda-1-1* mutantních rostlin genotypováním před stabilní transformací. L – ladder, rostliny 1-13, *plda-1-1* mutantní rostliny, WT – divoký typ (Col-0) kontrolní rostliny, NC – negativní kontrola.



Obr. 10 Snímek agarosového gelu z horizontální elektroforézy. Ověření *plda-1-1* mutantních rostlin genotypováním před stabilní transformací. L – ladder, rostliny 14-21, *plda-1-1* mutantní rostliny, WT – divoký typ (Col-0) kontrolní rostliny, NC – negativní kontrola.

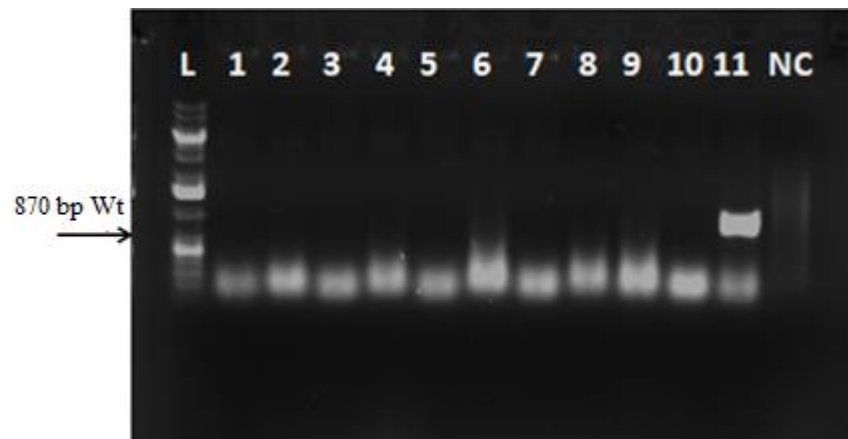
4.2 Selektce a ověření transgenních T1 rostlin *Arabidopsis thaliana* s konstruktem *proPLDa1::PLDa1:YFP* s mutací S481A

Po ověření přítomnosti T-DNA inzertu v *plda-1-1* mutantních rostlinách byly rostliny narosteny do stádia vhodného k stabilní transformaci (cca 4-5 týdnů) a následně byly transformovány metodou floral dip s již zmíněným konstruktem *proPLDa1::PLDa1:YFP* s mutací S481A. Po transformaci byly rostliny přivedeny do stádia dozrávání semen a poté z nich byly sesbírány semena v T0 generaci. Selektce T1 generace transgenních rostlin, nesoucí konstrukt *proPLDa1::PLDa1:YFP* s mutací S481A, byla provedena na miskách s ½ MS médiem s obsahem fosfinotricinu (16 mg/L) a ticarcilinu (500 mg/L). Rostliny rezistentní vůči fosfinotricinu měly kotyledony zelené a na médiu přežívali. Naopak rostliny, které nebyly k fosfinotricinu rezistentní, nevyklíčily nebo byly malé a byly nažloutlé až bílé. Bylo vyselektováno 10 rostlin odolných vůči fosfinotricinu, přičemž jedna rostlina následně transfer na ½ MS médium bez obsahu selekčních látek nepřežila.



Obr. 11 Foto misek selektovaných transgenních rostlin *A. thaliana* v T1 generaci na ½ MS médiu obsahujícím fosfotricin a ticarcilin. Pozitivní transgenní rostliny nesoucí rezistenci vůči fosfotricinu jsou označeny bílou šipkou.

Po vyselektování přeživších rostlin na selekčních médiích (přibližně po 3 týdnech) byly rostliny přeloženy na ½ MS médium bez obsahu selekčních látek. Po dalším týdnu bylo u devíti vybraných rostlin provedeno ověření přítomnosti konstruktů *proPLDa1::PLDa1:YFP* s mutací S481A pomocí PCR reakce. Jako kontrola nepřítomnosti *plda-1-1* genu u rostlin byla v PCR reakci použita DNA z *plda-1-1* mutantní rostliny a jako kontrola pro přítomnost *plda-1-1* genu u rostlin byla použita DNA z Col-0 rostliny divokého typu. Jako negativní kontrola pro správnost pipetování a pro průběh PCR reakce byla opět použita v reakci namísto vzorku DNA dH₂O. Pro ověření byl použit jako forward LP primer a P3196 jako reverse primer. Očekávaná velikost PCR fragmentu pro „wild type“ verzi *plda-1-1* genu byla 870 bp (Obr 12).



Obr. 12 Snímek agarosového gelu z horizontální elektroforézy. Ověření *plda-1-1* mutantních rostlin *Arabidopsis thaliana* na přítomnost fúzního proteinu PLD α 1-YFP v T1 generaci. L-ladder, 1-9 selektované rostliny v T1 generaci, 10 – *plda-1-1* mutant, 11 – Col-0, NC – negativní kontrola.

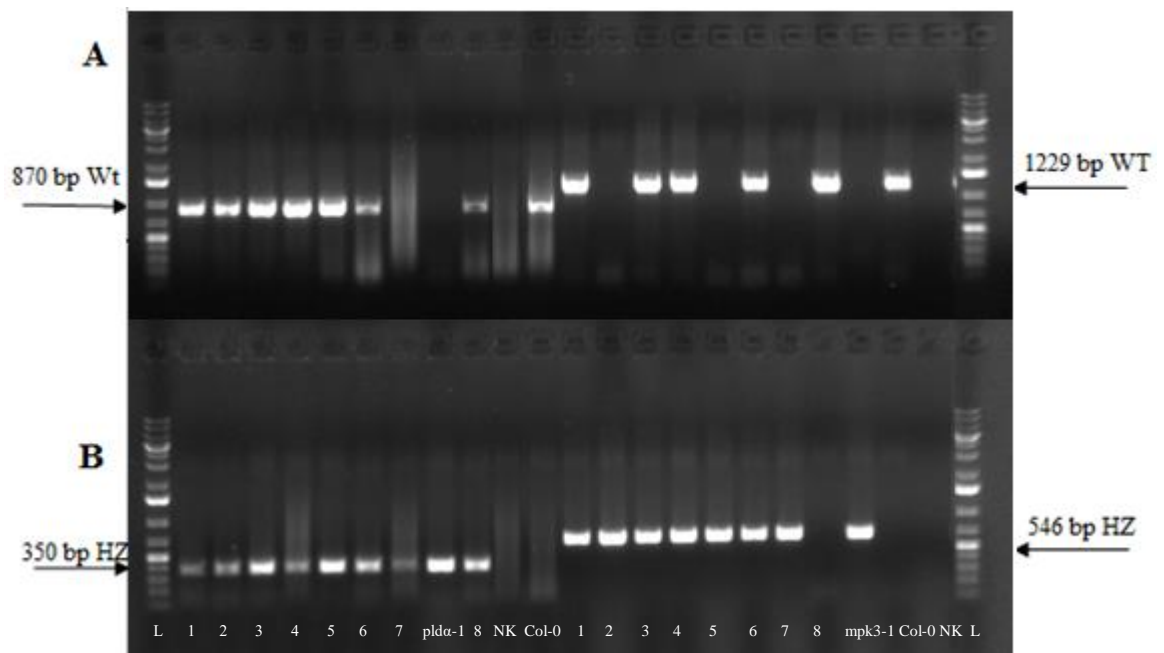
U žádných z devíti vyselektovaných rostlin v T1 generaci nebyla pomocí PCR potvrzena přítomnost *proPLD α 1::PLD α 1:YFP* konstruktů s mutací S481A. Jelikož nebyly získány transgenní rostliny v T1 generaci, nebylo možné dále pokračovat v experimentální části za účelem získání T2 generace komplementovaných v *plda-1-1* genu s vnesenou mutací.

Druhá část práce byla zaměřena na selekci a následně i potvrzení dvojitých mutantů v genech *plda-1-1* a *mpk3-1* u *Arabidopsis thaliana*. Výsledky těchto analýz nám poslouží při hledání odpovědi na otázky, co se stane, když se v rostlině vypnou geny zodpovědné za syntézu proteinů, PLD α -1 a MPK3, které jsou ve vzájemné interakci a přerušují se tím část signálních drah v buňce. Selektce F2 homozygotní linie *plda1-1/mpk3-1* dvojitých mutantů byla provedena pomocí sérií PCR reakcí. Potvrzení vybrané homozygotní linie byla provedena u F4 potomstva pomocí imunoblotové analýzy s protilátkami proti PLD α -1 a MPK3 proteinu.

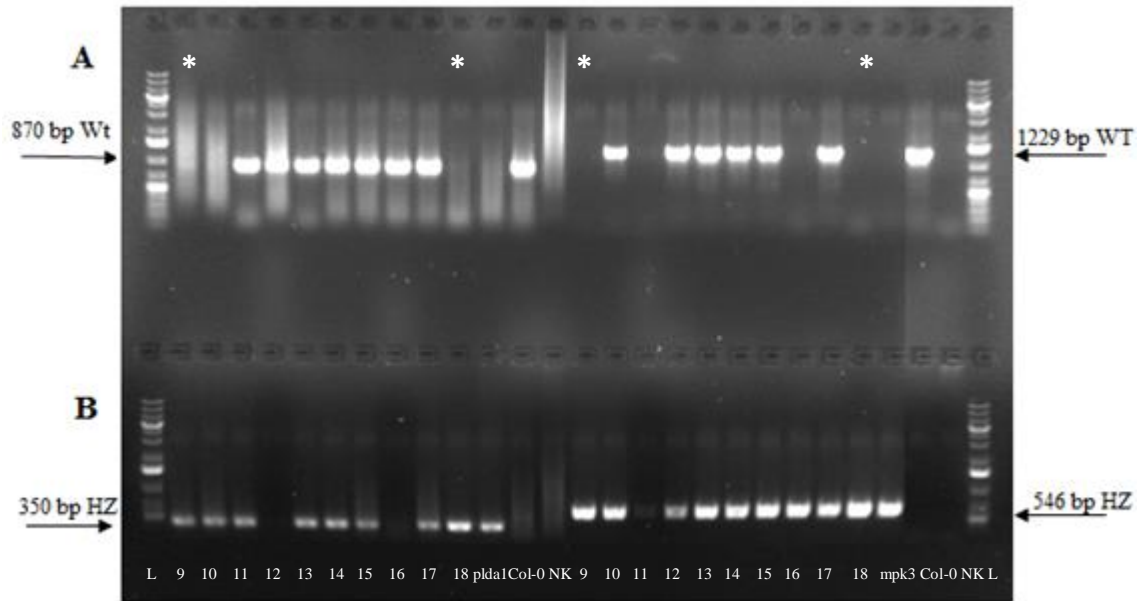
4.3 Genotypizace rostlin dvojitých mutantů v genech *plda-1-1/mpk3-1* v T2 generaci

Genotypizace *plda-1-1/mpk3-1* dvojitých mutantů z *Arabidopsis thaliana* pomocí PCR byla provedena s již připravenými semeny v F2 generaci. Jako kontrola přítomnosti T-DNA inzertu v *plda-1-1* genu u testovaných rostlin byla použita v PCR reakci DNA z *plda-1-1* mutantní rostliny. Podobně jako kontrola přítomnosti T-DNA inzertu v *mpk3-1* genu u testovaných rostlin byla použita DNA z *mpk3-1* mutantní rostliny. Jako kontrola pro přítomnost *plda-1-1* a *mpk3-1* genu u rostlin byla použita DNA z Col-0 rostliny divokého typu u obou typů reakcí. Jako negativní kontrola pro správnost pipetování a pro průběh PCR reakce byla použita v obou reakcích dH₂O. Pomocí primerů LP a RP byl amplifikován úsek nemutovaného genu *mpk3-1* a úsek obsahující T-DNA inzerci v *mpk3-1* genu byl amplifikován pomocí primerů LBb1.3 a RP. Podobně pro amplifikaci úseku divokého typu *plda-1-1* genu byly použity primery LP a P3196 a pro zmnožení úseku obsahujícího T-DNA inzerci v *plda-1-1* genu byly použity primery LBb1.3 a P3196. Výsledky PCR analýz byly zaznamenány pomocí agarosové elektroforézy a jsou zobrazeny na Obr. 13, 14 a 15. Na Obr. 13 a 14 je zaznamenán záznam, kde bylo otestováno 18 rostlin v F2 generaci, z nichž většina byla v heterozygotním stavu. V případě *plda-1-1* genu byla ve všech rostlinách pozorována přítomnost pásu o velikosti 870 bp pro divoký typ *plda-1-1* genu a rovněž pásu o velikosti 350 bp pro T-DNA inzerci v *plda-1-1* genu. Podobně pro *mpk3-1* gen byla současně pozorována přítomnost pásu o velikosti 1229 bp pro divoký typ *mpk3-1* genu a pásu o velikosti 546 bp pro T-DNA inzerci v *mpk3-1* genu. Opakovanou genotypizací se podařilo najít 2 homozygotní rostliny (rostlina č. 9 a č. 18). Pro ověření homozygotního stavu rostliny č. 18 se provedla další PCR analýza a její výsledek je

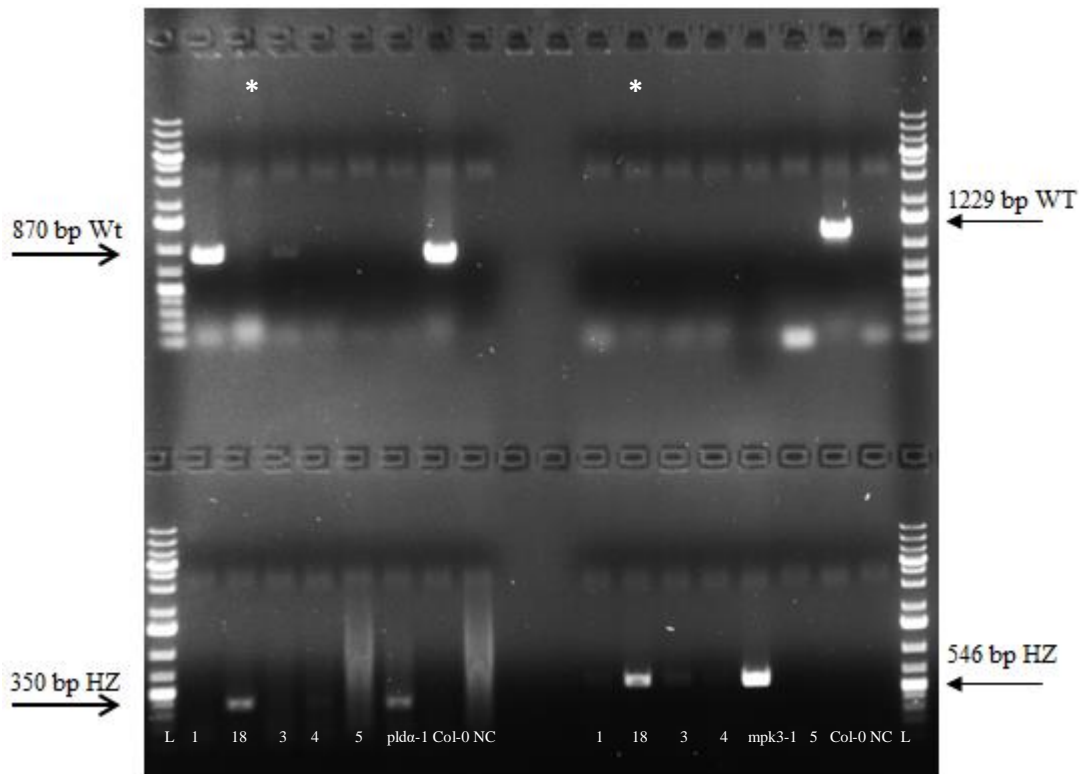
znázorněn na obr. 15. Tu se potvrdila přítomnost T-DNA inzertu jak v *plda-1-1* tak i v *mpk3-1* genu a nepřítomnost pásu pro divoký typ *plda-1-1* i *mpk3-1* genu (obr. 15). Pomocí PCR analýz se podařilo vyselektovat dvě homozygótní rostliny v *plda-1-1* a v *mpk3-1* genu v F2 generaci. Obě vyselektované rostliny (č. 9 a č. 18) se dále rozmnožili do F3 a v případě rostliny č. 18 do F4 generace.



Obr. 13 Snímek agarosového gelu z horizontální elektroforézy. Genotypizace mutantních rostlin v genech *plda-1-1* a *mpk3-1* u *Arabidopsis thaliana*. **A** Výsledky PCR reakce se sadou primerů pro divoký typ genů *plda-1-1* a *mpk3-1* inzerci; L-ladder; genotypované rostliny 1-8; *plda-1-1* – jednoduchý *plda-1-1* mutant; *mpk3-1* – jednoduchý *mpk3-1* mutant; Col-0 divoký typ; NK (negativní kontrola, voda). **B** Výsledky PCR reakce se sadou primerů pro T-DNA inzerci u genů *plda-1-1* a *mpk3-1*; genotypované rostliny 1-8; *plda-1-1* – jednoduchý *plda-1-1* mutant; *mpk3-1* – jednoduchý *mpk3-1* mutant; Col-0 – divoký typ; NK (negativní kontrola, voda). Vybraná homozygotní rostlina je označena bílou hvězdičkou.



Obr. 14 Snímek agarosového gelu z horizontální elektroforézy. Genotypizace mutantních rostlin v genech *plda-1-1* a *mpk3-1* u *Arabidopsis thaliana*. **A** Výsledky PCR reakce se sadou primerů pro divoký typ genů *plda-1-1* a *mpk3-1* inzerce. L-ladder; genotypované rostliny 9-18; *plda-1-1* – jednoduchý *plda-1-1* mutant; *mpk3-1* – jednoduchý *mpk3-1* mutant; Col-0 – divoký typ; NK (negativní kontrola, voda). **B** Výsledky PCR reakce se sadou primerů pro T-DNA inzerce u genů *plda-1-1* a *mpk3-1*, genotypované rostliny 9-18; *plda-1-1* – jednoduchý *plda-1-1* mutant, *mpk3-1* – jednoduchý *mpk3-1* mutant; Col-0 – divoký typ; NK (negativní kontrola, voda). Vybraná homozygotní rostlina je označena bílou hvězdičkou.



Obr. 15 Snímek agarosového gelu z horizontální elektroforézy. Genotypizace mutantních rostlin v genech *plda-1-1* a *mpk3-1* u *Arabidopsis thaliana*. **A** Výsledky PCR reakce se sadou primerů pro divoký typ genů *plda-1-1* a *mpk3-1* inzerce. L-ladder; genotypované rostliny -1, 18, 3, 4, 5;

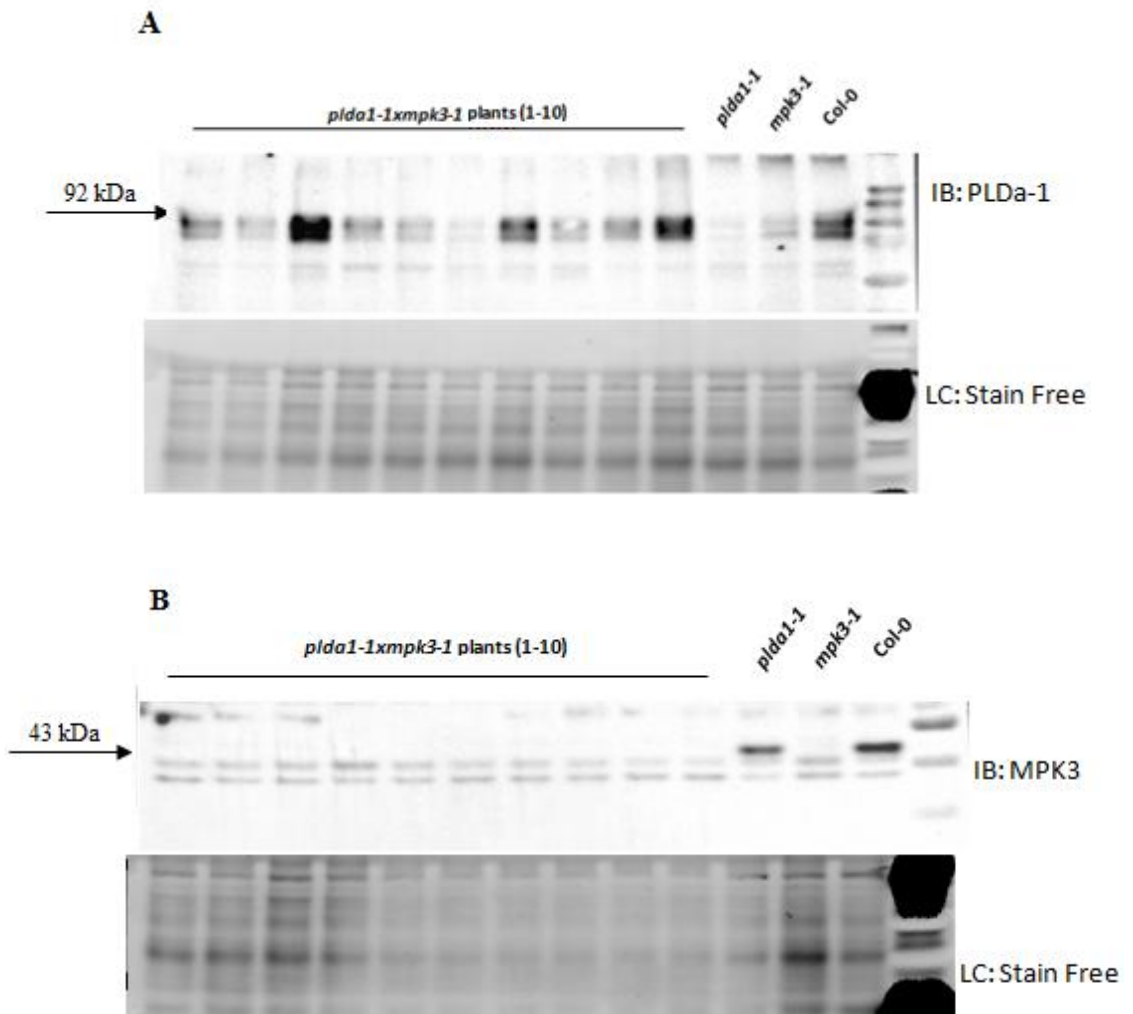
plda -1-1 – jednoduchý *plda-1-1* mutant, *mpk3-1* – jednoduchý *mpk3-1* mutant; Col-0 – divoký typ; NK (negativní kontrola, voda). **B** Výsledky PCR reakce se sadou primerů pro T-DNA inzerci u genů *plda -1-1* a *mpk3-1*, genotypované rostliny 1, 18, 3, 4, 5; *plda -1-1* – jednoduchý *plda -1-1* mutant, *mpk3-1* – jednoduchý *mpk3-1* mutant; Col-0 – divoký typ; NK (negativní kontrola, voda). Vybraná homozygotní rostlina je označena bílou hvězdičkou.

4.4 Ověření nepřítomnosti PLD α -1 a MPK3 proteinů v mutantních rostlinách

***plda-1-1/mpk3-1* pomocí imunoblotové analýzy**

Po získání F2 rostlin č. 8 a č. 18 homozygotních v *plda-1-1* a *mpk3-1* genech vznikla otázka ověření přítomnosti resp. nepřítomnosti PLD α -1 a MPK3 proteinu ve vybraných homozygotních rostlinách. Vzhledem k nedostatku semen v F2 generaci vybrané *plda-1-1/mpk3-1* homozygotní rostliny (č. 18) byla tato generace dále rozmnožena, přičemž v F3 generaci bylo vybráno 10 *plda-1-1/mpk3-1* mutantních rostlin a z jejich potomstva byla v F4 generaci provedena imunoblotová analýza za použití anti-*plda-1/2* a anti-*mpk3* primárních protilátek. Na samotnou imunoblotovou analýzu byly použity 14 dnů staré semenáčky v F4 generaci *plda-1-1/mpk3-1* dvojitých mutantů. Jako kontrola pro absenci PLD α -1 a MPK3 proteinů byly použity 14 dnů staré semenáčky jednoduchých *plda-1-1* a *mpk3-1* mutantních rostlin. Jako kontrola pro přítomnost obou proteinů byly opět použity 14 dnů staré semenáčky rostliny divokého typu Col-0. Všechny analyzované rostliny byly před homogenizací rozděleny na kořenovou a nadzemní část analyzované rostliny.

Proteiny ze všech analyzovaných vzorků byly extrahovány extrakčním roztokem podle protokolů a následně byla proteinová směs separována SDS-PAGE elektroforézou a proteiny byly přeneseny na PVDF membránu. Membrána byla inkubována s primárními protilátkami proti PLD α -1 a MPK3 proteinům a následně díky sekundární protilátce s křenovou peroxidásou byl získán chemiluminiscenční signál, který byl zdokumentován v přístroji ChemiDocTM. Obrázky detekovaných proteinů na membránách ve vzorcích jsou znázorněny na Obr. 16 a 17.



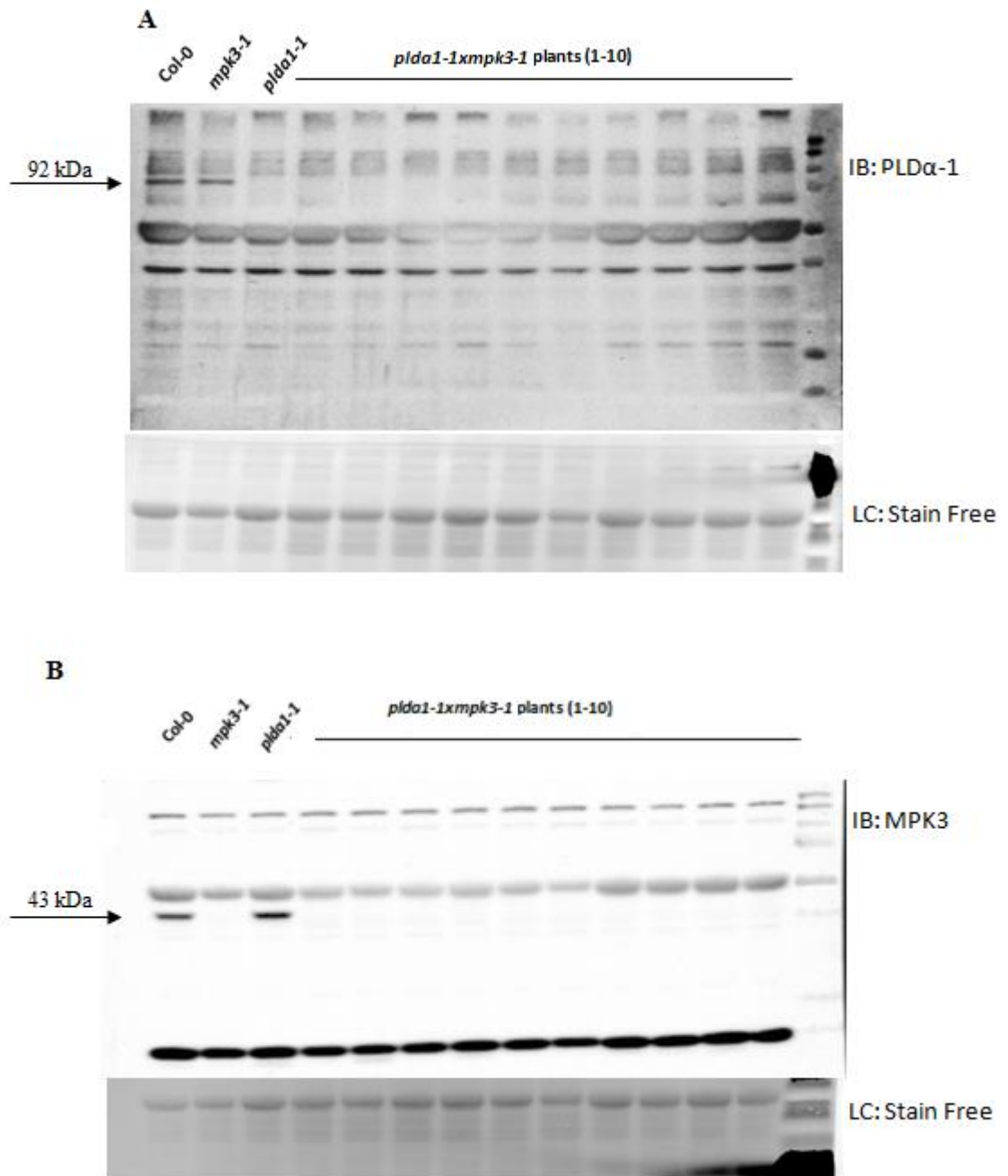
Obr. 16 Detekce PLD α -1 a MPK3 proteinů u vybraných *plda1-1/mpk3-1* mutantních rostlin *Arabidopsis thaliana* na vzorcích z kořenové části rostlin.

A IB: membrána inkubována s primární protilátkou proti PLD α -1 proteinu. Šipka naznačuje oblast s molekulovou hmotností PLD α -1 proteinu ve vzorcích (rostliny 1-10).

LC: kontrola nanášení stejného množství proteinů na gel. Membrána byla detekována technologií StainFree (BioRad, USA).

B IB: membrána inkubovaná s primární protilátkou proti MPK3 proteinu. Šipka naznačuje oblast s molekulovou hmotností MPK3 proteinu ve vzorcích (rostliny 1-10).

LC: kontrola nanášení stejného množství proteinů na gel. Membrána detekována technologií StainFree (BioRad, USA).



Obr. 17 Detekce PLD α -1 a MPK3 proteinů u vybraných *pldα-1-1/mpk3-1* mutantních rostlin *Arabidopsis thaliana* na vzorcích z listové části rostlin.

A IB: membrána inkubována s primární protilátkou proti PLD α -1 proteinu. Šipka naznačuje oblast s molekulovou hmotností PLD α -1 proteinu ve vzorcích (rostliny 1-10).

LC: kontrola nanášení stejného množství proteinů na gel. Membrána byla detekována technologií StainFree (BioRad, USA).

B IB: membrána inkubována s primární protilátkou proti MPK3 proteinu. Šipka naznačuje oblast s molekulovou hmotností MPK3 proteinu ve vzorcích (rostliny 1-10)

LC: kontrola nanášení stejného množství proteinů na gel. Membrána byla detekována technologií StainFree (BioRad, USA).

V případě PLD α -1 proteinu za použití anti-pld α -1/2 primární protilátky byl u kontrolních rostlin, v tomto případě jednoduchých *mpk3-1* mutantů a Col-0 rostlin, očekáván pás s molekulovou hmotností přibližně 92kDa, přičemž pás s toutle molekulovou hmotností by měl chybět právě u rostlin *plda-1-1/mpk3-1* dvojitých mutantů. Podobně v případě MPK3 proteinu za použití anti-mpk3 primární protilátky byl u kontrolních rostlin, jednoduchých *plda-1-1* mutantů a Col-0 rostlin, očekáván pás s molekulovou hmotností přibližně 43kDa, který by měl chybět právě u rostlin *plda-1-1/mpk3-1* dvojitých mutantů. Jak už bylo zmíněno, byla zvlášť analyzována kořenová a zvlášť nadzemní část zmíněných rostlin (Obr. 16 a 17). Při analýze vzorků s anti-mpk3 primární protilátkou byl jak u kořenů, tak u nadzemní části rostlin získán stejný výsledek, kdy nebyla zaznamenána přítomnost MPK3 proteinu v 10 vybraných proteinových vzorcích z rostlin *plda-1-1/mpk3-1* dvojitých mutantů v F4 generaci a v *mpk3-1* jednoduchém mutantu. Naopak byla detekována přítomnost MPK3 proteinu ve vzorcích jednoduchých *plda-1-1* mutantů a Col-0 rostlin (Obr. 16 a 17). Avšak při analýze vzorků s anti-pld α -1/2 primární protilátkou u kořenů byla zaznamenána v oblasti molekulové hmotnosti PLD α -1 proteinu (přibližně 92 kDa) přítomnost dvou neostrých pásů jak u vzorků z kontrolních rostlin, jednoduchých *mpk3-1* mutantů a Col-0 rostlin, tak u vzorků z rostlin *plda-1-1/mpk3-1* dvojitých mutantů (Obr. 16A). I po několika opakováních nebylo možno získat jednoznačné výsledky z analýzy kořenové části rostlin pomocí imunoblotové analýzy za použití anti-pld α -1/2 primární protilátky, proto byla další práce zaměřena na analýzu nadzemní části rostlin. Při analýze nadzemní části z rostlin *plda-1-1/mpk3-1* dvojitých mutantů, jejich zodpovídajících jednoduchých mutantů i Col-0 rostlin byly získány výsledky uvedené na Obr. 17. V deseti vybraných proteinových vzorcích z nadzemní části rostlin *plda-1-1/mpk3-1* dvojitých mutantů v F4 generaci, stejných jako při analýze s anti-mpk3 primární protilátkou, nebyla zaznamenána přítomnost PLD α -1 proteinu podobně i u vzorků jednoduchých *plda-1-1* mutantů. Naopak přítomnost PLD α -1 proteinu byla detekována u proteinových vzorků jednoduchých *mpk3-1* mutantů a u rostlin divokého typu Col-0. Imunoblotovou analýzou byla potvrzena absence PLD α -1 a MPK3 proteinů ve vzorcích F4 generace rostliny č. 18 *plda-1-1/mpk3-1* dvojitých mutantů. Tím se otevřela možnost analýz získaného dvojitého mutantu.

5. ZÁVĚR

V této práci byly v teoretické části popsány druhy fosfolipas, podrobněji především fosfolipasa D alfa 1. Dále byly vysvětleny možnosti transformace rostlin a konkrétně byla objasněna metoda floral dip využitá v experimentální části. V další části literárního přehledu byla popsána MAPK kaskáda a zejména MPK3 protein.

Experimentální část byla zaměřena na přípravu transgenních *plda-1-1* rostlin *Arabidopsis thaliana* s konstruktem *proPLD α 1::PLD α 1:YFP* s vnesenou mutací S481A pomocí *Agrobacterium tumefaciens*. Konstrukt byl vpraven do rostlin metodou floral dip a po sklizení semen proběhla selekce T1 generace pomocí herbicidu fosfintocinu. Pro potvrzení přítomnosti konstruktů bylo provedeno rozsáhlé genotypování. Z výsledků je patrné, že žádná z vyselektovaných rostlin neobsahovala požadovaný konstrukt *proPLD α 1::PLD α 1:YFP* s vnesenou mutací S481A. Domníváme se, že chyba mohla nastat při transformaci zmíněného konstruktů z *Escherichia coli* do *Agrobacterium tumefaciens*. Daná metoda byla několikrát opakována, nicméně ani po opakováních se nepodařilo vyselektovat rostliny v T1 generaci obsahující daný konstrukt. Rostliny se tudíž nepodařily dopěstovat do T2 generace komplementovaných v *plda-1-1* genu.

Druhá část práce byla zaměřena na genotypizaci dvojitých mutantů *plda-1-1/mpk3-1* v již připravené F2 generaci. Podařilo se získat 2 homozygotní rostliny (č. 9 a č. 18) v *plda-1-1* a *mpk3-1* genech. K ověření, zda rostliny obsahují nebo neobsahují PLD α -1 a MPK3 proteiny mělo dojít za pomoci imunoblotové analýzy. Vzhledem k tomu, že rostliny v F2 generaci měly málo semen, byla vybrána jedna homozygotní rostlina (č. 18) a ta dále rozmnožena do F3 a F4 generace. V F3 generaci bylo vybráno 10 *plda-1-1/mpk3-1* mutantních rostlin a z jejich potomstva v F4 generaci byla provedena zmíněná imunoblotová analýza za použití anti-pld α -1/2 a anti-mpk3 primárních protilátek. Imunoblotová analýza byla nejdříve provedena na kořenové části rostliny, ale vzhledem k nejasným výsledkům z analýzy kořenové části rostlin byla další práce zaměřena na analýzu nadzemní části rostlin. Výsledky ukázaly, že v ověřovaných rostlinách se nenachází proteiny PLD α -1 a MPK3 a rostliny bylo možné potvrdit jako skutečně homozygotní v genech *plda-1-1/mpk3-1*. Tyto rostliny budou využity pro studium fenotypových analýz ve srovnání s jednoduchými *plda-1-1* a *mpk3-1* mutantními rostlinami.

6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Andreeva Z., Ho A.Y.Y., Barthet M.M., Potocký M., Bezvoda R., Žárský V., Marc J. (2009): Phospholipase D family interactions with the cytoskeleton: isoform δ promotes plasma membrane anchoring of cortical microtubules. *Functional Plant Biology* **36**: 600-612.
- Bargmann B.O., Laxalt A.M., ter Riet B., van Schooten B., Merquiol E., Testerink C., Haring M.A., Bartels D., Munnik T. (2009): Multiple PLDs required for high salinity and water deficit tolerance in plants. *Plant Cell Physiology* **50**, 78-89.
- Bent A.F.(2000): *Arabidopsis* in Planta Transformation. Uses, Mechanisms, and Prospects for Transformation of Other Species. *Plant Physiology* **124**,1540-1547.
- Canonne J., Froidure-Nicolas S., Rivas S. (2011): Phospholipases in action during plant defense signaling. *Plant Signaling&Behavior* **6**,13-18.
- Cantley L. (2013): Principles of Cell Signaling. In:*Seldin and Giebisch's The Kidney*, vol. 5 (Alpern R., Caplan M., Moe O.),Elsevier, New York, U.S.A.,369-403.
- Colcombert J., Hirt H. (2008): *Arabidopsis* MAPKs: a komplex signalling involved in multiple biological processes. *The Biochemical journal* **413**,217-226.
- Devaiah, S. P., Pan, X., Hong, Y., Roth, M., Welti, R. and Wang, X. (2007): Enhancing seed quality and viability by suppressing phospholipase D in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, **50**,950–957.
- Droillard M., Boudsocq M., Barbier-Brygoo H., Laurière C. (2002): Different protein kinase families are activated by osmotic stresses in *Arabidopsis thaliana* cell suspensions. Involvement of the MAP kinases AtMPK3 and AtMPK6. *FEBS Letters* **527**, 43-50.
- Duke S.O., Powles S.B. (2008): Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest management Science* **64**, 319-25.
- Dyer JH, Ryu SB, Wang X (1994): Multiple Forms of Phospholipase D following Germination and during Leaf Development of Castor Bean.*Plant physiology***105**, 715-724.
- Eliáš M, Potocký M, Cvrčková F, Žárský V (2002): Molecular diversity of phospholipase D in angiosperms. *BMC Genomics* **3**, 2.
<https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-3-2>.
- Fan L., Zheng S., Wang X. (1997): Antisense suppression of phospholipase D alpha retards abscisic acid- and ethylene-promoted senescence of postharvest *Arabidopsis* leaves. *The Plant Cell* **9**, 2183-96.
- Fan I., Zheng S., Cui D., Wang X. (1999): Subcellular distribution and tissue expression of phospholipase D α , D β and D γ in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **119**, 1371-8.
<http://www.plantphysiol.org/content/119/4/1371>.
- Gao F., Su Q., Fan Y., Wang L. (2010): Expression pattern and core region analysis of AtMPK3 promoter in response to environmental stresses. *Science China Life Sciences* **53**, 1315–1321.
- Guo M., Bian X., Wu X., Wu M. (2011): *Agrobacterium*-Mediated Genetic Transformation: History and Progress, Genetic Transformation María Alvarez, IntechOpen.
<https://www.intechopen.com/books/genetic-transformation/agrobacterium-mediated-genetic-transformation-history-and-progress>.
- Guo L., Mishra G., Markham J.E., Li M., Tawfall A., Welti R., Wang X. (2012): Connections between sphingosine kinase and phospholipase D in the abscisic acid signaling pathway in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **287**, 8286-96
- Hamel L.P., Nicole M.C., Sritubtim S., Morency M.J., Ellis M., Ehltling J., Beaudoin N., Barbazuk B., Klessig D., Lee J., Martin G., Mundy J., Ohashi Y., Scheel D., Sheen J., Xing T., Zhang S., Seguin A., Ellis B.E. (2006): Ancient signals: comparative genomics of plant MAPK and MAPKK gene families. *Trends in Plant Science* **11**, 192-198.
- Hammond S.M., Altshuller Y.M., Sung T.C., Rudge S.A., Rose K., Engebrecht J., Morris A.J., Frohman M.A. (1995): Human ADP-ribosylation factor-activated phosphatidylcholine-specific phospholipase D defines a new and highly conserved gene family. *The Journal of biological chemistry* **270**, 29640-3.

- Hanahan D.J., Chaikoff I.L. (1947): A new phospholipide-splitting enzyme specific for the ester linkage between the nitrogenous base and the phosphoric acid grouping. *The Journal of biological chemistry* **169**:699-705.
- Ho A.Y.Y., Day D.A., Brown M.H., Marc J. (2009): *Arabidopsis* phospholipase D δ as an initiator of cytoskeleton-mediated signalling to fundamental cellular processes. *Functional Plant Biology*. **36**: 190-198.
- Hong Y., Pan X., Welti R., Wang X. (2008): Phospholipase D α 3 is involved in the hyperosmotic response in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **20**, 803-16.
- Hong Y., Deviah S.P., Bahn S.C., Thamasandra B.N., Li M., Welti R., Wang X. (2009): Phospholipase D ϵ and phosphatidic acid enhance *Arabidopsis* nitrogen signaling and growth. *The Plant journal: for cell and molecular biology* **58**, 376-87.
- Hong Y., Zhao J., Guo L., Kim S.C., Deng X., Wang G., Zhang G., Li M., Wang X. (2016): Plant phospholipases D and C and their diverse functions in stress responses. *Progress in Lipid Research* **62**, 55-74.
- Cheong Y.H., Kim M.C. (2010): Functions of MAPK cascade pathways in Plant Defense Signaling. *Journal of Plant Pathology* **26**, 101-109.
- Ichimura, K., Shinozaki, K., Tena, G., Sheen, J., Henry, Y., Champion, A., Kreis, M., Zhang, S., Hirt, H., Wilson, C., Heberle-Bors, E., Ellis, B.E., Morris, P.C., Innes, R.W., Ecker, J.R., Scheel, D., Klessig, D.F., Machida, Y., Mundy, J., Ohashi, Y., Walker, J.C. (2002): Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: A new nomenclature. *Trends in Plant Science* **7**, 301-308.
- Investigations in Molecular Cell Biology: <http://capricorn.bc.edu/wp/pathways/protein-expression/western-blot/western-blot-exercises/> (3. 3. 2018)
- Kolesnikov Y.S., Nokhrina K.P., Kretynin S.V., Volotovskii I.D., Martinec J., Romanov G. A., Kravets V.S. (2012): Molecular structure of phospholipase D and regulatory mechanisms of its activity in plant and animal cells. *Biochemistry* **77**, 1-14.
- Koonin E.V. (1996): A duplicated catalytic motif in a new superfamily of phosphohydrolases and phospholipid synthases that includes poxvirus envelope proteins. *Trends in biochemical sciences* **21**, 242-3.
- Koornneef M., Meinke D. (2010): The development of *Arabidopsis* as a model plant. *The Plant journal: for cell and molecular biology* **61**, 909-921.
- Kovtun Y., Chiu W.L., Tena G., Sheen J. (2000): Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **97**, 2940-2945.
- Kunkel T., Niu Q.W., Chan Y.S., Chua N.H. (1999): Inducible isopentenyl transferase as a high-efficiency marker for plant transformation. *Nature biotechnology* **17**, 919-9.
- Labguide: <http://labguide.cz/metody/klonovani/> (5.10.2017)
- Li M., Hong, Y., Wang, X. (2009) Phospholipase D and phosphatidic acid mediated signaling in plants. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1791**, 927-935.
- Lu C., Han M.H., Guavara-Garcia A., Fedoroff N.V. (2002): Mitogen-activated protein kinase signalling in postgermination arrest of development by abscisic acid. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **99**, 15812-7.
- McDermott M., Wakelam M.J., Morris A.J. (2004): Phospholipase D. *Biochemistry and cell biology* **82**, 225-53.
- Mendelova univerzita v Brně:
http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=1485&typ=html
 (20.2.2018).
- Miki B., McHugh S. (2004) Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. *Journal of biotechnology* **107**, 193-232.
- Mishra G., Zhang W., Deng F., Zhao J., Wang X. (2006): A bifurcating pathway directs abscisic acid effects on stomatal closure and opening in *Arabidopsis*. *Science* **312**, 264-6.
- Mizoguchi T., Irie K., Hirayama T., Hayashida N., Yamauchi-Shinozaki K., Matsumoto K., Shinozaki K. (1996): A gene encoding a mitogen-activated protein kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold, and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of*

- the National Academy of Science of the United States of America* **93**, 765-769.
- Mol Bio And Biotech: <https://molbioandbiotech.wordpress.com/2007/08/31/ti-plasmid-contd/> (5.10.2017).
- Novák D., Vadovič P., Ovečka M., Šamajová O., Komis G., Colcombert J., Šamaj J. (2018): Gene Expression Pattern and Protein Localization of Arabidopsis Phospholipase D Alpha 1 Revealed by Advanced Light-Sheet and Super-Resolution Microscopy. *Frontiers in plant science* **21**, 9-371.
- OECD (1999): Consensus Document on General Information Concerning the Genes and their Enzymes which Confer Tolerance to Phosphinothricin Herbicides. Serie on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No.11. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France, 26 stran.
- Pappan K., Qin W., Dyer J.H., Zheng L., Wang X. (1997): Molecular cloning and functional analysis of polyphosphoinositide-dependent phospholipase D, PLDbeta, from *Arabidopsis*. *The Journal of biological chemistry* **272**, 7055-61.
- Patent Lens: <http://www.bios.net/daisy/AgroTran/g1/850.html> (20.11.2017).
- Pawlowski W.P., Somers D.A. (1996): Transgene inheritance in plants genetically engineered by microprojectile bombardement. *Molecular Biotechnology* **6**, 17-30. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02762320>
- Pearson G., Robinson F., Beers Gibson T., Xu B.E., Karandikar M., Berman K. Cobb M.H. (2001): Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine reviews* **22**, 153-83.
- Qin C., Wang C., Wang X. (2002): Kinetic analysis of *Arabidopsis* phospholipase Dδ. Substrate preference and mechanism of activation by Ca²⁺ and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *The Journal of biological chemistry* **277**, 49685-90.
- Qin C, Wang X (2002): The *Arabidopsis* phospholipase D family: characterization of a Ca²⁺-independent and phosphatidylcholine-selective PLDζ1 with distinct regulatory domains. *Plant Physiology* **128**, 1057–1068.
- Ramrakhiani L., Chand S. (2011): Recent Progress on Phospholipases: Different Sources, Assay Methods, Industrial Potential and Pathogenicity. *Applied biochemistry and Biotechnology* **164**, 991-1022.
- Richmond G.S., Smith T.K. (2011): Phospholipases A1. *International Journal of Molecular Sciences* **12**, 588-612. <http://www.mdpi.com/1422-0067/12/1/588>
- Saito K. (2014): Reminiscence of phospholipase B in *Penicillium notatum*. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences* **90**, 333-46.
- Sheen J., Fu J., Ma J., Wang X., Gao C., Zhuang C., Wan J., Jiang L. (2014): Isolation, culture, and transient transformation of plant protoplasts. *Current protocols in cell biology* **63**, 2.8.1-17.
- Schaloske R.H., Dennis E.A. (2006): The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. *Biochemica et biophysica acta* **1761**, 1246-59.
- Šamajová O., Komis G., Šamaj J. (2013): Emerging topics in the cell biology of mitogen-activated protein kinases. *Trends in plant science* **18**, 140-8.
- The Arabidopsis Initiative (2000): Analysis of the genome semence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796-815.
- Tzfira T., Citovsky V. (2006): *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* **17**, 147-154.
- Vikram M., Koiwa H. (2009): Glyphosate resistance as a versatile selection marker for *Arabidopsis* transformation. *Plant Molecular Biology Reporter* **27**, 132-138.
- Wang X. (2000): Multiple forms of phospholipase D in plants: the gene family, catalytic and regulatory properties, and cellular functions. *Progress in Lipid Research* **39**, 109-149.
- Wang X., Deviah S.P. Zhang W. Welti R. (2006): Signaling functions of phosphatidic acid. *Progress in lipid research* **45**, 250-78.
- Wang W.; Xia H.; Yang X., Xu T., Si H.J., Cai X.X., Wang F., Su J., snow A.A., Lu B.R. (2014): A novel 5-enolpyruvylshikimate-3- phosphate (EPSP) synthase transgene for glyphosate resistance stimulates growth and fecundity in weedy rice (*Oryza sativa*) without herbicide. *The New phytologist* **202**, 679-88.

- Xu J., Zhang S. (2015): Mitogen-activated protein kinase cascades in signaling plant growth and development. *Trends in Plant Science* **20**,56-64.
- Yamaryo Y., Dubots E., Albrieux C., Baldan B., Block M.A. (2008): Phosphate availability affects the tonoplast localization of PLD ζ 2, an *Arabidopsis thaliana* phospholipase D. *FEBS Letters* **582**, 685-90. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00274758/dokument>
- Yu L., Nie J., Cao C., Jin Y., Yan M., Wang F., Liu J., Xiao Y., Liang Y., Zhang W. (2010): Phosphatidic acid mediates salt stress response by regulation of MPK6 in *Arabidopsis thaliana*. *The New phytologist* **188**, 762-73.
- Zhang, W., Qin, C., Zhao, J., Wang, X. (2004): Phospholipase D α 1-derived phosphatidic acid interacts with ABI1 phosphatase 2C and regulates abscisic acid signaling. *Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America* **101**,9508–9513.
- Zhang T., Ichimura K., Mizoguchi T., Shinozaki K. (2006): *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nature protocols* **1**, 641-646.
- Zhang Y., Zhu H., Zhang Q., Li M., Yan M., Wang R., Wang L., Welti R., Zhang W., Wang X.(2009): Phospholipase D α 1 and phosphatidic acid regulate NADPH oxidase activity and production of reactive oxygen species in ABA-mediated stomatal closure in *Arabidopsis*. *The Plant cell* **21**, 2357-77.
- Zhang Y., Yu L.C. (2008): Single-cell microinjection technology in cell biology. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **30**, 606-10.
- Zhang Q., Lin F., Mao T., Nie J., Yan M., Yuan M., Zhang W. (2012): Phosphatidic acid regulates microtubule organization by interacting with MAP65-1 in response to salt stress in *Arabidopsis*. *The Plant cell* **24**, 4555-76.
- Zhao J., Wang X. (2004): *Arabidopsis* phospholipase D α 1 interacts with the heterotrimeric G-protein α -subunit through a motif analogous to the DRY motif in G-protein-coupled receptors. *The Journal of biological chemistry* **279**, 1794-800.
- Zheng I., Krishnamoorthi R., Zolkiewski M., Wang X. (2000): Distinct Ca²⁺ binding properties of novel C2 domains of plant phospholipase D α and β . *The Journal of biological Chemistry* **275**, 19700-6.
- Zheng I., Shan J., Krishnamoorthi R., Wang X. (2002): Activation of plant phospholipase D β by phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate: Characterization of binding site and mode of action. *Biochemistry* **41**, 4546-53. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi0158775>

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

PLA1 – fosfolipasa A1

PLA2 – fosfolipasa A2

sPLA₂ – sekreční fosfolipasa A2

cPLA₂ – cytosolická fosfolipasa A2

PLB – fosfolipasa B

PLC – fosfolipasa C

PIP₂ - fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát

IP₃ – inositol-1,4,5-trifosfát

PI4P – fosfatidylinositol-4-fosfát

PI – fosfatidylinositol

PLD – fosfolipasa D

PLD1 – fosfolipasa D1

PLD2 – fosfolipasa D2

RaI – Ras-like GTPasa

PC – fosfatidylcholin

PIP – fosfatidylinositolfosfát

PE – fosfatidylethanolamin

PA – kyseliny fosfatidová

PH – plekstrin homologní doména

PX – phot homologní doména

PG – fosfatidylglycerol

PLD α -1 – fosfolipasa D alfa 1

ABA – kyselina abscisová

ABI1 – Abelson-interactor 1

GAPCs - glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasa

MPK6 – mitogen-aktivovaná protein kinasa 6

Ti plazmid – tumor-indukující plazmid

Vir geny – geny podílející se na virulenci při transformaci pomocí *A.tumefaciens*

nptII – gen neomycin fosfotransferasa

aphIV – gen hygromycin fosfotransferasa

manA – kóduje fosfomanosovou izomerazu

ipt – isopentyl transferasa

EPSP – enzym 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfát syntéza

gat – glyfosát acetyltransferasa

PPT – fisfinotricin

Bar – gen bialaphos resistance

MAPK – mitogen-aktivované proteinkinasy

MAPKK – mitogen-aktivovaná proteinkinasa kinasa

MAPKKK – mitogen-aktivovaná proteinkinasa kinasa kinasa

MPK3 – mitogen-aktivovaná proteinkinasa 3

MPK6 – mitogen-aktivovaná proteinkinasa 6

MS médium – Murashige and Skoog médium

Rpm – revolutions per minute (otáčky za minutu)