

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Charakterizace SIMKK a PRKK proteinů u vojtěšky  
*Medicago sativa*

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	<b>Anna Malíšková</b>
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. Ivan Luptovčíak, Ph.D.</b>
Rok:	2021

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval/a 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. Byl/a jsem seznámen/a 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 .....

## Poděkování

Ráda bych poděkovala hlavně vedoucímu mé bakalářské práce, panu Mgr. Ivanu Luptovčiakovi, Ph.D. za odborné vedení, čas a užitečné rady při zpracování této práce a za poskytnutí materiálů pro zpracování bakalářské práce při nemožnosti práce v laboratoři po vypuknutí pandemie koronaviru. Chtěla bych také poděkovat Mgr. Jiřímu Sojkovi za poskytnutí obrazového materiálu. Dále bych chtěla poděkovat celému kolektivu Oddělení buněčné biologie za jejich přístup a vstřícnost při praktických pokusech v začátcích vypracování práce. V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům za podporu při vypracovávání bakalářské práce.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Anna Malíšková
Název práce	Charakterizace proteinů SIMKK a PRKK u vojtěšky <i>Medicago sativa</i>
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Oddělení buněčné biologie CRH
Vedoucí práce	Mgr. Ivan Luptovčiak, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2021

### Abstrakt:

Tato bakalářská práce byla zaměřena na charakterizaci proteinů SIMKK a PRKK v *Medicago sativa* pomocí *in silico* analýz a také na fenotypizaci semen a semenáčů mutantní linie SIMKK RNAi. Při *in silico* analýzách bylo potvrzeno, že nejbližším ortologem proteinu SIMKK je v *Arabidopsis thaliana* AtMKK4 a proteinu PRKK je nejbližší AtMKK2. Další *in silico* analýza byla zaměřena na AtMKK4 a AtMKK2, u kterých se zjišťovala vazebná místa transkripčních faktorů, místa subcelulární lokalizace, míra hladiny transkriptů během vývoje rostlin a při reakci na stres, dostupné mutace genu a jejich pozice v proteinových doménách. V další části práce bylo měření vybraných fenotypových znaků mutantní linie SIMKK RNAi a jeho porovnání s divokým typem RSY. Porovnávaly se rozměry semen, jejich povrch, délka, šířka, obvod a kruhovitost. Dále se porovnával růst kořenové soustavy semenáčů, kde se měřila délka jak hlavních kořenů, tak celkově kořenová soustava. Poslední část je zaměřena na práci v laboratoři, kdy byla provedena somatická embryogeneze *M. sativa* RSY, transientní transformace *Nicotiana benthamiana* pomocí *Agrobacterium tumefaciens* a detekce přítomnosti transgenu v rostlinách *M. sativa* PRKK Cas9-G3 metodou PCR.

Klíčová slova	<i>Medicago sativa</i> , SIMKK, PRKK, <i>in silico</i> analýza, SIMKK RNAi měření fenotypu
Počet stran	87
Počet příloh	1
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Anna Malíšková
Title	Characterization of SIMKK and PRKK proteins in <i>Medicago sativa</i>
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of cell biology CRH
Supervisor	Mgr. Ivan Luptovčiak, Ph.D.
The year of presentation	2021

### Abstract:

This bachelor thesis was focused on the characterization of SIMKK and PRKK proteins in *Medicago sativa* and the phenotyping of seeds and seedlings of the mutant line SIMKK RNAi. *In silico* analysis confirmed that the closest orthologs of SIMKK and PRKK in *Arabidopsis thaliana* are AtMKK4 and AtMKK2, respectively. Furthermore *in silico* analysis focused on AtMKK4 and AtMKK2 binding sites of transcription factors was performed, as well as subcellular localization analysis, levels of transcripts, available mutations and their position in protein domains. Finally the spatiotemporal transcriptomic analysis related also to stress reactions and also protein composition domain analysis were performed. In the next part, the bachelor thesis was focused on measuring of the selected traits of *M. sativa* mutant line SIMKK RNAi phenotype compared to the wild-type RSY. In detail this analysis was focused on seed area, length, width, perimeter and circularity. The seedling root system was also compared, as well as the length of the primary root. The last part is focused on the work in laboratory, such as the somatic embryogenesis of *M. sativa* RSY, transient transformation of *Nicotiana benthamiana* by *Agrobacterium tumefaciens* and lastly the T-DNA presence was detected by PCR method in the samples obtained from *M. sativa* PRKK Cas9-G3 plants.

Keywords	<i>Medicago sativa</i> , SIMKK, PRKK, <i>in silico</i> analyses, SIMKK RNAi phenotype measurements
Number of pages	87
Number of appendices	1
Language	Czech

## Obsah

1 ÚVOD .....	1
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....	3
2.1 Tolice vojtěška ( <i>Medicago sativa</i> L.) .....	3
2.1.1 Obecná charakteristika <i>M. sativa</i> .....	3
2.1.2 <i>Medicago sativa</i> v zemědělství .....	4
2.2 Symbiotické bakterie fixující dusík .....	5
2.3 Obecná charakteristika mitogen-aktivovaných protein kinas .....	7
2.4 Mitogen aktivované protein kinasy v <i>M. sativa</i> .....	9
2.4.1 Solným stresem indukovaná MAP kinasa kinasa SIMKK .....	11
2.4.2 Patogenním elicitem vyvolaná MAP kinasa kinasa PRKK .....	11
2.4.3 Solným stresem indukovaná MAP kinasa SIMK .....	11
2.4.4 Patogenním elicitem a ethylenem indukovaná MAP kinasa MMK3 .....	14
2.4.5 Stresem aktivovaná MAP kinasa SAMK .....	14
2.4.6 MAP kinasa MMK2 .....	14
2.5 MAP kinasy v huseníčku rolním ( <i>A. thaliana</i> ) .....	15
2.5.1 MAP kinasa kinasa AtMKK4/AtMKK5 .....	15
2.5.2 MAP kinasa kinasa AtMKK1/AtMKK2 .....	16
2.5.3 MAP kinasa AtMPK13 .....	17
2.5.4 MAP kinasa AtMPK11 .....	17
2.5.5 MAP kinasa AtMPK6/AtMPK3 .....	18
2.5.6 MAP kinasa AtMPK4 .....	18
2.5.7 MAP kinasa AtMPK10 .....	19
2.6 MAP kinasy v tabáku virginském ( <i>Nicotiana tabacum</i> ) .....	20
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	21
3.1 Materiály .....	21
3.1.1 Použité chemikálie .....	21
3.1.2 Technický materiál .....	22
3.1.3 Poskytnutá data školitelem .....	22
3.1.4 Servery a databáze .....	23
3.1.5 Programy .....	23
3.2 Roztoky a media .....	24
3.3 Biologický materiál .....	26
3.4 Použité přístroje .....	26
3.5 Metodika .....	27
3.5.1 <i>In silico</i> analýzy .....	27
3.5.2 Procesování dat k porovnání fenotypu <i>M. sativa</i> linie SIMKKi .....	30

3.5.3 Somatická embryogeneze .....	31
3.5.4 Transientní transformace rostlin .....	33
3.5.5 PCR (polynucleotid chain reaction) .....	33
3.5.6 Separace DNA fragmentu v 1% agarosovém gelu.....	35
4 VÝSLEDKY .....	37
4.1 <i>In silico</i> analýzy .....	37
4.1.1 <i>In silico</i> analýza MsSIMKK .....	37
4.1.2 <i>In silico</i> analýza AtMKK4 .....	39
4.1.3 <i>In silico</i> analýza MsPRKK.....	44
4.1.4 <i>In silico</i> analýza AtMKK2 .....	46
4.2 Výsledky získané procesováním dat.....	51
4.2.1 Fenotyp semen SIMKK RNAi linie.....	51
4.2.2 Automatizace měření morfologie semen v programu ImageJ .....	54
4.2.2 Délka kořenů semenáčů linie SIMKK RNAi.....	56
4.3 Výsledky z laboratoře .....	57
4.3.1 Somatická embryogeneze <i>M. sativa</i> .....	57
4.3.2 Transientní transformace <i>N. benthamiana</i> .....	58
4.3.3 PCR detekce transgenu PRKK Cas9-G3.....	60
5 DISKUZE .....	61
6 ZÁVĚR .....	65
7 REFERENCE.....	67
8 SEZNAM ZKRATEK .....	83
9. SEZNAM TABULEK .....	85
10. SEZNAM OBRÁZKŮ.....	86
11. SEZNAM PŘÍLOH.....	87

## CÍLE PRÁCE

Cílem dané bakalářské práce je zvládnutí práce s anglickým i českým textem a jeho následné zpracování do rešerše na danou problematiku. Cílem je také *in silico analýza* MAPKK MsSIMKK a MsPRKK. Dále se bakalářská práce bude zabývat měřením fenotypu transgenních rostlin linie SIMKK RNAi.

V rámci teoretické části bude vypracována rešerše zaměřená na problematiku:

1. Přehled publikací o mitogen aktivovaných protein kinázách v *Medicago sativa* a jejich ortologů v *Arabidopsis thaliana*.
2. Přehled signálních drah mitogen aktivovaných protein kináz se zaměřením na SIMKK a PRKK při vývinu a odpovědi na stres.

Praktická část bakalářské práce bude zaměřena na:

1. *In silico* analýzy SIMKK a PRKK a následné porovnání získaných výsledků s *in silico* analýzou ortologů v *Arabidopsis thaliana* MKK4 pro SIMKK a MKK2 pro PRKK. Pro *in silico* analýzy budou využity programy na predikci subcelulární lokalizace (Suba pro *A. thaliana*), predikci promotorů (software Agris), lokalizace transkriptů (TAIR, The Arabidopsis information resource), program pro zjištění možných protein-proteinových interakcí (IntAct EMBL-EBI). Dále bude využit program DOG 2.0 k vizualizaci proteinových domén, na serveru SWISS-MODEL budou sestaveny 3D modely kinas SIMKK a PRKK. Pro detekci ortologů bude využit server UniProtKB a sekvence proteinů a nukleotidů budou porovnány pomocí programu BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).
2. Dále se bude v praktické části práce měřit fenotyp transgenních rostlin SIMKKi (SIMKK RNAi knock-down mutantní linie) oproti divokému typu RSY, a to analýzou obrázků pomocí programu ZEN lite, která slouží pro převedení fotografií z mikroskopu, ImageJ pro samotné měření. Následné vyhodnocení výsledků bude probíhat pomocí t-testu nebo ANOVA testu a tvorby grafů v programech Excel a PowerPoint.
3. V závěru budou prezentovány laboratorní výsledky ze somatické embryogeneze, transientní transformace a metody PCR.



**Poznámka:**

Tato bakalářská práce byla původně zaměřena na přípravu transgenních linií *M. sativa* exprimující fluorescenčně značený protein PRKK a linii s deletovaným proteinem PRKK s využitím somatické embryogeneze a transientní transformace. Z důvodu pandemických opatření nebylo možné provést všechny laboratorní pokusy, které byly naplánovány a prezentované výsledky z laboratorní práce pochází převážně z období před začátkem pandemické situace.

## 1 ÚVOD

Bakalářská práce je zaměřená na mitogen aktivované protein kinasy (MAP kinasy) v tolici vojtěšce (*Medicago sativa*). Rostliny si musely vyvinout komplexní mechanismus, jak se vypořádat s podněty z jejich okolí. Velké části těchto reakcí se účastní právě MAP kinasy. Tato práce je zaměřená na charakterizaci proteinů SIMKK a PRKK v *M. sativa* a na jejich vliv na zvládání stresových situací, růst a vývoj rostliny. MAPK kinasa SIMKK je aktivovaná stresem ze soli. Tato MAPK kinasa aktivuje MAP kinasu SIMK. Druhou MAPK kinasou, na kterou je bakalářská práce zaměřena, je PRKK, která reaguje na kontakt s patogenním elicitorem, který vyvolá aktivaci podřízených MAP kinas SIMK, SAMK, MMK3 a MMK2.

Další část bakalářské práce je zaměřená na *in silico* analýzu proteinu SIMKK a PRKK a srovnání získaných informací s ortology MKK4 a MKK2 v *Arabidopsis thaliana*. Pro *in silico* analýzy byl využit server SWISS-MODEL, díky kterému byl získán 3D model proteinu, na kterém bylo možné vyznačit například serinové a threoninové sekvence, které jsou potřebné pro aktivaci MAPK kinasy. Dále byly porovnávány sekvence proteinů a nukleotidů SIMKK se sekvencemi MKK4 a MKK5 a také PRKK s MKK2 a MKK1 v *A. thaliana*. Pro *in silico* analýzu MAPK kinas v *A. thaliana* byl využit software Agris, který identifikuje vazebná místa pro transkripční faktory promotoru, jejich umístění bylo následně znázorněno pomocí programu DOG 2.0 na strukturu genu. Program DOG 2.0 byl využit také pro znázornění proteinových domén na proteinech MKK4 a MKK2. Byla využita databáze SUBA pro detekci možných subcelulárních lokalizací proteinů MKK4 a MKK2. Pomocí databáze TAIR pro *A. thaliana* byly zjištěny hladiny transkriptů MKK4 a MKK2 v různých pletivech během vývinu rostliny a při reakci na stresové faktory. Databáze TAIR byla využita i pro identifikaci možných mutací v genu pro proteiny MKK4 a MKK2. Poslední částí *in silico* analýzy pro proteiny MKK4 a MKK2 v *A. thaliana* byla detekce možných protein-proteinových interakcí s těmito proteiny. Následně byly identifikované interagující MAP kinasy přiřazeny k jejich ortologům v *M. sativa* pro zjištění možných protein-proteinových interakcí v *M. sativa*.

Dále se praktická část bakalářské práce zabývala fenotypovou analýzou transgenní linie *M. sativa* SIMKK RNAi (SIMKKi), která má sníženou expresi genu *SIMKK* a také *SIMK*. Tato linie byla porovnávána s rostlinami divokého typu *M. sativa* Regen SY (RSY). Při fenotypové analýze byla srovnávána velikost a množství získaných semen

z rostlin divokého typu a transgenní linie SIMKKi. Dále byl porovnáván počet vedlejších kořenů a délka jak hlavních, tak i vedlejších kořenů u obou porovnávaných linií.

Z důvodu nedostatku příležitosti pro práci v laboratoři v důsledku coronavirové epidemie jsou v této práci zobrazeny výsledky z laboratorních metod ze somatické embryogeneze s rostlinami divokého typu RSY. Tato metoda je také součástí složitější metody stabilní transformace vojtěšky pomocí *Agrobacterium tumefaciens* (ke které nakonec nedošlo) a měla posloužit pro získání nezbytné praktické zkušenosti studentky před samotnou transformací. Také byla provedena detekce přítomnosti transgenu PRKK Cas9-G3 v rostlinách *M. sativa* (poskytnuté školitelem) pomocí PCR a elektroforézy na agarosovém gelu. Dále byla provedena transientní transformace v listech *Nicotiana benthamiana* pomocí *A. tumefaciens* s konstruktem *35S::PRKK:mRFP* v pGWB454 exprimující fluorescenčně značený protein PRKK, který se detekoval pomocí konfokálního laserového skenovacího mikroskopu.

Výzkum vlastností jednotlivých proteinů se provádí z důvodu identifikace jejich funkcí v rostlině, což má velký potenciál ve zvýšení růstu a produkce zemědělských plodin nebo zlepšení jejich odolnosti vůči nepříznivým přírodním podmínkám nebo škůdcům. Například u studovaných proteinů MsSIMKK a MsSIMK byl pozorován vliv těchto proteinů na vyšší tvorbu nodulů, vyšší příjem dusíku rostlinou a zvýšeným růstem nadzemní biomasy. Získanými znalostmi proteinů je možné zlepšit vlastnosti zemědělských plodin pro jejich vyšší výnosy, což je potřeba kvůli pokrytí potřeby zemědělských plodin pro lidskou potravu nebo pro krmení hospodářských zvířat.

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Tolice vojtěška (*Medicago sativa* L.)

#### 2.1.1 Obecná charakteristika *M. sativa*

Patří do čeledi bobovité (*Fabaceae*). Původem z mediteránní až subkontinentální Asie, odkud se rozšířila do Evropy (Randuška *et al.*, 1986). Semena má fazolovitého tvaru (Obr. 1 A). Po prasknutí semenného obalu roste jako první kořen, který ze začátku zpomaluje růst stonkové části (plumuly). Jelikož *M. sativa* patří mezi hypogeické rostliny, tak děloha rostliny zůstává v zemi a dodává živiny pro rostlinu v prvních dnech růstu (Obr. 1 B). Klíčící rostlina má velmi krátký hypokotyl a vlastní klíčící lodyha je tvořena nadděložním článkem (epikotyl). V děloze rostliny dochází pouze k nahromadění auxinu, ale rostlina ho začne využívat až v epikotylu (Procházka *et al.*, 1998). Dospělá rostlina může měřit 30–80 cm. Patří mezi dvouděložné rostliny. Hlavní doba kvetení bývá zpravidla od května do října. Průřez kořenem je válcovitý, s vedlejšími kořeny. Lodyha je vzpřímená, z větší části lysá. U *M. sativa* rostou střídavé složené trojčetné listy, jejichž řapík je dlouhý. Jednotlivé lístky jsou obvejčité, v horní třetině mají nepravidelně zubatý tvar. Prostřední lístek má nejdelší řapík, zbylé dva jsou přisedlé (Obr. 1 C). Palisty mají kopinatý tvar a jsou přirostlé k řapíku (Randuška *et al.*, 1986). Všechny květy jednoho květenství jsou fialové, popřípadě modrofialové (Kubát *et al.*, 2002). Květy vyrůstají na dlouhých stopkách v mezi podpůrnými listeny a vytvářejí hrozny, které mají délku 10–30 mm. Kalich je 5-zubý, porostlý chloupky na žilkách. Koruna je modrofialová, pavéza má tmavou kresbu (Obr. 1 D). Plod je lusk s 1–3 řídkými závity, má síť žilek, a je pokrytý chlupy, které jsou přitisklé na lusk (Randuška *et al.*, 1986).



Obrázek 1: Životní cyklus *M. sativa*. **A** Semena *M. sativa*. Snímek poskytnut školitelem. **B** Klíčící semena *M. sativa*. Upraveno podle Ref. 22. **C** List *M. sativa*. Převzato z Ref. 23. **D** Květ *M. sativa*. Autor fotografie Petr Vobořil. Převzato z Ref. 1. A Měřítko 2 mm.

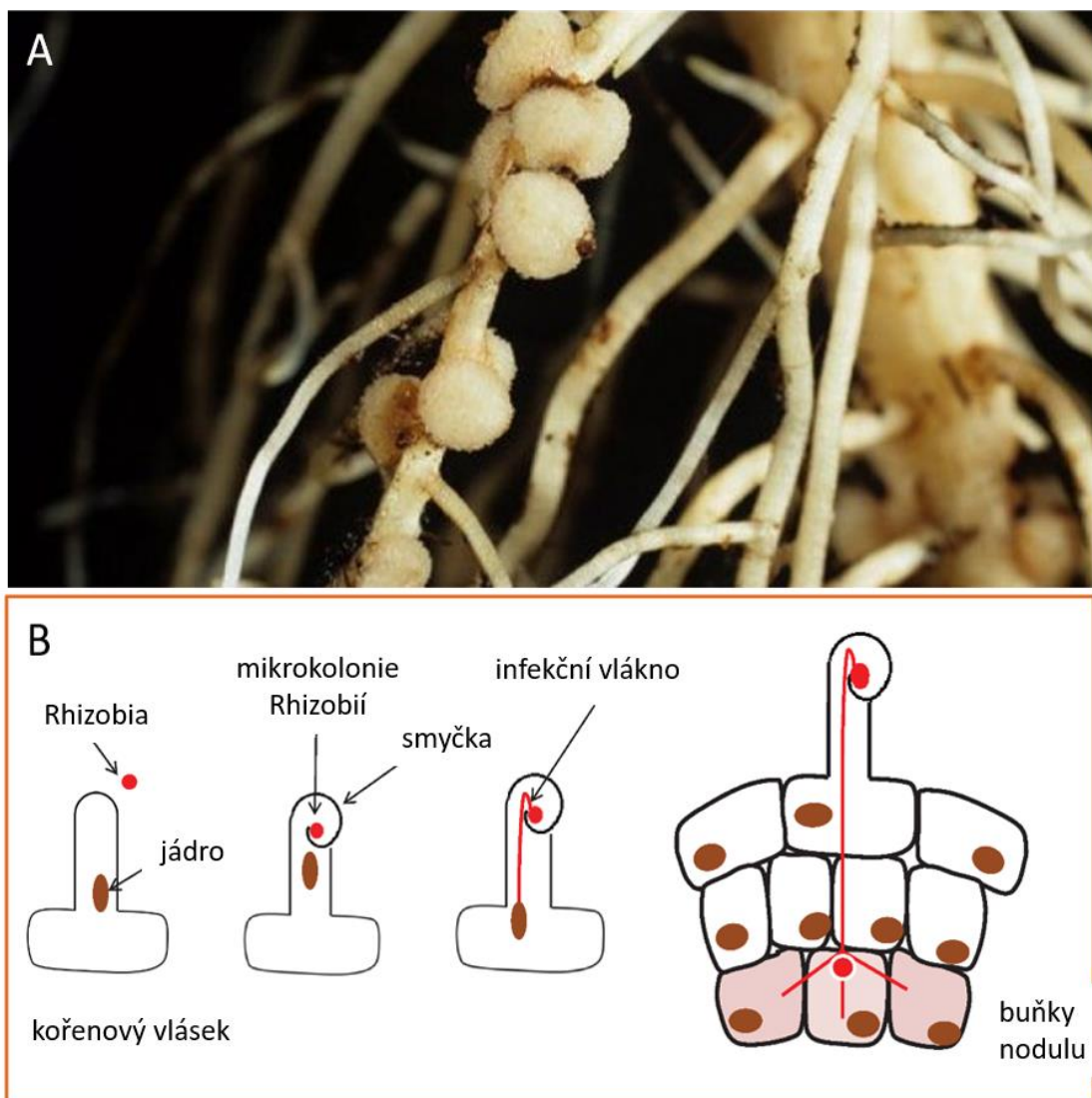
### 2.1.2 *Medicago sativa* v zemědělství

V osevním postupu se využívá jako zlepšující plodina pro zemědělství. Seče se během roku 3–4krát. *M. sativa* patří mezi vytrvalé rostliny, které mohou růst až 10 let, ale vysokou produkci v našich podmínkách poskytuje pouze první 3–4 roky. Používá se jako podsev pro jiné plodiny (například oves nebo ječmen) nebo se vysévá samostatně (Ref. 1). Má vysoký obsah bílkovin a minerálních látek (Randuška *et al.*, 1986).

Rostliny se jako přisedlé organismy musí vyrovnávat s řadou nepříznivých podmínek prostředí (například chlad, sucho, UV), ale i s organickými hrozbami (patogeny). Rostliny si vůči patogenům vyvinuly schopnost rozeznávat elicitory (signály odvozené od patogenů nebo produktů degradace buněčných stěn rostlin). Po detekci elicitorů následuje intracelulární přenos signálu, který vede k obranným reakcím, jako je tvorba reaktivních forem kyslíku, exprese genů kódujících proteiny související s obranou proti patogenům, syntéza fytoalexinů a programovaná buněčná smrt. Ukázalo se, že elicitorová signalizace zahrnuje proteinovou fosforylaci (Felix *et al.*, 1991; Dietrich *et al.*, 1990; Viard *et al.*, 1994), což naznačuje, že do intracelulárního přenosu informací jsou zapojeny kaskády proteinových kinas (Cardinale *et al.*, 2000)

## 2.2 Symbiotické bakterie fixující dusík

Dusík je jeden z hlavních prvků potřebných pro růst rostlin. Rostliny jej na rozdíl od živočichů potřebují získat ve formě amoniaku nebo dusičnanů z půdy. Dusík v této formě není vždy plně dostupný pro rostliny, tudíž může být pro růst limitující. Bobovité rostliny a některé půdní bakterie fixující vzdušný dusík (souhrně označené jako Rhizobia) jsou schopné vytvořit mezi sebou symbiotický vztah tvorbou nodulů (Obr. 2 A). V tomto vztahu bakterie fixují vzdušný dusík a následně ho přeměňují na amoniak, který je pro rostliny využitelný. K symbióze, ale nemusí vždy dojít. Existuje spousta faktorů, které mohou zabránit kompatibilitě mezi rostlinou a bakteriemi.



Obrázek 2: Symbiotické bakterie fixující dusík (Rhizobia). A Snímek nodulů vytvořených symbiotickými bakteriemi na kořenu rostliny. Převzato z Ref. 2. B Schéma infekce trichoblastu kořenového vlásku Rhizobii. Upraveno podle Vaz Martins a Livina (2019).

Po proniknutí bakterií do kořenových vlásků nastává proces infekce, při kterém se tyto bakterie začnou množit a vzniklé infekční vlákno prorůstá kořenovým vláskem až se dostane do vrstev kortexu. Po proniknutí bakterií do kortexu se uvolní, obalí se membránou, kterou vytvoří rostlina a vzniká symbiozom. V této struktuře podobné organelám rostlinných buněk se bakterie množí a tím vznikají bakteroidy, které jsou schopné fixovat vzdušný dusík. Po vytvoření bakteroidů se tvoří noduly na kořenech rostlin (Obr. 2 B), ve kterých jsou tyto bakteroidy obsaženy (Jones *et al.*, 2007; Oldroyd *et al.*, 2011).

Mohou se tvořit noduly buď determinované nebo nedeterminované. Rozdíl je v meristému, ze kterého vznikají. Noduly označené jako determinované vznikají z meristému růstového vrcholu (tip-growing meristem) a nedeterminované z transientního meristému. Mezi specifické faktory, které ovlivňují symbiotický vztah rostlin s Rhizobii patří specifita pomocí flavonoidů a Nod faktorů. Tento signál je vyvolaný při nedostatku dusíku v rostlině a dochází k uvolnění flavonoidů do rhizosféry, kde dochází k expresi genů bakteriální nodulace (*nod*) a k aktivaci NodD proteinů (Oldroyd *et al.*, 2011). Tyto NodD proteiny, které jsou produkovány Rhizobii, specificky rozpoznávají druhy flavonoidů, které jsou produkovány bobovitými rostlinami a tím udávají specifitu symbiotických interakcí. Bylo dokázáno, že flavonoidy jsou schopny podporovat vazbu NodD proteinů na promotory *nod* genů v *Sinorhizobium meliloti* (Peck *et al.*, 2006). Dalším z faktorů nutných pro symbiotické interakce je tvorba Nod faktoru (lipochitooligosacharidový signál) jehož tvorba je indukována expresí *nod* genů (Oldroyd *et al.*, 2011). Dále byl studován vliv povrchových polysacharidů produkovaných Rhizobii jako jsou exopolysacharidy, lipopolysacharidy a kapsulární polysacharidy (Fraysse *et al.*, 2003). Dalším důležitým faktorem pro tvorbu nodulů je přirozená imunita hostitelské rostliny. Problémem je, že některé bakteriální patogeny produkují podobné nebo stejné signální molekuly a tím si usnadňují vstup do rostliny (Deakin a Broughton, 2009). Dále může dojít k nekompatibilitě mezi hostitelem a Rhizobii i v pozdějším stádiu, a to až po tvorbě nodulů s bakteroidy. Může dojít k tvorbě nodulů, které nejsou schopny fixovat vzdušný dusík. Tento fenotyp nebyl způsoben nedostatečnou tvorbou infekčního vlákna, ale deficit způsobil rozpad bakteroidů při jejich diferenciaci. Jako jeden z molekulárních důvodů neschopnosti bakteroidů fixovat vzdušný dusík byl detekován gen v *Medicago truncatula NFS1*, díky kterému dochází k nekompatibilitě se *S. meliloti* Rm41. Gen *NFS1* kóduje expresi nodulově specifického peptidu, který je bohatý na cystein (nodule-specific cysteine-rich, NCR) peptidu. Kromě

pozitivního vlivu NCR peptidu na diferenciaci endosymbiontů a vznik bakteroidů, mají některé NCR peptidy funkci ve vyloučení symbiotických Rhizobií, které jsou nekompatibilní. Díky genu *NFS1* dochází k předčasnému stárnutí buněk a následné apoptóze. Funkce *NFS1* genu je ovlivněná specifickou genetikou dané hostitelské rostliny (Yang *et al.*, 2017).

### 2.3 Obecná charakteristika mitogen-aktivovaných protein kinas

Mitogen-aktivované protein (MAP) kinasy (neboli MAPK) tvoří rodiny serin/threoninových protein kinas, které jsou obsaženy ve všech eukaryotech a podílejí se na přenosu řady extracelulárních signálů, včetně reakcí na biotické (například stres z chladu, sucha a osmotický stres) a abiotické (například bakteriální nebo houbové infekce) stresy, růstovými faktory, mitogeny a cytokiny (Waskiewicz and Cooper, 1995). MAP kinasy se také podílejí na zprostředkování signálních drah hormonů, reakci na dotek nebo se také účastní signalizační kaskády vyvolanou poraněním. Mechanické poranění listů indukuje aktivaci MAP kinas patřících do podrodin SIMK a SAMK u *M. sativa* a SIPK a WIPK u tabáku virginského (*Nicotiana tabacum*) (Cardinale *et al.*, 2000).

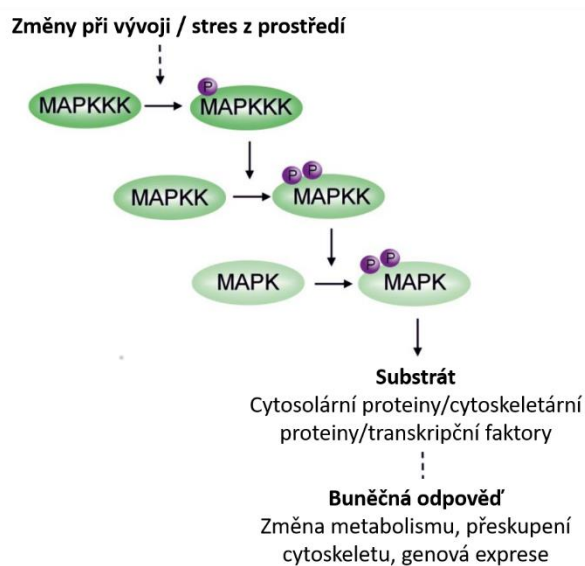
Zapojují se i do vývoje rostliny. Tvar rostliny je již určen ve vyvíjejícím se embryu, ale ten může být pozměněn vnějšími vlivy, aby se rostlina přizpůsobila podmínkám prostředí. MAP kinasové dráhy do jisté míry kontrolují vývoj embrya a postembryonální růst a jsou tedy zapojeny do vývoje gametofytů, specifikace orgánů během embryogeneze a kontroly růstu (Komis *et al.*, 2018). Různé extracelulární podněty mohou aktivovat více MAP kinasových skupin (Whitmarsh a Davis, 1998). Zásadní význam pro správnou funkci MAP kinasových kaskád je jejich subcelulární umístění, protože mnoho kaskád sdílí společné komponenty a tím pádem hrozí kompetice substrátů MAP kinas. Každý MAP kinasový modul by měl být lokalizován poblíž místa detekce signálu, ale toto umístění se nemusí shodovat se subcelulárním místem funkce. MAP kinasové moduly proto potřebují mechanismus pro jejich transport, který je navede k místu funkce (Komis *et al.*, 2018).

Rozsáhlá studie modelových systémů (například kvasinky) naznačují, že intracelulární lokalizace modulů MAPK je závislá na organizaci proteinových lešení (scaffold proteinů), která jsou dále zodpovědná za zachycení celých modulů MAP kinas do příslušných subcelulárních míst (Dhanasekaran *et al.*, 2007). Lešení umožňuje efektivní využití modulů MAP kinas a všech členů signalizační kaskády a zabraňuje chybné aktivaci modulu kvůli možné detekci jiných signálů, při kterých se využívají stejné MAP



kinasy (Nishimura *et al.*, 2016). Scaffold proteiny musí splňovat následující kritéria (Dhanasekaran *et al.*, 2007): (a) Interagují se všemi členy modulu MAPK. (b) Jsou schopny nasměrovat všechny členy modulu ke správné interakci během přenosu signálu a podílejí se na aktivaci protein kinasové kaskády. (c) Zachycují moduly MAPK ke konkrétním specifickým regulátorům a mohou směřovat reakci na konkrétní substráty (Komis *et al.*, 2018).

Konzervovaná funkce modulů MAPK závisí na posttranslační fosforylační kaskádě, kterou iniciuje mitogen aktivovaná protein kinasa kinasa kinasa (MAPKKK, MAP3K nebo MEKK), která reverzibilně fosforyluje mitogen aktivovanou protein kinasu kinasu (MAPKK, MAP2K nebo MKK), a tím způsobuje fosforylaci mitogen aktivované protein kinasy (MAPK nebo MPK) (Keshet a Seger, 2010). Serin/threoninový MAPKKKs fosforyluje serinové nebo threoninové zbytky v konzervovaném motivu S/T-X3-5-S/T nalezeném v aktivační smyčce příslušného MAPKK (Tanoue a Nishida, 2003). Dvojitá specifita MAPKK pak fosforyluje threoninové a tyrosinové zbytky konzervovaného T-X-Y motivu v aktivační smyčce jejich MAPK partnera (Keshet a Seger, 2010). To aktivuje MAPK, které regulují aktivity různých cílů, včetně transkripčních faktorů (Ishihama a Yoshioka, 2012), cytoskeletálních proteinů (Šamajová *et al.*, 2013) a dalších proteinových kinas (Popescu *et al.*, 2009) (Obr. 3). Signál je zajišťován prostřednictvím transmembránových receptorů (Lee *et al.*, 2012), transmembránových (Hord *et al.*, 2008) a jiných proteinových kinas (Kim *et al.*, 2012) a trimerních GTPáz (Cheng *et al.*, 2015; Guo *et al.*, 2009; Su *et al.*, 2015).



Obrázek 3: Obecné schéma MAPK kaskády. MAPK kaskáda je složená z podnětu, který tuto kaskádu aktivuje, MAPKKK, MAPKK, MAPK a substrátu, se kterým reaguje MAPK. Reakcí se substrátem dojde k buněčné odpovědi na daný podnět. Upraveno podle Jagodzic *et al.* (2018).

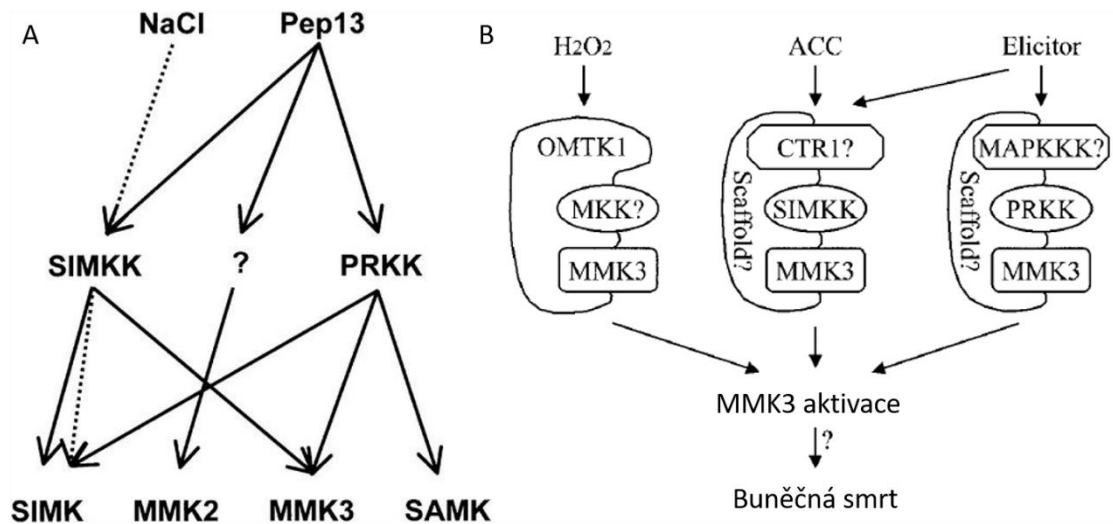
MAPK interagují přímo se svými předchozími MAPKK a po aktivaci interagují se svými substráty. Oba typy interakcí sdílejí společný mechanismus molekulárního rozpoznávání, který se opírá o výskyt dokovacích motivů (docking motif, D motivy) na MAPK interaktorech nebo kinasových interagujících motivech (KIM) (Pitzschke, 2015) a společných dokovacích motivů (common docking motifs, CD motivy) na MAPK. Dalším konzervovaným motivem, který se nachází v substrátech MAPK, je FXFP, který se vždy nachází směrem k C konci proteinu od fosforylačních míst (motivy S/TP) cíle a považuje se za typický pro transkripční faktory (Tanoue and Nishida, 2003).

Pro pochopení funkce MAPK v různých signálních kaskádách má klíčový význam identifikace jejich cílů, kterými jsou substráty nesoucí sekvence, které interagují s MAPK. Mezi které spadá například prolinem řízené serinové nebo threoninové zbytky (SP motivy) a vhodné dokovací sekvence (které jsou také přítomny) v nadřazených MAPK interaktorech (CD motivy) (Pitzschke, 2015). Vědci použili proteomické a fosfoproteomické přístupy (Hoehenwarter *et al.*, 2012), kvasinkové dvouhybridní testy (Singh *et al.*, 2012) a proteinové mikročipy (Popescu *et al.*, 2009) k identifikaci substrátů MAPK a k doladění detekce možných cílů pomocí specifických MAPK (MPK3 a MPK6) (Sörensson *et al.*, 2012). Studium rostlinných MAPK bylo značně usnadněno nástroji vyvinutými v posledních několika letech. Mezi takové nástroje patří sbírky mutantů MAPK (Su and Krysan, 2016), vývoj variant MAPK (jako MPK3, MPK6 a MPK4), které jsou konstitutivně aktivní (Berriri *et al.*, 2012; Genot *et al.*, 2017) a dominantní nefosforylovatelné MAPK varianty (jako MPK6AEF a MPK4AEF), ve kterých je motiv TXY nahrazen nefosforylovatelným motivem AEF (Bush and Krysan, 2007).

## **2.4 Mitogen aktivované protein kiny v *M. sativa***

Byla zjištěna aktivace MAP kinas v *M. sativa* pomocí houbového či bakteriálního elicitoru. Pro tento výzkum byl využit gelový kinasový test, který proběhl pomocí elicitoru separované na elektroforetickém gelu. Test proběhl na buňkách vojtěšky, kdy se detekovala reakce s deriváty kvasinkových buněk obsahující specifické struktury daného elicitoru (yeast elicitor, YE). Imunokinasové testy se specifickými protilátkami MAPK odhalily, že YE aktivoval hlavně 46-kDa SIMK a 44-kDa MMK3 a v menší míře 44-kDa MMK2 a SAMK (Obr. 4 A). Bylo zjištěno, že SIMK a SAMK jsou aktivovány řadou různých stresů. Po ošetření buněk *M. sativa* elicitem se rychle aktivují protein kiny SIMK a MMK3. Maximální aktivační hladiny dosáhly 15 minut po přidání elicitoru a inaktivovaly se po 40 minutách. MMK3 se aktivuje během mitózy, a proto se

předpokládalo, že se účastní dělení buněk (Cardinale *et al.*, 2000). Další detekované MAPK kaskády v *M. sativa*, jsou aktivovány peroxidem vodíku nebo aminocyklopropan-1-karboxylovou kyselinou (ACC). Tyto dvě kaskády spolu s výše popsanou kaskádou (aktivovanou YE) aktivují MMK3 a indukují autoimunitní odpověď a buněčnou smrt (Obr. 4 B, Nakagami *et al.*, 2004).



Obrázek 4: Schéma MAPK kaskád v *M. sativa* obsahující MAPK kinasy SIMKK a PRKK. **A** MAPK kaskády aktivované stresem ze soli a z patogenního elicitoru, čímž jsou aktivovány MAPK kinasy SIMKK, PRKK a jedna neznámá MAPK kinasa, které aktivují MAP kinasy SIMK, MMK2, MMK3 a SAMK. Převzato z Cardinale *et al.* (2002). **B** MAPK kaskády aktivované peroxidem vodíku, aminocyklopropan-1-karboxylovou kyselinou a patogenním elicitem, které obsahují MAP kinasu MMK3. Upraveno podle Nakagami *et al.* (2004).

#### 2.4.1 Solným stresem indukovaná MAP kinasa kinasa SIMKK

Pro studium signalizačních drah v kořenech *M. sativa* pomocí MAPK kaskády byly využity transgenní rostliny s konstruktem SIMKK RNAi (linie SIMKKi) a GFP-SIMK linie, které byly porovnávány s divokým typem RSY (Regen SY). Pro vytvoření obou linií byly využity linie RSY a konstitutivní promotor 35S. Linie SIMKKi měla hladinu transkriptů jak *SIMKK* tak *SIMK* menší než linie RSY. Na druhou stranu vytvořená linie GFP-SIMK (pod konstitutivním promotorem 35S::*GFP::SIMK*) měla vyšší hladinu všech transkriptů *SIMK* oproti kontrolní linii divokého typu, ale hladina nativního transkriptu *SIMK*e byla nižší. Větší množství transkriptu *SIMK* v linii GFP-SIMK mělo za následek u *M. sativa* tvorbu průměrně delších kořenových vlásků oproti kontrolním rostlinám, které měly nižší hladinu transkriptu *SIMK*. U transgenní linie SIMKKi docházelo k dřívějšímu zastavení růstu kořenových vlásků, tudíž měly měřené rostliny kratší kořenové vlásky oproti kontrolní linii i GFP-SIMK linii (Hrbáčková *et al.*, 2020).

Bylo zjištěno, že SIMKK, i se SIMK, jsou za neaktivního stavu lokalizovány v jádře buněk. Při vystavení kořenů rostliny solnému stresu dochází k jejich relokizaci a začínají se hromadit v cytoplazmatických strukturách (Ovečka *et al.*, 2014).

#### 2.4.2 Patogenním elicitorem vyvolaná MAP kinasa kinasa PRKK

PRKK v reakci na elicitor patogenu pomocí fosforylace aktivuje tři různé MAP kiny, a to SIMK, MMK3, SAMK a v nižší míře i MMK2 (Cardinale *et al.*, 2002). PRKK byla zařazena do MAPK podskupiny PMKK1 a její aminokyselinová sekvence byla porovnána s homology patřícími do této skupiny (Ligterink and Hirt, 2001). Největší homologii vykazovala MsPRKK s tabákovou NtSIPKK a shodovala se s ní v 73% aminokyselinové sekvence (Liu *et al.*, 2000). Dále se v 71 % shodovala s LeMEK1, která byla izolována z rajčete (Xing *et al.*, 2001) a u rostliny huseníčku rolního se PRKK shodovala z 68 % s MAPK kinasou nazvanou AtMKK2 (Ichimura *et al.*, 1998a). Pro porovnání, protein kinasa SIMKK, která fosforyluje SIMK, patří do podrodiny PMKK2 (Kriegerl *et al.*, 2000).

#### 2.4.3 Solným stresem indukovaná MAP kinasa SIMK

SIMK je aktivována, pokud jsou buňky *M. sativa* vystaveny hyperosmotickému prostředí. SIMK je fosforylována kromě PRKK také pomocí SIMKK. Ošetření buněk s 250 mM NaCl aktivuje SIMK, která dosáhne maximální aktivity za 10 minut (Munnik *et al.*, 1999).

U *M. sativa* je SIMK (solným stresem indukovaná MAP kinasa) a případně její upstream SIMKK, zapojena do regulace růstu špiček kořenových vlásků (Berson *et al.*,

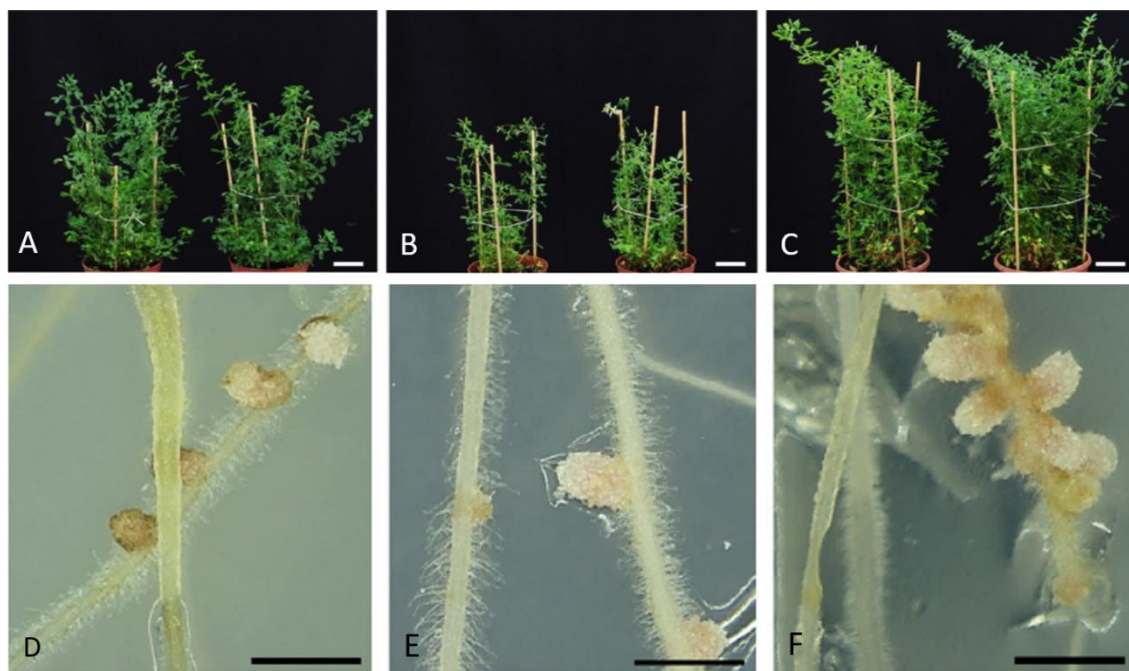
2014; Šamaj *et al.*, 2002). U bobovitých rostlin jsou kořenové vlásky primárním cílem symbiotických bakterií fixujících dusík. Subcelulární lokalizace SIMK je určena v jádře, cytoplazmě a aktinu. SIMK se zapojuje převážně do růstu kořenových vlásků (Šamaj *et al.*, 2002)

Další studie odhalila roli aktinu při hromadění SIMK ve špičce rostoucích kořenových vlásků u *M. sativa*. Před nástupem růstu kořenových vlásků, je SIMK přemístěna v aktivovaném stavu na rostoucí špičku kořenových vlásků. Farmakologická manipulace s aktinovým cytoskeletem ukázala, že SIMK se pravděpodobně přesune na špičku kořenového vlasu prostřednictvím aktinových mikrofilament, protože jejich depolymerizace působením latrunculinu přesune SIMK lokalizovanou na špičce zpět do jádra (Šamaj *et al.*, 2002).

Míra exprimované SIMK ovlivňuje také tvorbu nadzemní biomasy a tvar listů. Tato vlastnost SIMK byla studována na ostříhaných výhoncích nadzemních částí mateřských rostlin studovaných linií RSY (Obr. 5 A), SIMKKi (Obr. 5 B) a GFP-SIMK (Obr. 5 C). Nejnižší tvorba biomasy a tvorba krátkých stonků byla pozorována u linie SIMKKi. U linie GFP-SIMK byl pozorován v porovnání s liniemi RSY a SIMKKi rychlý růst nadzemní části a vznik robustních rostlin s větším množstvím stonků a tím i celkově vyšší tvorbou biomasy. Dále byl u nadzemních částí rostlin ovlivněn také tvar listů prvního až třetího řádu na nových výhoncích, kdy listy vytvořené na rostlinách SIMKKi linie měly v průměru menší povrch, byly méně široké, byly kratší a jejich okraj byl méně zvlněný oproti listům rostlin RSY nebo GFP-SIMK. Naopak listy transgenní linie GFP-SIMK měly větší povrch, měly delší stopku a měly více zvlněné okraje oproti listům linie RSY (Hrbáčková *et al.*, 2020).

MAP kinasa SIMK má vliv také na symbiotické interakce (tvorba infekčního vlákna a nodulace) mezi kořeny *M. sativa* a bakteriemi *S. meliloti*. Zvýšená hladina proteinu SIMK byla detekována pomocí mikroskopické metody, která zobrazuje živé buňky pomocí GFP technologie (live-cell imaging) a imunolokalizace v místech spojení kořenových vlásků s *S. meliloti*, a to v infekčních kapsách a při růstu infekčních vláken. Bylo porovnáno množství vytvořených infekčních vláken a nodulů mezi jednotlivými liniemi rostlin, a to divokým typem RSY (Obr. 5 D), transgenními liniemi SIMKKi (Obr. 5 E) a GFP-SIMK (Obr. 5 F). Při pozorování celé kořenové soustavy těchto rostlin, bylo zjištěno, že v průměru se tvoří u linie SIMKKi méně nodulů než u divokého typu nebo GFP-SIMK linie. Dále se pozorovalo, jestli se noduly tvoří individuálně nebo v klastrech. Nejčastější shlukování nodulů vznikalo u linie GFP-SIMK a vytvořené klastry obsahovaly v průměru

vyšší počet nodulů (27,3 % obsahovala pět nebo i šest nodulů) oproti linii RSY nebo SIMKKi. Pro porovnání na linii RSY ani SIMKKi se netvořily klastry s více než pěti noduly, ale tvořily se na nich ve větším množství klastry obsahující dva noduly (62,9 % u RSY a 61,5 % u SIMKKi, u linie GFP-SIMK se takto tvořily klastry pouze v 18,2 % případů). Z těchto zjištěných dat je viditelné, že zvýšená hladina proteinu SIMK ovlivňuje nodulaci a tvorbu infekčních vláken a způsobuje tvorbu většího množství nodulů a jejich shlukování do klastrů ve větším počtu (Hrbáčková *et al.*, 2020).



Obrázek 5: Vliv MAP kinasy SIMK na růst nadzemní části rostliny a nodulaci. **A** Mateřské rostliny linie RSY. **B** Mateřské rostliny linie SIMKKi. **C** Mateřské rostliny linie GFP-SIMK. A-C Měřítko 4 cm. **D** Kořeny rostliny linie RSY s vytvořenými noduly. **E** Kořeny rostliny linie SIMKKi s vytvořenými noduly. **F** Kořeny rostliny linie GFP-SIMK s vytvořenými noduly. D-F Měřítko 1 cm. Upraveno podle Hrbáčková *et al.* (2020).

#### **2.4.4 Patogenním elicitem a ethylenem indukovaná MAP kinasa MMK3**

MAP kinasa MMK3 je lokalizovaná v buněčné desce při cytokinezi kořenových buněk (Bögre *et al.*, 1999). Během buněčného dělení hraje MMK3 roli v signalizaci ethylenu a též elicitoru z patogenu (Cardinale *et al.*, 2000; Cardinale *et al.*, 2002; Ouaked *et al.*, 2003, Bogre *et al.*, 1999). Kromě elicitoru a ethylenu může být MMK3 aktivována MsPRKK (Cardinale *et al.*, 2002) a MAPKK kinasa OMTK1 (oxidativním stresem aktivovaná MAP3K, oxidative-stress activated MAP3K). OMTK1 s MMK3 spolu reagují přímo, protože se nachází ve stejném proteinovém komplexu v protoplastu. OMTK1 neaktivuje jiné MAP kinasy (jako jsou SIMK, SAMK, MKK2) než MMK3 (Nakagami *et al.*, 2004). Expozice rostliny oxidativnímu stresu indukuje buněčnou smrt. U transformovaných rostlin s koexpresí OMTK1 a MMK3 došlo po působení oxidativního stresu (2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> po dobu 6 hodin) ke zvýšené indukci buněčné smrti oproti rostlinám s transformovaným prázdným vektorem. Tudiž se OMTK1 a MMK3 podílí na spouštění buněčné smrti (Nakagami *et al.*, 2004).

#### **2.4.5 Stresem aktivovaná MAP kinasa SAMK**

SAMK je aktivována stresem z chladu, ze sucha, doteku a poranění (Meskiene *et al.*, 1998). K aktivaci této teplotně citlivé protein kinasy dochází při poklesu teploty, a ne pokud jsou buňky již aklimatizované na nižší teplotu (Kawczynski a Dhindsa, 1996). Antagonistou k MsSAMK je MAP kinasa NtHAMK z *Nicotiana tabacum*, která se aktivuje při zvyšování teploty v buňkách (Sangwan *et al.*, 2002). Tyto protein kinasy mají důležitou roli při aklimatizačních procesech v rostlině při změnách teplot (Örvar *et al.*, 2000; Sangwan *et al.*, 2001). MsSAMK i NtHAMK patří do rodiny proteinových kinas ERK (extracelulárním signálem regulovaná kinasa). Mají podobnou molekulovou hmotnost a nelze je odlišit gelovou elektroforézou. Jsou však imunologicky odlišné a protilátka anti-MsSAMK nerozpoznává NtHAMK (Sangwan *et al.*, 2002). Bylo zjištěno, že teplotní posun z 37 °C na 25 °C vnímají buňky *M. sativa* jako teplotní šok a je spuštěna aktivace protein kinasy SAMK. Při tomto snížení teplot trvala aktivace do 10 minut. Hladina SAMK na bazální úroveň poklesla po 60 minutách, tudíž je aktivace SAMK pouze krátkodobá a slouží k rychlé aklimatizaci po stresu z chladu (Sangwan a Dhindsa, 2002).

#### **2.4.6 MAP kinasa MMK2**

MAP kinasa MMK2 se účastní obranné reakce *M. sativa* po kontaktu s patogenním elicitem. Tato obranná kaskáda rostliny byla testována použitím kvasinkového elicitoru

(yeast elicitor, YE), který aktivoval nejen MMK2, ale i MMK3, SIMK, a SAMK. Dále byly na aktivaci těchto MAP kinas testovány jednotlivé komponenty, které jsou obsaženy v YE, a to chitin, ergosterol, cholesterol,  $\beta$ -(1,3)-glucan a glykopeptidy. Aktivovat MMK2 byl schopný pouze chitin a  $\beta$ -(1,3)-glucan. Cholesterol a glykopeptidy neaktivovaly žádnou z uvedených MAP kinas. (Cardinale *et al.*, 2000). Při reakci na patogen je aktivována MAPK kinasa PRKK, která poté aktivuje kromě jiných MAP kinas také MMK2 (Cardinale *et al.*, 2002). Dále byla testována odezva rostliny na kontakt s těžkými kovy. Pro tento pokus byl využit chlorid měďnatý ( $\text{CuCl}_2$ ) a chlorid kadmenný ( $\text{CdCl}_2$ ). Při postupném zvyšování koncentrace těchto halogenidů, došlo při koncentraci 50  $\mu\text{M}$   $\text{CuCl}_2$  i  $\text{CdCl}_2$  k aktivaci jak MMK2, tak i MMK3 a SIMK. Při vyšších koncentracích se aktivovala i SAMK. Při pozorování kinetiky aktivace MMK2 při aplikaci 100  $\mu\text{M}$   $\text{CuCl}_2$  a  $\text{CdCl}_2$  na dvě různé rostliny, bylo zjištěno, že rychlejší aktivace této MAP kinasy proběhla při kontaktu rostliny s  $\text{CuCl}_2$ , a to již po 10 minutách (Jonak *et al.*, 2004).

## 2.5 MAP kinasy v huseníčku rolním (*A. thaliana*)

Tato část rešerše je zaměřená na MAP kinasy v *A. thaliana*, hlavně na ortology od výše popsaných MAPK kinas v *M. sativa*. Ortologem MsPRKK je AtMCKK1 a AtMCKK2, které jsou zapojeny do signálních kaskád při reakci na elicitor patogenu (Nitta *et al.*, 2020), chlad a zasolení prostředí (Teige *et al.*, 2004). Dále jsou popsány MAPK kinasy AtMCKK4 a AtMCKK5, které jsou ortologem MsSIMKK. Tyto kinasy v *A. thaliana* se účastní reakce na elicitor patogenu a mají vliv na diferenciaci průduchů (Sun *et al.*, 2018). Dále budou ve zkratce popsány i MAP kinasy MPK13, MPK11 (aktivována patogenním elicitorem), MPK3 s MPK6 a MPK4.

### 2.5.1 MAP kinasa kinasa AtMCKK4/AtMCKK5

V *A. thaliana* jsou MAPK kinasy MCKK4 a MCKK5 navzájem zastupitelné a mají podobné funkce. Tyto MAPK kinasy se účastní několika různých signálních drah. Jedna z nich se ovlivňuje tvorbu a diferenciaci průduchů a má negativní vliv na vývoj průduchů. V této kaskádě jsou MCKK4 a MCKK5 aktivované pomocí MAPKK kinasy YODA (YDA). Po aktivaci vyvolanou YDA, jsou schopné aktivovat MAP kinasy MPK3 a MPK6, které mají také vzájemně zastupitelnou funkci v *A. thaliana*. Bylo zjištěno, že brassinosteroidy mají negativní regulační funkci na aktivitu YDA a tím pozitivně ovlivňují tvorbu a diferenciaci průduchů.



Druhá kaskáda, ve které se podílejí MKK4 a MKK5 je aktivovaná kontaktem s molekulárními strukturami, které pochází z obalových struktur patogenních mikroorganismů (PAMP, pathogen-associated molecular patterns), takže se MKK4 a MKK5 podílejí také na reakci na biotický stres a obraně proti patogenům. V této kaskádě jsou aktivovány pomocí MAPKK kinas MAPKKK3 a MAPKKK5. Po aktivaci těmito protein kinasami aktivují MAP kinasy MPK3 a MPK6, které se v této kaskádě podílejí na reakci na kontakt s patogenním elicitorem. Tyto dvě kaskády vzájemně regulují svoji aktivitu. Při zvýšené hladině YDA dochází k nižší reakci mezi MAPKKK3/5 a MKK4/5. Naopak při zvýšené hladině MAPKKK3 nebo MAPKKK5 v rostlině dochází ke snížené aktivaci MKK5 pomocí YDA (Sun *et al.*, 2018).

### 2.5.2 MAP kinasa kinasa AtMKK1/AtMKK2

MAPK kinasy MKK1 a MKK2 jsou v signalizačních kaskádách *A. thaliana* navzájem zastupitelné. Při zastavení exprese jednoho z proteinů je jeho funkce nahrazena druhou kinasou. (Nitta *et al.*, 2020). Exprese MKK2 je vyvolaná stresem z chladu a stresem z vysoké koncentrace soli. Upstream MAP kinasa v *A. thaliana*, která aktivuje AtMKK2, je MAPKK kinasa AtMEKK1. AtMEKK1 kromě MAPK kinasy AtMKK2 aktivuje také AtMKK1. AtMKK2 aktivuje MAP kinasu AtMPK4 (Teige *et al.*, 2004; Ichimura *et al.*, 1998b), MPK6 (Teige *et al.*, 2004), a také MAP kinasu AtMPK10 (Stanko *et al.*, 2014).

Jedna z funkcí těchto MAPK kinas je, že se podílejí na reakci při kontaktu s patogenním elicitorem. Na této kaskádě se podílí MAP3K MEKK1, dále MKK1 a MKK2 a MAP kinasa MPK4. Tato kaskáda negativně reguluje imunitní reakci na kontakt s patogenním elicitorem. Tím chrání rostlinné buňky před autoimunitním poškozením (Nitta *et al.*, 2020).

Byly porovnány fenotypy *A. thaliana* kontrolního divého typu Col-0 s rostlinami s nadexpresí v genu *MKK2*, jejichž produktem byl konstitutivně aktivní MKK2-EE protein exprimovaný jako MYC-epitop-tagovaná verze pod kontrolou konstitutivního 35S CaMV promotoru, a také s rostlinnou linií s nulovým množstvím exprimovaného genu *MKK2*, jedná se tedy o nulový mRNA mutant (*mkk2*), který neexprimuje genový produkt, což je protein MKK2. Tato linie nese samostatnou inzerci T-DNA do intronu 5 v genu *MKK2*, která způsobuje mRNA nulový fenotyp. Při běžných podmínkách nebyly transgenní rostliny *mkk2* ani *MKK2-EE* odlišné ve fenotypu. Rozdíl byl viditelný až při nástupu stresu z nízkých teplot a stresu ze soli. Rostliny obsahující gen *MKK2-EE* měly

zvýšenou odolnost vůči chladu i zvýšené koncentraci soli v mediu oproti divému typu *A. thaliana* nebo *mkk2* (Teige *et al.*, 2004).

### 2.5.3 MAP kinasa AtMPK13

Tato MAP kinasa může být aktivována pomocí nadřazené MKK6. Dále se testovala reakce mezi MPK13, MKK6 a MAP3K v *A. thaliana* a bylo zjištěno, že došlo k interakci s MAPKKK2 a MAPKKK12. Dále bylo zjištěno, že MPK13 spolu s MKK6 má vliv na růst kořenné soustavy. Byly připraveny transgenní linie MKK6 RNA interference (RNAi) a MPK13 RNAi. U těchto transgenních linií byl detekován snížený růst laterálních kořenů. Expres MPK13 a MKK6 byla detekována v buňkách středního válce a v buňkách pericyklu pomocí GUS histochemie. Naopak nebyly detekovány v buňkách epidermy nebo v kortexu (Zeng *et al.*, 2011a).

MPK13 se dále účastní reakce na kontakt rostliny s patogenním elicitorem. Při kontaktu s patogenem jsou detekovány specifické molekulární látky uvolněné patogenem (Patogen-associated molecular patterns, PAMP), které vyvolají specifickou imunitní reakci. Bylo zjištěno, že přítomnost bakteriálního elicitoru flg22 indukuje tvorbu (kromě MPK4 a MPK11) také MPK13 (Nitta *et al.*, 2014)

### 2.5.4 MAP kinasa AtMPK11

MPK11 interaguje s nadřazenou AtMKK6, která má roli při cytokinezi a opylení květů. MKK6 fosforyluje MPK11 v menší míře než MPK4. MPK11 se s MPK4 shoduje v 88 % sekvence aminokyselin. I když jsou si tyto MAP kinasy sekvenčně podobné, tak jejich funkce je rozdílná (Zeng *et al.*, 2011b). Pokud dojde ke ztrátě funkce genu *AtMPK4* (mutant *mpk4*) tak to má významný vliv na životnost rostliny (Petersen *et al.*, 2000). U mutantů *mpk11* s vyřazenou funkcí genu (knock-out mutant, SALK\_049352) byl fenotyp podobný rostlinám divokého typu Col-0. Tento funkční rozdíl byl vyzkoušen pomocí křížení mutantů *mpk4* a *mpk11*, kdy byl následně pozorován proces opylení květů. Při využití pylu z *mpk11* na bliznu rostliny *mpk4*, došlo k normálnímu opylení a tvorbě semen, jako u divokého typu. Zatímco při opačné situaci, při využití pylu z *mpk4* na bliznu *mpk11*, nedošlo k žádné tvorbě semen (Zeng *et al.*, 2011b). Dále bylo zjištěno, že MAP kinasa MPK11 je aktivována při kontaktu s patogenem, stejně jako další MAP kinasy, například AtMPK4, AtMPK3 a AtMPK6. Při testování reakce na patogen u MPK11 využili peptid elf18 z bakterií nebo ch8 fragment získaný z buněčné stěny hub (Eschen-Lippold *et al.*, 2012).

### 2.5.5 MAP kinasa AtMPK6/AtMPK3

MPK6 je exprimována v celé rostlině. Po podrobném šetření však MPK6 vykazuje zvýšenou expresi v pletivech květů (Bush and Krysan, 2007), buňkách potřebných pro tvorbu průduchů (Wang *et al.*, 2007) a kořenovém meristému (Smékalová *et al.*, 2014b). V epidermálních buňkách kořene *A. thaliana* byla MPK6 lokalizována v plazmatické membráně (Müller *et al.*, 2010).

MPK6 je dalším mediátorem mitotické a cytokinetické progresu s rolí v regulaci orientace roviny dělení buněk (Kohoutová *et al.*, 2015; Müller *et al.*, 2010; Smékalová *et al.*, 2014a). Lokalizace MPK6 *in vivo* v dělicích se buňkách pomocí minimálně invazivní fluorescenční mikroskopie (Light-sheet microscopy, LSM) listu potvrzuje, že kolokalizace MPK6 s mikrotubulárními strukturami, jako je preprofázní svazek (preprofáze band, PPB), mitotické vřeténko a expandující fragmoplast, je závislá na buněčném cyklu. Podobně se MPK6 sdružuje s mitotickými mikrotubulovými vlákny. Je zajímavé, že MPK6 se také asociuje s  $\gamma$ -tubulinem, což naznačuje, že hraje roli v procesech nukleace mikrotubulů (Kohoutová *et al.*, 2015; Smékalová *et al.*, 2014a).

Při fosforylaci MKK7, která následně aktivuje MPK6, dochází k regulaci transportu auxinu přes auxinový transportér PINFORMED1 (PIN1) a tím i větvení výhonků. Regulace tohoto transportéru ovlivňuje polární distribuci auxinu v xylémovém parenchymu a tímto způsobem je ovlivněna i tvorba bočních výhonků (Jia *et al.*, 2016).

V listu se MPK6 lokalizuje v plazmatické membráně ve spojení s LYST-INTERACTING PROTEIN 5 (LIP5), který podporuje formování multivesikulárních tělísek (multivesicular bodies, MVB), která je spojena s odpovědí rostliny na kontakt s patogenem (Wang *et al.*, 2014). MPK6 a MPK3 fosforyluje transkripční faktor SPEECHLESS, který kontroluje první asymetrické dělení průduchů (neboli stomat). Fosforylace probíhá na S/TP motivu omezeném na MPKTD (Lampard *et al.*, 2008). Během stresu solí MPK6 fosforyluje plazmatickou membránu SALINITY OVERLY SENSITIVE 1 (SOS1) Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter poté, co je jeho kinasová aktivita stimulována kyselinou fosfatidovou (Yu *et al.*, 2010).

### 2.5.6 MAP kinasa AtMPK4

MPK4 je exprimována v celé rostlině, ale přednostně se hromadí v meristematických oblastech, včetně špičky kořene a laterálních kořenů primordia (Beck *et al.*, 2011). Na buněčné úrovni se nejvíce MPK4 exprimuje v jádře, cytoplazmě a mikrotubulech, kde ovlivňuje radiální buněčný růst, mitózu a cytokinezi (Beck *et al.*, 2010; Beck *et al.*, 2011).

Dále se exprimuje v ekvatoriální rovině fragmoplastu, kde se podílí na progresi cytokineze (Kosetsu *et al.*, 2010; Suzuki *et al.*, 2016). Bylo popsáno, že gen *MPK4* je silně exprimován v obranných buňkách stomat (Petersen *et al.*, 2000) a že je vyžadována signalizace jasmonovou kyselinou (jasmonic acid, JA) pro jejich uzavření (Suhita *et al.*, 2004).

Během interfáze se protein kinasa MPK4 lokalizuje v jádře buněk (Kosetsu *et al.*, 2010), ale během cytokinézy je exprimován ve fragmoplastu a buněčné desce (Beck *et al.*, 2010, Kosetsu *et al.*, 2010). ANP2, ANP3 a MPK4 mohou souviset se signalizací při růstu kořenových vlásků *A. thaliana*, protože dvojitý mutant *anp2 anp3* a též mutant *mpk4* vykazují podobný fenotyp, kterým je tvorba rozvětvených kořenových vlásků (Beck *et al.*, 2010). Fosforylace PATELLIN2 pomocí MPK4 v jeho doméně Sec14 interferuje s jeho vazebnou afinitou k fosfolipidům, což naznačuje, že MPK4 má roli v dynamice membrán během depozice na cytoticketickou buněčnou desku (Suzuki *et al.*, 2016). Proto se MPK4 kolokalizuje s cytoticketickými strukturami. Po imunolokalizaci byl MPK4 obsažen v celém fragmoplastu (Beck *et al.*, 2011). Když je však MPK4 fúzován buď s GFP nebo YFP, byla lokalizace omezena na střední zónu fragmoplastu a vyvíjející se buněčnou desku (Kosetsu *et al.*, 2010). MPK4 reguluje pro samčí gametofyt specifickou meiotickou cytokinezi během zrání pyly, která neovlivňuje cytokinezi během mitotické fáze mikrosporogeneze (Zeng *et al.*, 2011b).

### 2.5.7 MAP kinasa AtMPK10

K identifikaci potenciálních partnerů mitogen aktivované protein kinasové kaskády pro MPK10 se využil kvasinkový dvouhybridní interakční systém. Přítomnost MAP kinasy MPK10 aktivovalo dvouhybridní systém specificky s MKK2 (Stanko *et al.*, 2014).

MKK2 a její specifická „downstream“ MAP kinasa MPK10, jsou aktivovány abiotickým stresem, jako je vysoká koncentrace soli, stresem z nízkých teplot nebo pomocí MAP3K MEKK1 (Ichimura *et al.*, 2000; Teige *et al.*, 2004; Stanko *et al.*, 2014). MPK10 je exprimována ve velké míře, ale pouze přechodně v sazenicích a v listech v místech vysoké koncentrace auxinu. U mutantů v MPK10 a MKK2 se vyskytovala snížená větvenost cévních svazků. Tudíž propojení MKK2 – MPK10 reguluje tvorbu a větvení cévních svazků změnou účinností polárního auxinového transportu (PAT) (Stanko *et al.*, 2014).

Při testování vlivu transkripce MPK10 na viditelný fenotyp se zjistilo, že mutantní linie *mpk10* nevykazovaly ve srovnání s rostlinami divokého typu Col-0 žádné vady

klíčení nebo změnu v kořenové soustavě. Dále se testovala potenciální funkce MPK10 při hormonálních (kyselina abscisová, indol-3-octová) a abiotických stresových podmínkách (chlorid sodný, kyselina salicylová, stres ze sucha). Ani při těchto testech nebyly pozorovány viditelné rozdíly oproti rostlinám divokého typu (Stanko *et al.*, 2014).

## **2.6 MAP kinasy v tabáku virginském (*Nicotiana tabacum*)**

NtSIPKK aktivuje NtMPK4 (ortolog AtMPK4). NtMPK4 RNAi umlčené rostliny byly citlivé na ozon a při nadexpresi konstitutivně aktivního proteinu SIPKK-EE byly rostliny odolnější vůči ozonu. Pro porovnání fenotypu při nadexpresi SIPKK byly vytvořeny dvě linie, a to divoký typ s nadexpresí SIPKK (SIPKK-OE, overexpression) a konstitutivně aktivní SIPKK-EE. U linie SIPKK-EE se vyskytoval menší vzrůst rostlin oproti SIPKK-OE a vytvořily se u nich lézi podobné chlorotické skvrny na listech. SIPKK-OE linie byly fenotypově podobné rostlinám divokého typu.

NtMPK4 byla exprimována převážně v povrchové vrstvě epidermis na abaxiální straně listů. Vysoká citlivost rostlin s umlčenou expresí *NtMPK4* je způsobena abnormální regulací průduchového otvoru. U rostlin s umlčenou expresí byla naměřena vyšší stomatální vodivost, která měla také vliv na transpiraci. Teplota listů v NtMPK4 RNAi byla významně nižší než teplota rostlin divokého typu. Když byla sledována teplota linií exprimujících SIPKK-EE, byla zjištěna zcela opačná situace, což potvrzuje, že pro uzavření průduchů je nutná aktivita NtMPK4 (Gomi *et al.*, 2005).

Bylo prokázáno, že NtMPK4 funguje v signální dráze jasmonové kyseliny (JA) a její aktivita je nutná pro toleranci vůči ozonu. U rostlin NtMPK4 RNAi se po 3 dnech po vystavení ozonu (0,2 ppm po dobu 4 hodin) vytvořily na listech nekrotické léze, které se u kontrolních rostlin nevytvořily. NtMPK4 je regulována pozitivně JA, tvořenou po poranění rostliny a negativně kyselinu salicylovou (Gomi *et al.*, 2005). Jasmonová kyselina je zapojena do řady signálních drah rostlin a podílí se na regulaci různých stresů (Turner *et al.*, 2002).

NtMPK4 je exprimována po poranění rostliny. Byly provedeny testy vlivu míry exprese protein kinasy NtMPK4 na fenotyp rostliny. Míra exprese NtMPK4 byla měřena po poranění rostliny. U rostlin s NtMPK4 RNAi byl viditelný menší vzrůst oproti rostlinám divokého typu (Gomi *et al.*, 2005).

## **3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **3.1 Materiály**

#### **3.1.1 Použité chemikálie**

70% ethanol (Penta, Česká republika)  
10% hypochlorid sodný (Sigma Aldrich, Německo)  
1 kbp Plus DNA Ladder (Invitrogen, USA)  
6x loading dye (Invitrogen, USA)  
50x TAE (Tris, Acetát, EDTA) (Sigma Aldrich, Německo)  
Acetát (Sigma Aldrich, Německo)  
Agarosa (Sigma Aldrich, Německo)  
Aminostock (Duchefa biochemie, Nizozemí)  
Destilovaná voda  
DNA Gel Loading Dye, 6X (Thermo Fisher Scientific; USA)  
DNase RNase free voda (Thermo Fisher Scientific, USA)  
dNTPs (Thermo Fisher Scientific, USA)  
Dusičnan draselný (KNO<sub>3</sub>) (Sigma Aldrich, Německo)  
EDTA (Kyselina ethylendiamintetraoctová) (Sigma Aldrich, Německo)  
Gamborg B5 basal (Duchefa biochemie, Nizozemí)  
Gambor Vitamin (Duchefa Biochemie, Nizozemí)  
Gellan Gum (AlfaAesar, USA)  
0,1 M Hydroxid draselný (KOH) (Sigma Aldrich, Německo)  
Kanamycin (Duchefa Biochemie, Nizozemí)  
Kinetin (KIN) (Duchefa Biochemie, Nizozemí)  
Kyselina dichlorfenoxyoctová (2,4-*D*) (Duchefa Biochemie, Nizozemí)  
L-Proline (Sigma Aldrich, Německo)  
MiliQ voda (připravená Simplicity Water Purification Systém, Merk, Německo)  
Midori barvivo (Nippon Genetics, Německo)  
Murashige and Skoog basal salt mixture (Duchefa Biochemie, Nizozemí)  
M40-Inositol (Sigma Aldrich, Německo)  
Phire plant Direct PCR Kit (Thermo Fisher Scientific, USA)  
Forward Primer pro PRKK (SS42) (všechny primery od výrobce: Eurofins VBC – Biotech GmbH, Rakousko)  
Reverse Primer pro PRKK (SS43)

Forward Primer (I3F)

Reverse Primer (I3R)

Rifampicin (Duchefa Biochemie, Nizozemí)

Sacharosa (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>) (Sigma Aldrich, Německo)

Síran hořečnatý (MgSO<sub>4</sub>) (Sigma Aldrich, Německo)

Spektinomycin (Duchefa Biochemie, Nizozemí)

Tween 20 (Sigma Aldrich, Německo)

Tris (*tris*(hydroxymethyl)aminomethan) (Sigma Aldrich, Německo)

### 3.1.2 Technický materiál

Okrouhlé Petriho misky (9 cm průměr, výška 1,5 cm, pro 25 ml media) - sterilní (Roth Carl, Německo), vysoké okrouhlé Petriho misky (9 cm průměr, výška 2,5 cm, pro 50 ml media) – sterilní (Phoenix Biomedical, Španělsko), čtvercové Petriho misky (cca 15 cm x 12 cm, výška 1,7 cm, pro 50 ml media) – sterilní (P-LAB, Česká republika), hranaté plastové nádoby pro *in vitro* kultivaci (cca 10,6 cm x 9,5 cm, výška cca 9,5 cm, pro 150 ml media) – sterilní (Innovative, Česká republika), válcovité plastové nádoby pro *in vitro* kultivaci (cca 9 cm průměr, výška 14 cm, pro 250 ml media) – sterilní (Innovative, Česká republika), filtrační papír – sterilní (Papírna Pernštejn, Česká republika), Eppendorf zkumavky (objem 1,5 a 2 ml) (Eppendorf, Německo), Pasteurovy pipety (Roth Carl, Německo), plastová kádinka s ryskou na 1 L (Kartell, Itálie), skleněné láhve určené pro autoklávování roztoků (objem 1 L) (Simax, Česká republika), plastové lžičky, Falkonovy zkumavky (15 ml a 50 ml) (Biofil, Čína), injekční stříkačka, podložní sklíčko (Waldemar Knittel, Německo), krycí sklíčko (22 × 32 mm) (Hirschmann, Česká republika), oboustranná lepící páska, polystyrénová krabice na led, chirurgické pinzety.

### 3.1.3 Poskytnutá data školitelem

Mikroskopické snímky (formát .czi kompatibilní s programem Zen, Zeiss, Německo) semen *M. sativa* divokého typu RSY s označením zdroje sběru semen jako RSY2\_2 a semena z rostlin linie SIMKKi\_2A2 (sběr A1A2A3B1B2B3). Mateřským rostlinám RSY a SIMKKi po aklimatizaci růstu v *ex vitro* podmínkách a po opylení čmeláky *Bombus terrestris* (komerčně zakoupené) byla odebrána zralá semena, která byla následně focena pomocí mikroskopu Axio Zoom V16 školitelem.

Snímky (z Image scanneru III) rostlin *M. sativa* linií RSY a SIMKKi, pro měření fenotypu kořenové soustavy.

Mikroskopické snímky (formát .czi, CLSM) mRFP-značené PRKK transientně exprimované v listech *N. benthamiana* byly poskytnuty od Mgr. Jiřího Sojky (zprostředkováno školitelem) a následně upraveny a exportovány studentkou v programu Zen lite.

Obrázky semen (formát .czi, AxioZoom) i semenáčů (scanner) *M. sativa* byly poslány studentce pro následné procesování dat (měření, zpracování v programu Excel, statistické vyhodnocení t-testem). Některá data byla dále analyzována ANOVA testem v programu SigmaPlot 11.0.

Konstrukty naklonované do *A. tumefaciens*, které byly využity při transientní transformaci prováděné studentkou (leden 2020, bez signálu při experimentu) byly klonovány Dr. Stanislav Isayenkov, Dr. Sci.

Konstrukty pro PRKK-Cas9 byly klonovány Dr. Stanislav Isayenkov, Dr. Sci a transformovány techničkou paní Katarínou Takáčovou. Následně byly školitelem malé rostliny pasážovány v *in vitro* podmínkách a po narostení velikých rostlin přesazeny do půdy v květináčích. Z těchto rostlin byl studentkou odebrán sterilně materiál pro PCR.

#### **3.1.4 Servery a databáze**

Server NCBI – nalezení sekvencí (Ref. 4)

Server Alfalfa Tool box – nalezení sekvencí pro *M. sativa* (Ref. 5)

Server SWISS-MODEL (Ref. 6)

Server Expaty – pro sestavení 3D struktury proteinu (Ref. 7)

Server Expaty translate – pro převedení mRNA do sekvence proteinů a zjištění kódujících oblastí (CDS) (Ref. 8)

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) pro nukleotidy a proteiny (Ref. 9)

Software Agris – analýza promotoru (Ref. 10)

Databáze TAIR (The Arabidopsis Information Resource) (Ref. 11)

Databáze SUBA – zjištění možné subcelulární lokalizace (Ref. 12)

Databáze IntAct EMBL-EBI – databáze molekulárních interakcí (Ref. 13)

Databáze Uniprot – pro porovnání ortologů (Ref. 14)

#### **3.1.5 Programy**

Ape (nalezení otevřeného čtecího rámce, pro zjištění kódujícího úseku DNA) (Ref. 16)

DOG 2.0 (sestavení schéma struktury proteinu, University of Science & Technology, China) (Ref. 17)

ImageJ (vyhodnocení dat ze snímků, National Institutes of Health, USA) (Ref. 18)



Microsoft Office sada (zpracování dat z výsledků, tvorba grafů a jejich úprava, vypracování bakalářské práce, Microsoft, USA)

Zen 3.2 (procesování mikroskopických snímků, Zeiss, Německo) (Ref. 19)

## **3.2 Roztoky a media**

### **Sterilizační roztok (somatická embryogeneze)**

- 4 ml 10% hypochlorid
- 4 µl Tween-20
- Hypochlorid i Tween-20 naředímě v 36 ml destilované vody (finální koncentrace bude 1% hypochlorid a 0,1% Tween-20)

### **Medium B5H**

- 3,1 g/L Gamborg B5 basal
- 0,5 g/L dusičnan draselný (KNO<sub>3</sub>)
- 0,25 g/L síran hořečnatý (MgSO<sub>4</sub>)
- 0,5 g/L L-Proline
- 4,5 g/L Gellan Gum
- Doplnit MiliQ H<sub>2</sub>O do 1 L roztoku
- Upravit pH na 5,7 pomocí 0,1 M KOH
- Po autoklávování přidat sterilně:
- 14,5 ml / 500 ml Aminostock (aminokyseliny)
- 500 µl / 500 ml Gamborg Vitaminy
- 500 µl / 500 ml kinetin (KIN)
- 500 µl / 500 ml Kyselina dichlorfenoxyoctová (2,4-D)

### **Medium B50**

- 3,1 g/L Gamborg B5 basal
- 0,5 g/L dusičnan draselný
- 0,25 g/L síran hořečnatý
- 0,5 g/L L-Proline
- 30 g/L Sacharosa
- Doplnit MiliQ vodou do objemu 1 litru roztoku
- 4,5 g/L Gellan gum
- Upravit pH na 5,7 pomocí 0,1 M KOH

- Po autoklávování přidat sterilně:
- 14,5 ml/500 ml Aminostock
- 500 µl/500 ml Gamborg vitaminy

#### **Medium MMS**

- 4,3 g/L MS basal
- 0,1 g/L M40-Inositol
- 30 g/L Sacharosa
- 4,5 g/L Gellan gum
- pH 5,7 upraveno pomocí 0,1 M hydroxidu draselného

#### **Medium MS (Murashige and Skoog)**

- MiliQ voda
- 30 g/L Sacharosa
- 4,3 g/L MS basal salt mixture
- 4,5 g/L Gellan gum
- Upravit pH na 5,7 pomocí 0,1 M KOH

#### **Medium LB (lysogeny broth)**

- 0,25 g LB media
- 10 ml MiliQ vody
- Upravit pH na 7,2 pomocí 0,1 M KOH

#### **Medium LB s přidavkem antibiotik a startovací bakteriální kultury**

- 0,25 g LB media
- 10 mL MiliQ vody
- Upravit pH na 7,2 pomocí 0,1 M KOH
- 20 µl SPE 50 mg/ml (ve finální koncentraci 100 µl/ml, ředění 1:500)
- 20 µl RIF 50 mg/ml (ve finální koncentraci 100 µl/ml, ředění 1:500)
- 15 µl bakteriální kultury *A. tumefaciens* 35S::*PRKK:mRFP* v pGWB454

#### **Inokulační medium**

- 1,96 g/L bezvodého MES
- 10 g/L 1 M chlorid hořečnatý
- 1 ml/L 150 mM acetosyringon

- Úprava pH na 5,6 pomocí 1 M a 0,1 M hydroxidu draselného

#### **Master mix pro PCR**

- 20 µl Dilution Buffer
- PCR H<sub>2</sub>O
- 5x PCR Buffer
- 10 µM dNTPs
- 10 µM forward primer (SS42)
- 10 µM reverse primer (SS43)
- Phire polymerase II
- Templát DNA

#### **50x TAE**

- 242 g/L Tris
- 57,1/L ml acetát
- 100 ml/L 0,5 M EDTA (pH 8,0)
- Do 1 L roztoku doplnit destilovanou vodou
- Pro přípravu 1x TAE roztoku se smíchá 20 ml 50x TAE a 980 ml destilované vody

#### **Elektroforetický gel (1%)**

- 100 ml 1x TAE pufr
- 1 g agarosa
- 1 µl MIDORI barvivo
- Aparatura BIO-RAD pro elektroforézu na agarosovém gelu

### **3.3 Biologický materiál**

*Medicago sativa* kultivar RSY (Regen SY)

*Nicotiana benthamiana*

Bakteriální kultura *Agrobacterium tumefaciens* 35S::*PRKK:mRFP* v pGWB454

### **3.4 Použité přístroje**

Analytické váhy (XA 110/2X, RADWAG, Česká republika)

Aparatura pro elektroforézu Wide MiniSub Cell GT (BioRad, USA)

Autokláv Sterrivap HP IL (MMM Group, Německo)

Automatické pipety (Eppendorf, Německo)

Centrifuga (Allegra 64 R, Beckman Coulter, USA)  
Elektromagnetická míchačka MSH-420 (BOECO, Germany)  
Fytotronová komora (Weiss Gallenkamp, Německo)  
Molecular imager pro detekci fragmentů z gelu (Bio Rad, USA)  
Hlubokomrazící box MDF-U500VX-PE (Panasonic, Japonsko)  
Image Scanner III (GE Healthcare, USA)  
Konfokální mikroskop LSM 710 (Zeiss, Německo)  
Laminární box Biohazard (Merci, Česká republika)  
Mikrovlnná trouba (MHE21 HITACHI, Japonsko)  
Mraznička LIE G 5216 513L (Liebherr Comfort, Německo)  
PCR cykler (T100 Thermal Cycler, BioRad, USA)  
pH metr PC 2700 (Eutech Instruments, USA)  
Spektrofotometr Infinite M Nano (Tecan, Švýcarsko)  
Stereo zoom mikroskop (Zeiss, Německo)  
Výrobek deionizované vody Simplicity water purification system (Merck Millipore, USA)  
Zdroj napětí pro elektroforézu (PowerPac Basic, Bio Rad, USA)

## **3.5 Metodika**

### **3.5.1 *In silico* analýzy**

#### **3.5.1.1 Tvorba 3D struktury MAPK kinas**

Nejdříve byla nalezena sekvence proteinů SIMKK (označení CAC69137.1) a PRKK (označení MsPRKK\_MSAD\_280536 a MsPRKK\_MSAD\_280548) ve FASTA formátu pomocí databáze NCBI (Ref. 4) a Alfalfa Tool box (Ref. 5). Tato sekvence se dále použila na sestavení 3D modelu pomocí serveru SWISS-MODEL (Ref. 6), který automaticky sestavuje proteinové struktury na základě homologních sekvencí, a to přes server Expasy (Ref. 7). Po zadání FASTA formátu na server SWISS-MODEL byl vygenerován 3D model této sekvence. S modelem bylo možné otáčet, vyznačit si na něm určité specifické části (například serinové a threoninové sekvence, proteiny aromatické, alifatické, polární a další).

#### **3.5.1.2 Porovnání sekvencí nukleotidů a proteinů pomocí serveru BLAST**

Pro nalezení porovnávaných sekvencí ve FASTA formátu byly využity servery NCBI (Ref. 4) a Alfalfa Tool box (Ref. 5). Na serveru NCBI se zadalo, jestli je hledaná sekvence

proteinů nebo nukleotidů a zadal se název porovnávané MAPK kinasy (například MKK1 *Arabidopsis thaliana*). Pro sekvence nukleotidů a proteinů v *M. sativa* byl využit sever Alfafatoolbox, jelikož na serveru NCBI nebylo možné najít sekvence obou verzí nukleotidů i proteinů PRKK (MsPRKK\_MSAD\_280536 (PRKK\_36) a MsPRKK\_MSAD\_250548 (PRKK\_48)). Pro vyhledání sekvencí byly využity celé názvy obou verzí genu. Pro následné porovnání sekvencí byly využity sekvence nukleotidů CDS a sekvence proteinu MsPRKK\_36, MsPRKK\_48, AtMKK1 a AtMKK2. Na obou serverech NCBI i Alfafatoolbox při hledání sekvencí nukleotidů byly nalezeny mRNA sekvence (které obsahují i různé dlouhé nekódující části sekvence), ze kterých se následně získaly sekvence CDS (coding sequence). Nejdříve se přímo v sekvenci v programu Microsoft Word pomocí funkce Najít vyhledaly sekvence možných start kodonů (ATG, methionin). Následně se sekvence od tohoto možného start kodonu zkopírovala na server Expasy/translate (Ref. 8), který převedl tuto sekvenci na protein. Podle toho se zjišťovala délka fungujícího čtecího rámce, a tudíž i jak vycházejí triplety nukleotidů, než narazí na stop kodón (při nesprávném start kodónu byl často čtecí rámec zastaven po několika aminokyselinách). Pro automatické vyhledávání otevřených čtecích rámců lze využít program Ape, který našel správný start kodón, aby vycházel počet aminokyselin podle sekvence proteinu známé z databáze NCBI nebo Alfafatoolbox. Poté bylo na serveru BLAST (Ref. 9) vybráno, jestli jsou porovnávané sekvence proteinů nebo nukleotidů (Protein BLAST, Nucleotide BLAST). Byla zvolena možnost porovnání dvou a více sekvencí. Následně byly získané FASTA formáty porovnávaných MAPK kinas vloženy do kolonek určených pro sekvence ve FASTA formátu. U BLAST nukleotidů byla podle podobnosti sekvencí vybrána optimalizace procesu (discontiguous megablast). Po zadání všech hodnot server porovnal sekvence a určil míru jejich podobnosti i porovnání celých sekvencí.

### **3.5.1.3 Analýza promotoru pomocí serveru Agris**

Server Agris (Ref. 10) se využívá pro analýzu promotoru pro geny *A. thaliana*. Na domovské stránce serveru se v menu vybere AtcisDB vyhledávání, do kterého se vloží název lokusu AT4G29810 (pro gen *MKK2*), který byl zjištěn na serveru TAIR (Ref. 11). Na serveru TAIR byl do vyhledávače zadán název proteinu (například *MKK2*) a následně byl zobrazen název lokusu. Po zadání názvu lokusu do vyhledávače serveru Agris, byly nalezeny transkripční faktory promotoru, jejich umístění v genomu, sekvence vazebného místa a vazebná místa transkripčních faktorů (binding site family/TF). Poté byly podle

seznamu vazebných míst a zadaných referencí na serveru Agris dohledány funkce jednotlivých transkripčních faktorů.

#### **3.5.1.4 Server TAIR pro zjištění hladin transkriptů a možných polymorfismů genu**

Dále byl server TAIR (Ref. 11) využit pro zjištění hladiny transkriptů v různých pletivech, během vývinu a stresu v *A. thaliana*, pro identifikaci možných mutací a dohledání proteinových domén. Do serveru TAIR byl zadán název proteinu našeho zájmu a server vyhledal možné lokusy nejlépe odpovídající zadánému názvu. Po výběru lokusu server ukáže informace o daném proteinu, jako například mapu s jeho strukturami, lokalizaci v buňce, funkci v rostlině a další. Na serveru lze najít také velikosti hladin transkriptů v různých pletivech podle stádia vývinu rostliny a působícího stresu (lze dohledat vliv biotického a abiotického stresu, chemikálií, hormonů, hladiny transkriptů dle vývoje rostliny, při klíčení semen, lokalizaci transkriptů v buňce). Dále na serveru TAIR lze vyhledat možné polymorfismy, jejich název, typ a mutagen, umístění, délku a sekvenci, koordináty daného polymorfismu a další informace).

#### **3.5.1.5 Databáze SUBA pro zjištění možných subcelulárních lokalizací proteinů**

SUBA (Ref. 12) je databáze, která slouží k vyhledávání subcelulárních lokalizací proteinů *A. thaliana*. Na domovské stránce je vyhledávací okno označené jako „Quick search“ do kterého se zadá název lokusu, který byl zjištěn na serveru TAIR (viz 3.5.1.3). Po zadání názvu lokusu do okna vyhledávače databáze vyhledá možné subcelulární lokalizace proteinu.

#### **3.5.1.6 Databáze IntAct EMBL-EBI pro možné protein-proteinové interakce**

Pro zjištění možných interakcí mezi proteiny v *A. thaliana* byla využita databáze IntAct EMBL-EBI (Ref. 13). Do vyhledávače v databázi se zadá název proteinu zájmu (například MKK2) a databáze vytvoří seznam všech interagujících proteinů, které reagují s proteinem stejného názvu, který byl zadán. Nad tabulkou interagujících proteinů je možnost specifikovat protein zájmu (pomocí záložky Interactors) a to tak, že vybereme studovaný druh. Tím se zúží seznam interagujících proteinů. V tabulce, kde jsou vypsané interagující proteiny, jsou uvedeny názvy obou proteinů, dále metoda, kterou byla interakce detekována, databáze a článek, ze které tyto informace pochází. Dále se pomocí databáze Uniprot (Ref. 14) zjišťovalo, které ortology v *M. sativa* odpovídají interagujícím proteinům. Na databázi Uniprot byl nalezen daný protein a pomocí funkce BLAST byly

nalezeny podobné proteiny v jiných organismech seřazené podle procentuální podobnosti. V seznamu organismů, byla nalezena *M. sativa* a tím zjištěn i ortolog.

### **3.5.1.7 Program DOG 2.0 pro znázornění struktury proteinu**

Tento program byl využit pro znázornění rozložení proteinových domén ve struktuře proteinu a pro umístění vazebných míst transkripčních faktorů. Nejdříve je potřeba vědět délku samotného proteinu zájmu, která lze zjistit přes server TAIR (viz 3.5.1.4), kde lze najít informace o proteinu, jeho označení, délka sekvence a obsažené proteinové domény (pro MKK2 to je AT4G29810.2). Po rozkliknutí označení proteinu lze vidět označení a lokalizace jednotlivých proteinových domén, které následně lze nanést na sekvenci proteinu v programu DOG 2.0. Dále byl tento program využit pro znázornění lokalizace vazebných míst transkripčních faktorů. Jejich lokalizaci lze zjistit ze serveru Agris (viz 3.5.1.3). Po otevření programu DOG 2.0 se nejdříve zadá délka samotného proteinu. Poté se zadají lokalizace proteinových domén nebo transkripčních faktorů (pomocí Domain pro delší úseky proteinových domén a Site pro zaznamenání určitého místa, což bylo využito pro zaznačení místa možných mutací) a jejich popisy a názvy se uspořádají na struktuře proteinu tak, aby bylo vše dobře viditelné a jednotlivé údaje se nepřekrývaly.

### **3.5.2 Procesování dat k porovnání fenotypu *M. sativa* linie SIMKKi**

#### **3.5.2.1 Procesování mikroskopických snímků v programu Zen 3.2**

Po otevření programu Zen 3.2 a vybrání mikroskopických snímků, je potřeba vložit měřítko, které se vkládá přes záložku Graphics, kde se kromě měřítka mohou dodat do snímku šipky nebo čtverce pro označení různých struktur. Dále se v záložce Display upraví kontrast barev jednotlivých světelných kanálů, a to pomocí vlnových délek označených jako Black a White (krajní šipky v histogramu), dokud nebude žádaná struktura co nejlépe viditelná. Pokud jsou snímky nafocené ve více rovinách a je vytvořený Z-stack, je potřeba si z něj vytvořit jeden snímek pomocí metody Orthogonal projection (která lze najít v záložce Processing), ve kterém je potřeba si vybrat, které vrstvy vzniklé proostřováním objektu jsou důležité. Po úpravě snímků se vyexportují do formátu JPEG nebo TIFF pomocí metody Image export.

#### **3.5.2.2 Měření hodnot ze snímků v programu ImageJ**

Program ImageJ slouží pro měření parametrů z fotek, jako jsou například délka, šířka, perimetr, počet, obvod, kruhovitost, plocha a další. Pro tuto bakalářskou práci byly využity parametry plochy, délky, šířky a kruhovitosti. Po vybrání zpracovávaného

obrázku je potřeba si nastavit měřítko, aby program mohl vzdálenost z pixelů převádět na zadané jednotky (například cm), proto je potřeba mít na daném obrázku měřítko nebo jinou známou vzdálenost. Po nastavení měřítka je potřeba nastavit, které hodnoty budou měřeny (Measurements). Poté se využije některá z funkcí pro změření dat (například rovná čára, segmentovaná čára, čára pro obrys tvarů), která vyhodnotí výsledky (Measurements) podle zvolených parametrů. Tyto výsledky se poté využijí pro další zpracování. Hodnoty se nemusejí měřit pouze ručně, ale v programu ImageJ funguje i automatické měření, podle barev měřených struktur. Pro tuto funkci je potřeba mít měřené struktury barevně výrazně odlišné od pozadí (kontrastní barvy nastaví funkce Treshold) a pokud se vzájemně tyto struktury dotýkají, tak je potřeba je od sebe oddělit (udělat mezi nimi čáru v barvě pozadí). Poté pomocí funkce Analyze particles lze změřit automaticky hodnoty jednotlivých struktur.

### **3.5.3 Somatická embryogeneze**

#### **3.5.3.1 Sterilizace listů *Medicago sativa* RSY pro somatickou embryogenezi**

Listy byly promyty v 70 % ethanolu po dobu 10 sekund z důvodu odmaštění a očištění listů. Pro sterilizaci listů byl využit sterilizační roztok s následovným zásobním složením: 36 ml destilované vody, 4 ml 10% hypochloridu a 4  $\mu$ l Tween roztoku (po naředění s destilovanou vodou vznikne roztok s 1% hypochloridem a 0,1% Tweenem), ve které se listy sterilizovaly po dobu 1,5 min. Zbytek sterilizačního roztoku byl vymyt sterilní destilovanou vodou v plastové Eppendorf zkumavce, ve které byly listy 5 krát promyty (vždy v nové destilované vodě) vždy po dobu 3 min. Veškeré roztoky se přenášely sterilní Pasteurovou pipetou. Listy byly osušeny na sterilním filtračním papíru, nařezány skalpelem a byly vloženy na tuhé medium B5H v okrouhlých Petriho miskách. Celá práce byla vykonávána ve sterilních podmínkách. Listy *M. sativa* RSY na mediu B5H byly vloženy do fytotronu (světelný režim 16 hodin/8 hodin o intenzitě světla 60 až 80  $\mu$ E.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, teplota 21 °C a vlhkost vzduchu 70 %)

#### **3.5.3.2 Příprava media B5H pro buněčnou dediferenciaci a růst kalusů**

Pro přípravu 1 L media bylo k 800 ml MiliQ vody v plastové kádince (s riskou pro 1 L) přidáno 3,1 g GAMBORG B5 basal, 0,5 g KNO<sub>3</sub>, dále 0,25 g MgSO<sub>4</sub>, poté 0,5 g L-PROLINE a 30 g sacharosy. Po řádném rozmíchání na elektromagnetické míchače bylo přidáno 4,5 g Gellan gum. Po přidání všech složek bylo upraveno pH na hodnotu 5,7. Do kádinky byla dolita MiliQ voda do 1 L. Medium B5 se nechalo autoklávovat ve dvou 1 L láhvích v objemu 500 ml. Po autoklávování a vychlazení media B5 v inkubátoru na 55



°C bylo k mediu přidáno 29 ml/L Aminostock, 1 ml/L Gambor vitaminy, dále 1 ml/L kinetin a 1 ml/L 2,4-D. Medium bylo rozděleno do 40 okrouhlých Petriho misek (výška 1,5 cm) po 25 ml a nechalo se zatuhnout.

### **3.5.3.3 Příprava media B50 pro buněčnou diferenciaci a růst somatických embrií**

Pro přípravu 1 L media bylo k 800 ml MiliQ vody v plastové kádince (s riskou pro 1 L) přidáno 3,1 g GAMBORG B5 basal, 0,5 g KNO<sub>3</sub>, dále 0,25 g MgSO<sub>4</sub>, poté 0,5 g L-PROLINE a 30 g sacharosy. Po řádném rozmíchání na elektromagnetické míchačce bylo přidáno 4,5 g Gellan gum. Po přidání všech složek bylo upraveno pH na hodnotu 5,7. Do kádinky byla dolita MiliQ voda do 1 L. Medium B5 se nechalo autoklávovat ve dvou 1 L láhvích v objemu 500 ml. Po autoklávování a vychlazení media B5 v inkubátoru na 55 °C bylo k mediu přidáno 29 ml/L Aminostock, 1 ml/L Gambor vitaminy. Po přidání všech složek bylo medium rozlito po 25 ml do 40 kulatých Petriho misek (výška 1,5 cm), ve kterých zatuhlo. Z media B5H se na medium B50 přesadily vytvořené kalusy *M. sativa*.

### **3.5.3.4 Příprava media MMS pro růst kořenů ze somatických embrií**

Pro přípravu 1 L MMS media bylo odměřeno 800 ml MiliQ vody, do které se odvážilo 4,3 g/L MS basal salt mixture, 0,1 g/L M40-inositolu, 30 g/L sacharosy a 4,5 g/L Gellan gum. Všechny složky se rozpustili v MiliQ vodě. Bylo upraveno pH na hodnotu 5,7 pomocí 1 M a 0,1 M hydroxidu draselného. Poté se doplnila MiliQ voda do 1 litru media. Medium bylo rozlito do dvou 1 L skleněných lahví, které byly vloženy do autoklávu. Po proběhnutí autoklávu bylo medium rozlito po 25 ml do 40 kulatých Petriho misek (výška 1,5 cm) a na medium byly přesazeny somatická embrya *M. sativa*, které narostly na mediu B50.

### **3.5.3.5 Příprava media MS**

Pro 1 L media bylo odměřeno 800 ml MiliQ vody. Bylo odváženo 4,3 g/L MS basal salt mixture, poté 30 g/L Sacharosy a 4,5 g/L Gellan gum. Bylo upraveno pH pomocí roztoku hydroxidu draselného o koncentraci 1 M a 0,1 M na hodnotu 5,7. Poté se doplnila MiliQ voda do 1 litru media. Poté bylo medium autoklávováno a po vychlazení rozlito do okrouhlých Petriho misek po 25 ml. Do těchto Petriho misek byla přesazena somatická embrya *M. sativa* RSY s narostlými kořeny z media MMS. Následně se vzniklé mladé rostliny přesazovaly do vysokých okrouhlých Petriho misek po 50 ml a dále do větších nádob hranatých (150 ml) a válcových (250 ml) podle velikosti přesazované rostliny. Případně se mohou mladé rostliny přeložit do čtvercových Petriho misek s 50 ml

zatuhlým MS mediem nebo jiným, př. Fähreus medium bez dusíku (Fähreus, 1957) pro následné analýzy kořenové soustavy.

#### **3.5.4 Transientní transformace rostlin**

Transientní transformace rostlin *Nicotiana benthamiana* (druh tabáku) byla provedena pomocí *Agrobacterium tumefaciens*, kmen GV3101 obsahující konstrukt *35S::PRKK:mRFP* v plasmidu pGWB454 obsahující gen rezistence vůči antibiotiku spektinomycinu (SPE<sup>R</sup> - využívaného pro selekci bakteriálních kolonií obsahující daný gen rezistence) a gen rezistence vůči kanamycinu (KAN<sup>R</sup> - slouží k selekci transformované rostliny). Startovací kultura *A. tumefaciens 35S::PRKK:mRFP* byla kultivována v 10 ml tekutého LB media (v 50 ml sterilní Falconově zkumavce, byly připraveny 2 opakování kultury) s přidavkem spektinomycinu (100 µg/ml) a rifampicinu (100 µg/ml), pro růst bakterií a namnožení kultury. Byla změřena optická hustota kultury *A. tumefaciens 35S::PRKK:mRFP* pomocí spektrofotometru při 600 nm (OD<sub>600</sub>). Hodnota optické hustoty vzorku byla využita pro výpočet množství využité kultury a inokulačního media pro transientní transformaci. Kultura *A. tumefaciens* (2x Falconova zkumavka proti sobě) byla nejdříve vložena do centrifugy po dobu 10 min při 4°C. Poté se kultura *A. tumefaciens* promyla v inokulačním mediu (2-krát centrifugace a promytí), ve kterém se kultura finálně resuspendovala a nechala se dvě hodiny inkubovat při pokojové teplotě. Po inkubaci se kultura *A. tumefaciens* infiltrovala přes stomata do listů *N. benthamiana* pomocí plastové injekční sříkačky (1-2 ml objem) bez jehly. Za 3 dny po infiltraci (3DAT, days after transformation) byly vystříženy infiltrované části listů (ve tvaru trojúhelníku) a z těchto vzorků byly vytvořeny preparáty, které byly pozorovány v konfokálním laserovém skenovacím mikroskopu (CLSM, confocal laser scanning microscopy) za použití objektivu 20/0,80 NA pro ověření fluorescence konstruktu (jestli dochází k nadexpresi fúzního proteinu PRKK-mRFP) a provedení lokalizačních experimentů.

#### **3.5.5 PCR (polynucleotid chain reaction)**

Vzorky listů (z rostlin pěstovaných v *in vitro* podmínkách) o velikosti přibližně 1 mm<sup>2</sup> z *M. sativa* PRKK Cas9-G3 rostlin byly sterilně odebrány pomocí pinzety a nůžek a byly roztlačeny v pufru pro izolaci a stabilizaci DNA (Dilution Buffer). Vzorek se poté nechal inkubovat na ledu po dobu půl hodiny. Následně byl vzorek vložen do mini-centrifugy (pro stripy a 200 µl PCR zkumavky) a čirý supernatant s uvolněnou DNA se odpipetoval do PCR zkumavek. Spolu byly připraveny 2 Master mixy (Tabulka 1). První pro testování

přítomnosti transgenů v *M. sativa* PRKK Cas9-G3 pomocí primerů SS42 a SS43 (Tabulka 1) a druhý pro testování přítomnosti izolované DNA (kontrola kvality rychlé metody izolace) z *M. sativa* pomocí primerů I3 Forward a Reverse (I3FR, jedná se o sekvenci na intronu 3 *MMK3* genu z *M. sativa*). Postup přípravy Master mixu je následovný: PCR voda (DNase and RNase free water, autoklárována a poté zmrazena v 2 ml alikvótách), 5x PCR Pufr, 10 mM dNTPs, 10  $\mu$ M Forward a 10  $\mu$ M Reverse Primery, Phire Polymerase II (Tabulka 2) a nakonec po rozmýchání Master mixu a rozpipetování do PCR zkumavek po 9,5  $\mu$ l se přidal templát DNA (0,5  $\mu$ l na reakci) z připraveného vzorku *M. sativa*. Připravené PCR reakce byly vloženy do Thermocycleru, ve kterém proběhla PCR reakce podle zadaného cyklu (Tabulka 3).

Tabulka 1: Seznam použitých primerů pro PCR

Typ primeru	Název	Sekvence
Forward Primer	SS42	5'-TCCCAGGATTAGAATGATTAGG-3'
Reverse Primer	SS43	5'-CGACTAAGGGTTTCTTATATGC-3'
Forward Primer	I3F	5'-TGGGGAGCTTACTGATATAG-3'
Reverse Primer	I3R	5'-AGATCTCGGTGCAAAAC-3'

Tabulka 2: Složení PCR reakce pro testování přítomnosti transgenů v *M. sativa* PRKK Cas9-G3

Složení PCR reakce	1x Master mix SS42+43 (10 µl)	1x Master mix I3FR (10 µl)	Přepočít složek na 20 vzorek (µl)
PCR H <sub>2</sub> O	6,1	6,1	122
5x PCR Pufr	2	2	40
10 mM dNTPs	0,2	0,2	4
10 µM Forward primer	0,5	0,5	10
10 µM Reverse primer	0,5	0,5	10
Phire polymerase II	0,2	0,2	4
Templát DNA	0,5	0,5	10

Tabulka 3: PCR cyklus v Thermocycleru

Fáze	Název fáze	Teplota	Čas
1.	Úvodní denaturace	98 °C	30 s
2.	Denaturace	98 °C	30 s
3.	Anelace	57 °C	30 s
4.	Polymerizace	72 °C	60 s
5.	Opakování termocyklu	39x opakování fáze 2 - 4	
6.	Finální polymerizace	72 °C	600 s
7.	Ochlazení vzorku	12 °C	∞

### 3.5.6 Separace DNA fragmentu v 1% agarosovém gelu

Separace amplifikovaného fragmentu genu PRKK Cas9-G3 ze vzorku *M. sativa* pomocí elektroforézy v 1% agarosovém gelu byla vykonána následovně. První se přichystal roztok 1x TAE (Tris, acetát, EDTA) z 50x TAE pufru následovným ředěním: 20 ml 50x TAE bylo naředěno v 980 ml destilované vody. Dále byl nachystán 1% agarosový gel z

1 g Agarosy a 100 ml 1x TAE pufru. Agarosa byla rozpuštěna v mikrovlnné troubě při občasném promíchání. Byla připravena aparatura pro elektroforézu. Po zchlazení gelu se do něho přidalo 1  $\mu$ l Midori barviva, které obarví DNA pro vizualizaci (v přístroji Molecular Imager BIO-RAD s UV detekcí) a gel byl rozlit do elektroforetické aparatury (případné bubliny byly plastovou špičkou přesunuty na okraje gelu), byl přidán hřeben (nebo dva nad sebe do pozice 1 a 3 pro drážky pro hřeben) a následně gel během 15 min ztuhnul. Gel byl po ztuhnutí přenesen do elektroforetické vany a zalit 1x TAE pufrům s hladinou asi 1-2 mm nad gelem. Byl vytáhnut hřeben/y a do jamek pro nanášení vzorek se vлил elektroforetický pufr. Jamky byly okometricky zkontrolovány před nanášením vzorků (případné poškozené jamky byly vynechány při nanášení vzorku). Do jednotlivých vzorků získaných po amplifikaci v PCR Thermocycleru se přidalo 2  $\mu$ l 6x DNA vzorkovacího „6x loading dye“ barviva, které slouží k přípravě DNA vzorku, aby klesnul do jamky (glycerol) a také obsahuje dva markry (bromofenolovou modrou a xylene cyanol FF) které se používají ke sledování migrace DNA během elektroforézy na agarosovém gelu. Do krajních jamek na gelu bylo pipetováno po 1,5  $\mu$ l standardu molekulových hmotností (1 kbp Plus DNA Ladder). Jednotlivé vzorky po amplifikaci a přidání vzorkovacího barviva byly pipetovány do jamek v elektroforetickém gelu. Elektroforetická aparatura byla zapojena do zdroje elektrického napětí a nastavena na konstantní napětí 90 V, na dobu 40 min. Po proběhnutí elektroforézy byl gel vytáhnut z aparatury a vyhodnocen pomocí Molecular Imager a programu Epson Scan.

## 4 VÝSLEDKY

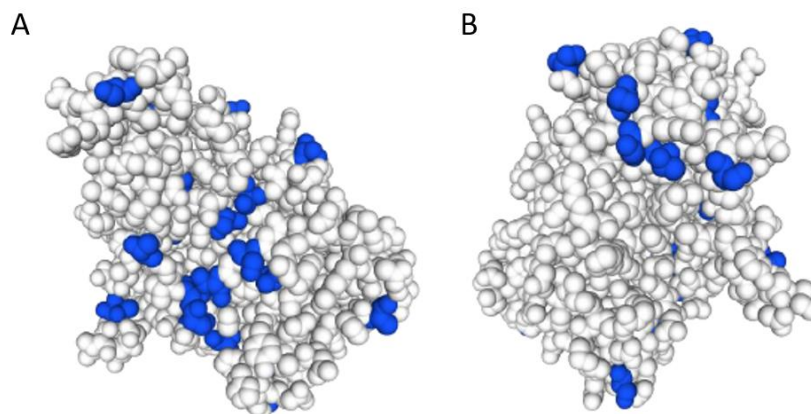
### 4.1 *In silico* analýzy

Tato část bakalářské práce je zaměřena na *in silico* analýzu MsSIMKK a MsPRKK a jejich ortologů AtMKK4 a AtMKK2. Větší zaměření na *in silico* analýzy bylo z důvodu nemožnosti přístupu do laboratoří kvůli epidemiologické situaci. Při analýze MAPK kinas v *M. sativa* byly vytvořeny jejich 3D modely a sekvence jejich proteinů a nukleotidů byly porovnány se sekvencemi jejich ortologů v *A. thaliana*. *In silico* analýza ortologů MKK4 a MKK2 byla provedena kvůli jejich podobnosti se studovanými SIMKK a PRKK, tudíž by bylo možné ze získaných dat navrhnout vlastnosti, které by mohly mít i SIMKK nebo PRKK, což by se mohlo následně otestovat prakticky v laboratoři. Pomocí serveru Agris byla zjištěna umístění vazebných míst transkripčních faktorů na MKK4 a MKK2. Dále pomocí serveru TAIR byla zjištěna hladina transkriptů obou MAPK kinas v *A. thaliana*, a to během vývoje rostliny a při reakci na různé stresové podněty. Na serveru TAIR se také zjistily možné polymorfismy v obou genech a jaké mají proteinové domény, jejichž umístění se nanese na struktury proteinů MKK4 a MKK2. Dále byly pomocí serveru SUBA zjištěny možné subcelulární lokalizace transkriptů a pro zjištění možných protein-proteinových interakcí byl využit server IntAct EMBL-EBI.

#### 4.1.1 *In silico* analýza MsSIMKK

##### 4.1.1.1 Sestavení 3D struktury MsSIMKK

Pro vytvoření 3D modelu (viz 3.5.1.1) MsSIMKK (Obr. 6) byl využit server SWISS-MODEL. Na vytvořeném modelu vidíme, že umístění Ser/Thr sekvencí (označené modře) je převážně na povrchu struktury, což je důležité pro jejich fosforylaci a tím i aktivaci MAP kinasy.



Obrázek 6: 3D struktura MsSIMKK s vyznačenými Ser/Thr sekvencemi. Vytvořeno na SWISS-MODEL (Ref. 6). **A**, **B** Stejný model ze dvou opačných stran.

#### 4.1.1.2 Porovnání MsSIMKK s ortology AtMKK4 a AtMKK5

Pomocí programu Blast (Ref. 9) byly porovnány sekvence proteinů (BlastP) MsSIMKK AtMKK4 a AtMKK5 (Tabulka 4). Dále byly porovnávány kódující sekvence nukleotidů (coding sequence, CDS) pomocí BlastN *MsSIMKK* s CDS *AtMKK4* a *AtMKK5* (Tabulka 4) (viz 3.5.1.2). Největší homologie sekvencí proteinů byla detekována mezi MsSIMKK a AtMKK4. U sekvencí nukleotidů byla nalezena o něco málo vyšší homologie mezi *MsSIMKK* a *AtMKK5*.

Tabulka 4: Porovnání sekvencí proteinů (BlastP) a nukleotidů (BlastN) mezi sekvencemi MsSIMKK a AtMKK4 a AtMKK5

Porovnávaná MAPK kinasa	BlastP SIMKK		BlastN SIMKK	
	Procentuální identita	E-value	Procentuální identita	E-value
AtMKK4	68,04 %	$6 \cdot 10^{-172}$	75,03 %	$2 \cdot 10^{-143}$
AtMKK5	66,02 %	$4 \cdot 10^{-165}$	75,90 %	$3 \cdot 10^{-154}$

## 4.1.2 *In silico* analýza AtMKK4

### 4.1.2.1 *In silico* analýza promotoru

Pro *in silico* analýzu promotoru genu *AtMMK4* (viz 3.5.1.3), který je umístěný na chromozomu 1 v *A. thaliana*, byl využit software Agris (Ref. 10), který identifikoval vazebná místa pro transkripční faktory (Tabulka 5; Obr. 7): Byly detekovány transkripční faktory, které se účastní vývoje rostliny, a to RAV1-A, který zabraňuje nadměrnému růstu rostliny (Kagaya *et al.*, 1999) a LFY (LEAFY), který má vliv na raný rozvoj dělivého pletiva generativních orgánů. LFY funguje v synergii s *APETALA1*, *CAULIFLOWER* a *AGAMOUS*, které přímo aktivuje (Lamb *et al.*, 2002).

Při buněčném zrání a proliferaci buněk je využit transkripční faktor GATA, který se váže na sekvenci nukleotidů DNA „GATA“ (Teakle *et al.*, 2002). Transkripční faktor Telo-box (Telomere motif) se podílí na regulaci exprese genu pro beta-glukuronidázu v buňkách kořenového primordia (Tremousaygue *et al.*, 1999).

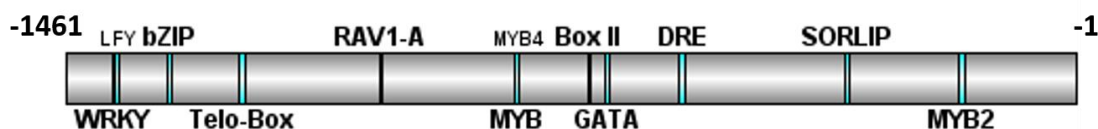
Při reakci rostliny na stres byly identifikovány transkripční faktory MYB skupiny (MYB, MYB2 a MYB4), které se účastní řady obranných odpovědí, převážně reagují na abiotický stres, jako je nadměrné zasolení, dehydratace nebo UV-B záření (Sablowski *et al.*, 1994, Abe *et al.*, 1997, Chen *et al.*, 2002). Dále transkripční faktor bZIP ovlivňuje rostlinu při změnách světla (Abe *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1997; Satoh *et al.*, 2004). Dalším transkripčním faktorem, který se zapojuje do odpovědi rostliny na světlo, je SORLIP: Tento transkripční faktor je nadměrně zastoupený v promotoru, jejichž aktivita je indukována světlem (Hudson and Quail, 2003). Transkripční faktor Box II má vliv na funkci regulačních cis-elementů, které se podílí na reakci na světlo. Tento transkripční faktor je aktivován fytochromem A (Le Gourrierc *et al.*, 1999). WRKY reguluje expresi genu NPR1 (nonexpressor of PR genes 1) má vliv na velkou řadu reakcí, a to na biotické i abiotické stresy (Yu *et al.*, 2001). Posledním transkripčním faktorem je DRE, který se účastní odpovědi rostliny na abiotický stres, a to na dehydrataci a nízké teploty (Chen *et al.*, 2002).

Z detekovaných transkripčních faktorů lze usoudit, že gen *AtMKK4* reguluje růst a kvetení *A. thaliana*, dále se podílí na proliferaci buněk a tvorbě beta-glukuronidázy. Velký vliv má na reakci rostliny na abiotický stres, a to na reakci na světlo nebo také na zasolení.



Tabulka 5: Vazebná místa pro transkripční faktory na promotoru genu *AtMKK4*.

Transkripční faktor	Vazebná místa (bp)		Sekvence nukleotidů	Reference
	Začátek	Konec		
bZIP	-153	-148	actcat	Abe <i>et al.</i> , 1997; Kim <i>et al.</i> , 1997; Satoh <i>et al.</i> , 2004
WRKY	-73	-68	ttgacc	Yu <i>et al.</i> , 2001
MYB	-656	-649	cacctacc	Sablowski <i>et al.</i> , 1994
MYB2	-1300	-1292	taactggtt	Abe <i>et al.</i> , 1997
MYB4	-656	-650	acctacc	Chen <i>et al.</i> , 2002
RAV1-A	-458	-454	caaca	Kagaya <i>et al.</i> , 1999
LFY	-77	-72	ccactg	Lamb <i>et al.</i> , 2002
Box II	-760	-755	ggttaa	Le Gourrierec <i>et al.</i> , 1999
DRE-like PM	-896	-888	agccgactt	Chen <i>et al.</i> , 2002
GATA	-787	-782	tgatag	Teakle <i>et al.</i> , 2002
Telo-box	-260	-252	aaaccctaa	Tremousayque <i>et al.</i> , 1999
SORLIP1	-1133	-1128	agcaac	Hudson and Quail, 2003



Obrázek 7: Umístění vazebných míst pro transkripční faktory na promotoru genu *AtMKK4*

#### 4.1.2.2 Detekce subcelulární lokalizace *AtMKK4*

Pomocí databáze SUBA (Ref. 12) byla zjištěna možná subcelulární lokalizace protein kinasy *AtMKK4* (viz 3.5.1.5). Často detekována byla v jádře (AdaBoost, Nucleo, SubLoc, BaCello, Plant-mPloc), dále také v plastidech (ChloroP, iPSORT, PCLR, PproWler, TargetP) a v mitochondriích (Mitoprot2, PredSL, SLPFA, WoLF PSORT, SLP-Local). Byla detekována v menší míře také v cytosolu (Plant-mPloc, MultiLoc) a v Golgiho aparátu (YLoc).

#### 4.1.2.3 Detekce hladiny transkriptů *AtMKK4*

Pomocí databáze TAIR (Ref. 11) byla zjištěna hladina transkriptů *AtMKK4* v různých pletivech a během vývinu a stresu (viz 3.5.1.4). Vysoká míra transkriptů *AtMKK4* byla detekována ve stopce plně vyvinutých a stárnoucích listů, v plodolistech květu a

vyvíjejícím se plodu (Klepikova *et al.*, 2016). Při vývinu embrya byla detekována nejvyšší hladina transkriptů v semenném obalu (Le *et al.*, 2010).

Dále byla detekována vyšší hladina transkriptů při reakci na biotické a abiotické stresy. Z testovaných biotických stresů reagovala rostlina *A. thaliana* zvýšením hladiny transkriptů *AtMKK4* na *Hyaloperonospora arabidopsidis* (Wang *et al.*, 2011), na bakteriální elicitory Flg22 a HrpZ a elicitor z oomycet GST-NP1. Poslední detekovaná pozitivní odpověď na biotický stres vyvolala oomyceta *Phytophthora infestans*. Dále byla detekována zvýšená míra transkriptů při reakci na UV-B záření (Ref. 15). Hladina transkriptů *AtMKK4* byla ovlivněna i chemikáliemi, a to selenem (Van Hoewyk *et al.*, 2008) a cykloheximidem (Ref. 15).

#### **4.1.2.4 Protein-proteinové interakce s AtMKK4**

Byly zjištěny možné protein-proteinové interakce AtMMK4 (Tabulka 6) pomocí databáze IntAct EMBL-EBI (Ref. 13) (viz 3.5.1.6). Pomocí této databáze byly nalezeny možné interakce s 5 protein kinasami, 3 strukturními proteiny, s 1 enzymem, represorem a transkripčním faktorem. Pomocí metod two hybrid (Lee *et al.*, 2008), two hybrid array a validated two hybrid (Altmann *et al.*, 2020) byla potvrzena interakce MKK4 s protein kinasami MPK3 a MPK6 a pomocí metody pull down (Van Leene *et al.*, 2019) s protein kinasou RAPTOR1. Dále MKK4 interaguje s proteinem BRX (Brevis radix), který ovlivňuje dělení buněk v protofloemu rostliny a ovlivňuje směr prodlužování buněk. Tato interakce byla zjištěna pomocí metod two hybrid array, two hybrid prey pooling approach a validated two hybrid (Altmann *et al.*, 2020). Dále interaguje s proteinem TIFY8, který se účastní represe odpovědi na kyselinu jasmoovou, u kterého byla interakce detekována pomocí metod anti tag coimmunoprecipitation, two hybrid array a validated two hybrid (Altmann *et al.*, 2020). MKK4 interaguje také s transkripčním faktorem MYB73 (účastní se reakce na zasolení), což bylo detekováno pomocí metod two hybrid array a validated two hybrid (Altmann *et al.*, 2020). Dále byla detekována interakce s protein kinasou ASK7, která se účastní ubiquitinace proteinů. Tato interakce byla detekována pomocí anti tag coimmunoprecipitation (Altmann *et al.*, 2020). Dále byla pomocí metody two hybrid array detekována interakce s proteiny CHC2 (Clathrin heavy chain 2, který je obsažen v jedné z podjednotek clathrin). Dále byla metoda two hybrid využita také u detekce FPA (Flowering time control) proteinu, který ovlivňuje dobu kvetení podle světelného režimu. Další interakce byla detekována pomocí two hybrid array s CSN5B (COP9 signalosome complex subunit 5B), který se účastní různých procesů, například reakci na auxin nebo

jasmoovou kyselinu) a enzymem PME31 (pectin esterase 31), který modifikuje pomocí demethylesterifikace pektin obsažený v buněčné stěně (Arabidopsis Interactome Mapping Consortium, 2011).

Tabulka 6: Protein-proteinové interakce AtMKK4 (v závorkách jsou uvedené ortology vojtěšky)

Interagující protein	Lokus	Funkce	Metoda detekce
MPK3 (SAMK)	AT3G45640	Protein kinasa	Two hybrid
			Two hybrid array
			Validated two hybrid
MPK6 (SIMK)	AT2G43790	Protein kinasa	Two hybrid
			Two hybrid array
			Validated two hybrid
BRX	AT1G31880	Protein asociovaný s plazmatickou membránou	Two hybrid array
			Validated two hybrid
			Two hybrid prey pooling approach
TIFY8	AT4G32570	Represor	Anti tag coimmunoprecipitation
			Two hybrid array
			Validated two hybrid
MYB73	AT4G37260	Transkripční faktor	Two hybrid array
			Validated two hybrid
ASK7	AT3G21840	Protein kinasa	Anti tag coimmunoprecipitation
CHC2	AT3G08530	Strukturní protein	Two hybrid array
FPA	AT2G43410	Protein kinasa	Two hybrid array
CSN5B	AT1G71230	Strukturní protein	Two hybrid array
PME31	AT3G29090	Enzym	Two hybrid array
RAPTOR1	AT3G08850	Protein kinasa	Pull down

#### 4.1.2.5 Možné mutace v genu *AtMKK4*

Pomocí databáze TAIR (Ref. 11) byly vyhledány mutace v genu *AtMKK4* (Tabulka 7), který se nachází na chromozomu 1 (viz 3.5.1.4). Z detekovaných mutací u *MKK4* byly vybrány 3, a to 2 inzerce a 1 substituce. První zaznamenanou mutací je inzerce T-DNA GK-035E09-015008, která byla detekována u ekotypu Col-0 (Columbia) v promotoru genu *MKK4* na pozici -176 bp o délce 279 bp (Li *et al.*, 2003). Druhou inzercí T-DNA detekovanou v genu *MKK4* je SALK\_018804.19.35.x, která byla detekována rovněž v ekotypu Col-0 v exonu genu na pozici 1476 bp o délce 462 bp (O'Malley *et al.*, 2007). Dále byla popsána substituce PERL0163551, která se nachází v exonu genu *MKK4* a byla detekována u ekotypů Col-0; Ler-1; Lov-5; Shahdara. Její délka je 1 bp a jedná se o substituci thyminu (T) na pozici 404 bp (Ref. 20).

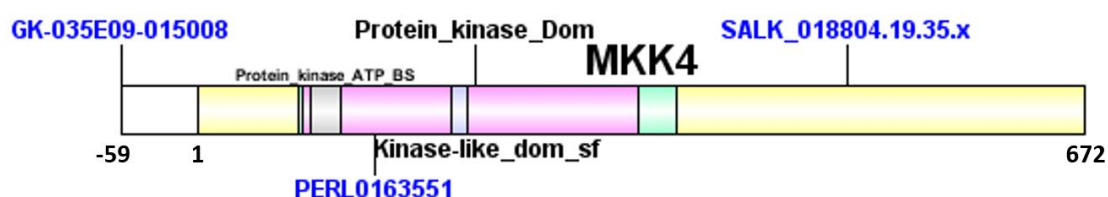
Zaznamenané mutace byly označeny ve strukturním modelu proteinu AtMKK4 spolu s proteinovými doménami (Obr. 8, Tabulka 8), které byly zjištěny také ze serveru TAIR (Ref. 11). Mezi proteinovými doménami byly lokalizovány Protein\_kinase\_dom, která je lokalizována na 79-334 aminokyselině a byla detekována databází Profilescan. Dále byla detekována Kinase-like\_dom\_sf, která se nachází na 77-362 aminokyselině a byla detekována databází Superfamily. Doména Protein\_kinase\_ATP\_BS byla lokalizována na pozici 85-108 aminokyselin databází Patternscaan a poslední detekovanou proteinovou doménou je Ser/Thr\_kinase\_As, která je lokalizována na pozici 192-204 aminokyselin databází Patternscaan.

Tabulka 7: Mutace genu *AtMKK4* s koordináty 19154323 - 19156338 bp na chromozomu 1

Mutace	Ekotyp	Typ mutace	Délka mutace	Místo polymorfismu	Reference
GK-035E09-015008	Col-0	Inzerce T-DNA	279 bp	-176 bp (promotor)	Li <i>et al.</i> , 2003
PERL0163551	Col-0; Ler-1; Lov-5; Shahdara	Substituce (T sekvence)	1 bp	404 bp (exon)	Ref. 20
SALK_018804.19.35.x	Col-0	Inzerce T-DNA	462 bp	1476 bp (exon)	O'Malley <i>et al.</i> , 2007

Tabulka 8: Proteinové domény na proteinu AtMKK4 (AT1G51660.1)

Proteinová doména	Lokalizace na proteinu	Databáze
Protein_kinase_dom	79-334	profilesca
Kinase-like_dom_sf	77-362	superfamily
Protein_kinase_ATP_BS	85-108	patternsca
Ser/Thr_kinase_AS	192-204	patternsca

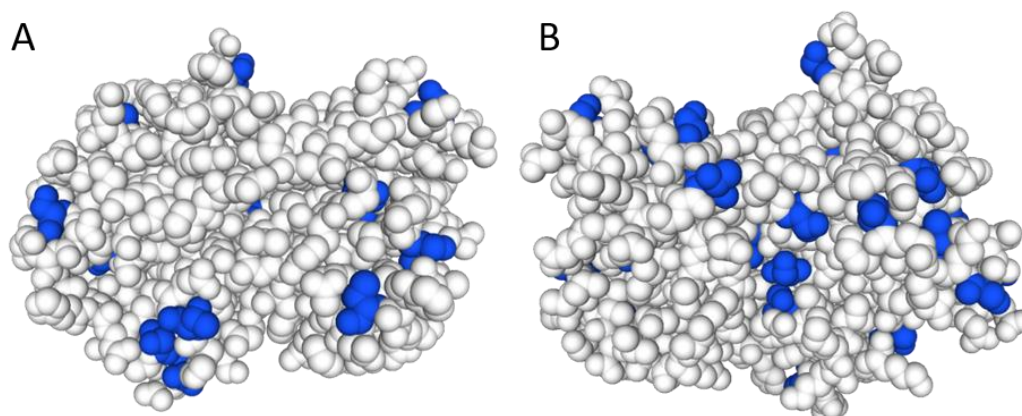


Obrázek 8: Znázornění domén a lokalizace možných mutací mitogen-aktivované protein kinasy AtMKK2 v programu DOG.2.0

### 4.1.3 *In silico* analýza MsPRKK

#### 4.1.3.1 Sestavení 3D struktury MsPRKK

Pro vytvoření 3D modelu MsPRKK (Obr. 9) byl využit server SWISS-MODEL (Ref. 6) (viz 3.5.1.1). Na vytvořeném modelu vidíme, že umístění Ser/Thr sekvencí (označené modře) je převážně na povrchu struktury, což je důležité pro jejich fosforylaci a tím i aktivaci MAP kinasy.



Obrázek 9: 3D struktura MsPRKK s vyznačenými Ser/Thr sekvencemi. Vytvořeno na SWISS-MODEL (Ref. 6). **A, B** Stejný model ze dvou opačných stran.

#### 4.1.3.2 Porovnání MsPRKK s ortology AtMKK1 a AtMKK2

Na serveru Blast (Ref. 9) byly porovnány sekvence proteinů a nukleotidů MsPRKK s AtMKK1 a AtMKK2 (viz 3.5.1.2). Pomocí BlastP byly porovnány sekvence proteinů MsPRKK\_MSAD\_280536 (PRKK\_36) a MsPRKK\_MSAD\_250548 (PRKK\_48) se sekvencemi proteinů AtMKK1 a AtMKK2 (Tabulka 9). Dále byly porovnávány kódující sekvence nukleotidů (coding sequence, CDS) pomocí BlastN *MsPRKK\_36* a *MsPRKK\_48* s CDS *AtMKK1* a *AtMKK2* (Tabulka 10). Porovnáním jednotlivých sekvencí bylo zjištěno, že největší homologie sekvencí je mezi MsPRKK\_36 a AtMKK2. Proteinové sekvence se shodují u těchto dvou MAP kinas v 68,54 % (BlastP, Tabulka 9) a také nukleotidové sekvence na 70,95 % (BlastN, Tabulka 10). Podobnost sekvencí nukleotidů (BlastN) je procentuálně vyšší oproti sekvencí proteinů (BlastP) a to u obou sekvencí PRKK.

Tabulka 9: Porovnání sekvencí proteinů (BlastP) mezi MsPRKK a AtMKK1/2

Porovnávaná MAPK kinasa (BlastP)	MsPRKK_36		MsPRKK_48	
	Procentuální identita	E-value	Procentuální identita	E-value
AtMKK1	63,97 %	$3 \cdot 10^{-175}$	55,31 %	$5 \cdot 10^{-144}$
AtMKK2	68,54 %	0,0	59,27 %	$2 \cdot 10^{-158}$

Tabulka 10: Porovnání sekvence nukleotidů (BlastN) mezi MsPRKK a AtMKK1/2

Porovnávaná MAPK kinasa (BlastN)	MsPRKK_36		MsPRKK_48	
	Procentuální identita	E-value	Procentuální identita	E-value
AtMKK1	68,75 %	$2 \cdot 10^{-102}$	68,92 %	$2 \cdot 10^{-77}$
AtMKK2	70,95 %	$7 \cdot 10^{-140}$	70,81 %	$2 \cdot 10^{-107}$

#### 4.1.4 *In silico* analýza AtMMK2

##### 4.1.4.1 *In silico* analýza promotoru

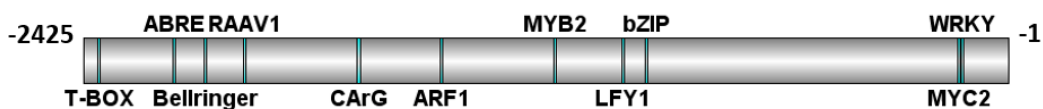
Pro *in silico* analýzu promotoru genu *AtMMK2* (viz 3.5.1.3), který je umístěný na chromozomu 4 v *A. thaliana*, byl využit software Agris (Ref. 10), který identifikoval vazebná místa pro transkripční faktory (Tabulka 11; Obr. 10): CarG je transkripční faktor, který má vliv na dobu kvetení *A. thaliana*. (Hepworth *et al.*, 2002). Dalším transkripčním faktorem, který má vliv na generativní orgány rostlin je Bellringer. Ten je obsažen v meristému generativních orgánů a reguluje tvorbu tyčinek a plodů, a to negativní regulací genu *AGAMOUS* (Bao *et al.*, 2004). Transkripční faktor LFY (LEAFY) má vliv na raný rozvoj dělivého pletiva generativních orgánů. Funguje v synergii s *APETALA1*, *CAULIFLOWER* a *AGAMOUS*, které přímo aktivuje (Lamb *et al.*, 2002). Dalším transkripčním faktorem, který ovlivňuje vývoj rostliny je RAV1, který potlačuje růst rostlin (Kagaya *et al.*, 1999). A transkripční faktor T-BOX má vliv na tvorbu chloroplastů. Kóduje totiž glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenázovou podjednotku chloroplastu (Chan *et al.*, 2001).

Další detekované transkripční faktory ovlivňují reakce na podněty z vnějšího prostředí. ARF1 (auxin response factor 1, faktor odpovídající na auxin 1) je transkripční faktor, který má vliv na syntézu auxinu během stresu rostliny (Ulmasov *et al.*, 1999). Dále byly detekovány transkripční faktory MYB2 a MYC2, které ovlivňují abiotický stres z nedostatku vody a podílejí se na regulaci syntézy kyseliny abscisové (Abe *et al.*, 1997). Transkripční faktor bZIP se reaguje na změnu světelných podmínek (Abe *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1997; Satoh *et al.*, 2004) a WRKY reguluje expresi genu NPR1 (nonexpressor of PR genes 1), který má vliv na velkou řadu reakcí na biotické i abiotické stresy (Yu *et al.*, 2001). Posledním zjištěným transkripčním faktorem je ABRE, který se účastní reakce na stres z nedostatku vody a chlad (Choi *et al.*, 2000).

Z vyhledaných funkcí transkripčních faktorů lze usoudit, že gen *AtMMK2* *A. thaliana* se účastní reakcí na abiotické stresy, kvetení a vývoje rostlin a částečně má vliv i na tvorbu chloroplastů.

Tabulka 11: Vazebná místa pro transkripční faktory na promotoru genu *AtMKK2*

Transkripční faktor	Vazebná místa (bp)		Sekvence nukleotidů	Reference
	Začátek	Konec		
MYB2	-1193	-1187	ctaacca	<i>Abe et al., 1997</i>
MYC2	-133	-128	cacatg	<i>Abe et al., 1997</i>
Bellringer	-2110	-2103	aaattaa	<i>Bao et al., 2004</i>
ARF1	-1490	-1485	tgtctc	<i>Ulmasov et al., 1999</i>
CARg	-1708	-1699	ccaaattagg	<i>Hepworth et al., 2002</i>
bZIP	-953	-948	actcat	<i>Abe et al., 1997; Kim et al., 1997; Satoh et al., 2004</i>
WRKY	-125	-120	ttgact	<i>Yu et al., 2001</i>
ABRE	-2191	-2184	gacgtggc	<i>Choi et al., 2000</i>
RAV1	-2005	-2001	caaca	<i>Kagaya et al., 1999</i>
LFY	-1013	-1008	ccattg	<i>Lamb et al., 2002</i>
T-BOX	-2387	-2382	actttg	<i>Chan et al., 2001</i>



Obrázek 10: Umístění vazebných míst pro transkripční faktory na promotoru genu *AtMKK2*

#### 4.1.4.2 Detekce subcelulární lokalizace *AtMKK2*

Pomocí databáze SUBA (Ref. 12) byla zjištěna možná subcelulární lokalizace protein kinasy *AtMKK2* (viz 3.5.1.5). Nejčastěji byla objevena v cytosolu (MultiLoc, EpiLoc, SLP-Local, YLoc, Wolf PSORT), dále v mitochondriích (PProwler, SubLoc, iPSORT, SLPFA), v jádře (Plant-mPloc, BaCelLo, SLP-Local) a v plazmatické membráně (AdaBoost, TAIR).

#### 4.1.4.3 Detekce hladiny transkriptů *AtMKK2*

Pomocí databáze TAIR (Ref. 11) byla zjištěna hladina transkriptů *AtMKK2* v různých pletivech a během vývinu a stresu (viz 3.5.1.4). Vysoká míra transkriptů *AtMKK2* byla detekována v řápíku stárnoucích listů, v menší míře v řápíku a čepeli listů dospělé rostliny. Přítomnost transkriptů *AtMKK2* byla detekována také v korunních listech (Klepikova *et al.*, 2016). Nejvyšší míra transkriptů *AtMKK2* během klíčení *A. thaliana*,



byla zjištěna 48 hodin po vystavení rostliny světlu (Narsai *et al.*, 2011). Při vývoji semen je nejvyšší hladina transkriptů v mikropylárním endospermu (Le *et al.*, 2010). Zvýšená míra transkriptů v jednotlivých buňkách byla detekována při časně a střední fázi diferenciaci endodermis, v trichoblastech, kortexových buňkách a při raném stádiu diferenciaci atrichoblastů (Ryu *et al.*, 2019). V reakci na abiotický stres byla míra transkriptů zvýšená při kontaktu se selenem (Van Hoewyk *et al.*, 2008). Dále také po ozáření UV-B světlem (po dobu 15 min 6 fluorescenčními žárovkami) byla nejvyšší míra transkriptů po 6 hodinách od ozáření a poté se hladina snížila (Kilian *et al.*, 2007). Vysoká míra transkriptů byla naměřena při kontaktu s kyselinou salicylovou a v menší míře i při kontaktu s cykloheximidem (Winter *et al.*, 2007). Deficient síry zvyšuje míru transkriptů *AtMKK2* v rizodermě kořenu. Zvýšené množství auxinu snižuje míru transkriptů v kořenu. Při sníženém pH půdy dochází ke snížení exprese transkriptů v kortexu kořenů *A. thaliana* (Iyer-Pascuzzi *et al.*, 2011). V reakci na biotický stres byla zvýšená míra transkriptů při kontaktu s *Golovinomyces oronti* (Chandran *et al.*, 2010), *Hyaloperonospora arabidopsidis* (Wang *et al.*, 2011) (nejvyšší po 6 dnech od inokulace), *Botrytis cinerea*, *Pseudomonas syringae*, s elicitorem z bakterií a oomycet a *Erysiphe orontii* (Ref. 15).

#### **4.1.4.4 Protein-proteinové interakce s AtMKK2**

Byly zjištěny možné protein-proteinové interakce AtMKK2 (Tabulka 12) pomocí databáze IntAct EMBL-EBI (Ref. 13) (viz 3.5.1.6). Pomocí této databáze byly nalezeny možné interakce s 8 protein kinasami, 1 protein fosfatázou, 1 transkripčním faktorem. Jeden z identifikovaných interakčních partnerů pro MKK2 je nadřazená MEKK1, což bylo detekováno pomocí metody BIFC (bimolecular fluorescent complementation neboli YFP-split, Gao *et al.*, 2008). Dále MKK2 může interagovat s MAP kinasami MPK4, což bylo zjištěno pomocí dvou nezávislých testů (two hybrid a protein kinase assay, Lee *et al.*, 2008). Interakce mezi MKK2 a MPK6 byla zjištěna pomocí 4 různých metod, dvěma z nich byly také two hybrid (Lee *et al.*, 2008) a in gel kinase assay (Teige *et al.*, 2004) stejně jako při interakci s MPK4, a dále byla využita metoda two hybrid prey pooling approach (Altmann *et al.*, 2020). Interakce s MPK10 a MPK11 byla detekována pomocí metody two hybrid (Lee *et al.*, 2008). Reakce mezi MKK2 a protein kinasou s označením Q9fil6 byla zjištěna pomocí metody two hybrid array (Arabidopsis Interactome Mapping Consortium, 2011). Detekce interakce mezi MKK2 a MPK13 proběhla pomocí metody two hybrid a two hybrid array (Lee *et al.*, 2008). A interakce s poslední MAP kinasou, a to s MPK5, byla detekována pomocí metody two hybrid (Teige *et al.*, 2004). Dále MKK2

interaguje i s transkripčním faktorem TCP23, což bylo detekováno pomocí metod validated two hybrid a two hybrid array (Altmann *et al.*, 2020). Transkripční faktor TCP23 reguluje hladinu proteinů TCP-P, což má vliv například na dobu kvetení, růst rostliny a buněčné dělení (Balsemão-Pires *et al.*, 2013).

Tabulka 12: Protein-proteinové interakce AtMKK2 (v závorkách jsou uvedené ortology)

Interagující protein	Lokus	Funkce	Metoda detekce interakce
MPK4 (MsMMK2)	AT4G01370	Protein kinasa	Two hybrid
			Protein kinase assay
MPK6 (MsSIMK)	AT2G43790	Protein kinasa	Two hybrid
			In gel kinase assay
			Protein kinase assay
			Two hybrid prey pooling approach
MPK10 (MsMMK1)	AT3G59790	Protein kinasa	Two hybrid
MPK11 (SAMK)	AT1G01560	Protein kinasa	Two hybrid
TCP23	AT1G35560	Transkripční faktor	Validated two hybrid
			Two hybrid array
Q9fil6	AT5G58950	Protein kinasa	Two hybrid array
MPK13 (MsMMK3)	AT1G07880	Protein kinasa	Two hybrid
			Two hybrid array
MEKK1	AT4G08500	Protein kinasa	BIFC
MPK5 (MsMMK2)	AT4G11330	Protein kinasa	Two hybrid

#### 4.1.4.5 Možné mutace v genu *AtMKK2*

Pomocí databáze TAIR (Ref. 11) byly vyhledány mutace v genu *AtMKK2* (Tabulka 13) (viz 3.5.1.4). Z detekovaných mutací u *MKK2* byly vybrány 4, a to 3 inserce T-DNA a 1 substituce. První z insercí (GK-653B08-022839) má délku 269 bp a je vnášena do promotoru v místě 436 bp (Li *et al.*, 2003). Druhá inserce (SALKseq\_081812.2) se vnáší do kódujícího regionu na pozici 232 bp a má délku 78 bp. Další inserce (SALK\_127284.30.85.x) se vnáší do exonu na pozici 31 bp a má délku 52 bp (Ref. 21). Všechny tři inserce byly zkoumány v ekotypu Col-0. Substituce (PERL0827119) má délku 1 bp a byla lokalizována v exonu na pozici 485 bp (Ref. 20). Substituce byla detekována v ekotypu Tsu-1; Van-0; Col-0; RRS-7.

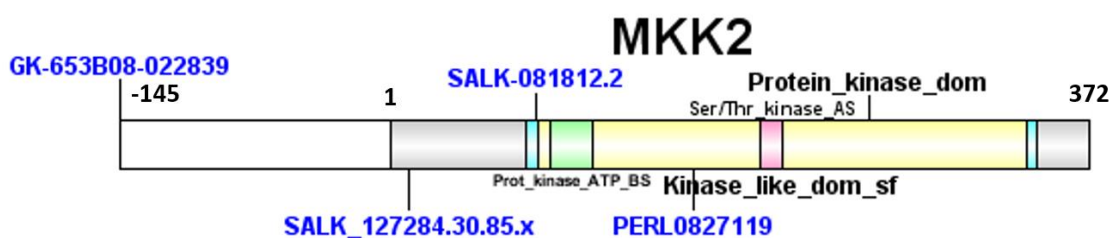
Zaznamenané mutace byly označeny ve strukturním modelu *AtMKK2* spolu s proteinovými doménami (Obr. 11, Tabulka 14), které byly zjištěny také ze serveru TAIR (Ref. 11). Mezi proteinovými doménami byly lokalizované Protein\_kinase\_domain (na pozicích aminokyselin 79-339), kinase-like\_domain\_sf (na pozicích aminokyselin 72-345), protein\_kinase\_ATP\_BS (na pozicích aminokyselin 85-108) a poslední lokalizovanou proteinovou doménou byla Serin/threonin\_kinase\_AS (na pozicích aminokyselin 197-209).

Tabulka 13: Mutace genu *AtMKK2* s koordinátami 14593039 - 14595303 bp na chromosomu 4

Mutace	Ekotyp	Typ mutace	Délka mutace	Místo polymorfismu	Reference
GK-653B08-022839	Col-0	Inzerce T-DNA	269 bp	-436 bp (promotor)	Li <i>et al.</i> , 2003
PERL0827119	Tsu-1; Van-0; Col-0; RRS-7	Substituce (T sekvence)	1 bp	485 bp (exon)	Ref. 20
SALK_081812.2	Col-0	Inzerce T-DNA	78 bp	232 bp (kódující region)	Ref. 21
SALK_127284.30.85.x	Col-0	Inzerce T-DNA	52 bp	31 bp (exon)	Ref. 21

Tabulka 14: Proteinové domény na proteinu AtMKK2 (AT4G29810.2)

Proteinová doména	Lokalizace na proteinu	Databáze
Protein_kinase_dom	79-339	Profilescan
Kinase-like_dom_sf	72-345	Superfamily
Protein_kinase_ATP_BS	85-108	PatternsScan
Ser/Thr_kinase_AS	197-209	PatternsScan



Obrázek 11: Znázornění domén a lokalizace možných mutací mitogen-aktivované protein kinasy AtMKK2 v programu DOG.2.0. Tyrkysová barva značí doménu Kinase\_like\_dom\_sf (lokalizována mutace SALK-081812.2), zelená barva značí Prot\_kinase\_ATP\_BS.

## 4.2 Výsledky získané procesováním dat

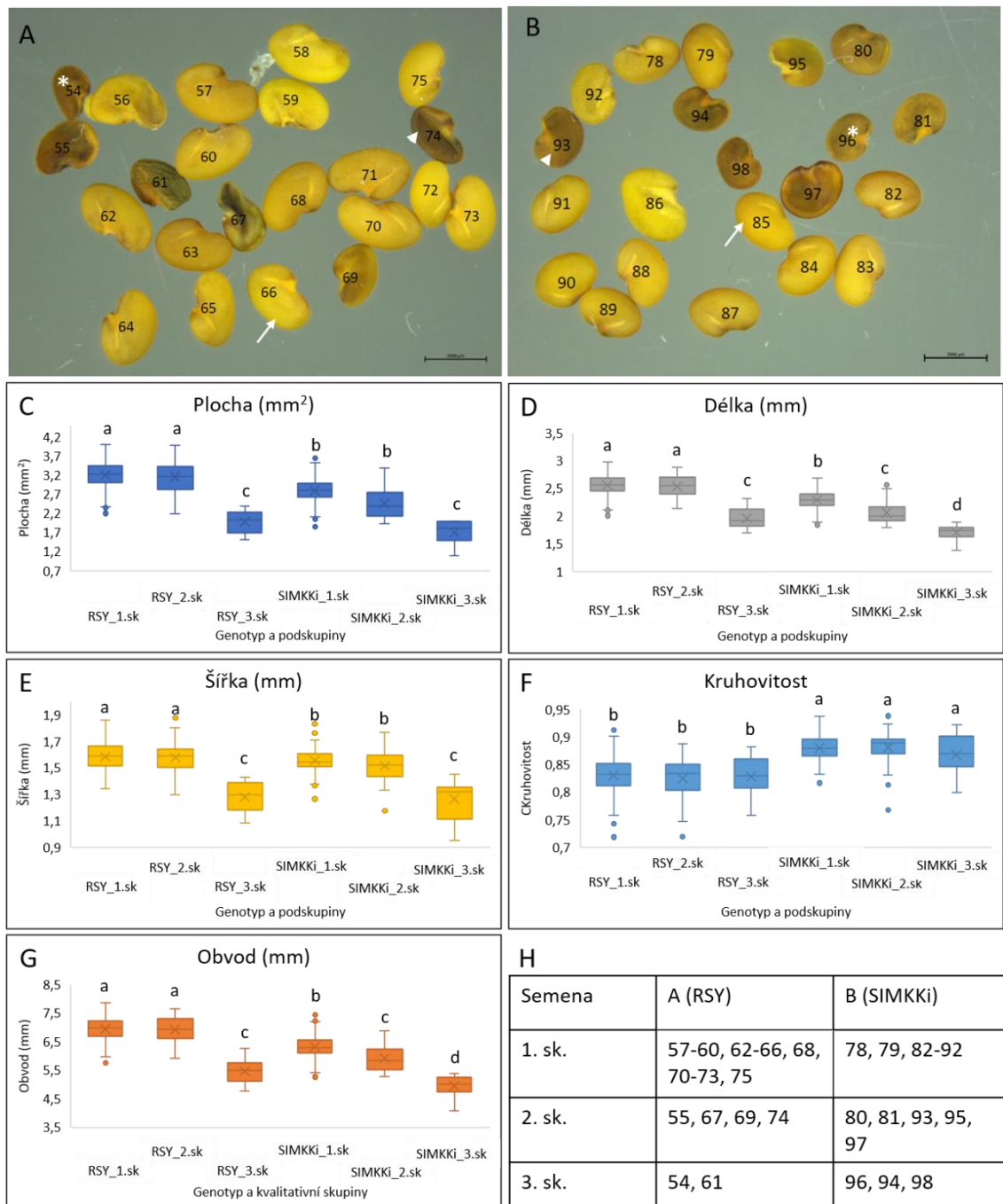
Kvůli nemožnosti práce v laboratoři byly zpracovány snímky semen *M. sativa* linií RSY a SIMKKi. Dále byly porovnávány kořeny (jejich délka a počet vedlejších kořenů) ze snímků rostlin *M. sativa* stejných linií (RSY a SIMKKi). Veškeré snímky byly poskytnuty vedoucím bakalářské práce. K měření hodnot byl využit program ImageJ a grafy byly následně zpracovány pomocí programu Excel. Byla testována automatizace měření v programu ImageJ pro dosažení většího množství hodnot N pro statistické vyhodnocení. Automatickým měřením byly měřeny hodnoty vybraných parametrů ze semen rostlin RSY i SIMKKi a získaná data byla následně porovnána s ručním měřením obou linií. Dále byl procesováním dat měřen fenotyp linie SIMKKi (byly měřeny délky hlavních a vedlejších kořenů), který byl následně porovnáván s vlastnostmi RSY. Celkově byly zjištěny rozdíly v morfologii semen a taktéž v růstu semenáčů SIMKKi v porovnání s RSY.

### 4.2.1 Fenotyp semen SIMKK RNAi linie

Po vyhodnocení semen *M. sativa* z rostlin RSY (Obr. 12 A) a SIMKKi (Obr. 12 B) v programu ImageJ (viz 3.5.2.2) bylo zjištěno, že semena transgenních rostlin SIMKKi měla menší povrch (Obr. 12 C) a byla kratší (Obr. 12 D). Šířka semen z rostlin divokého

typu RSY byla srovnatelná se semeny linie SIMKKi (Obr. 12 E). Menší délka semen měla za následek větší celkovou kruhovitosť semen rostlin linie SIMKKi (Obr. 12 F). Na posledním grafu je vyhodnocen obvod semen, ze kterého lze vyčíst, že semena linie RSY všech skupin mají větší obvod semen, než semena stejných kvalitativních skupin linie SIMKKi (Obr. 12 G).

Získaná semena byla při měření rozdělena do tří kvalitativních skupin podle jejich velikosti a vzhledu. V první skupině byla semena světlé barvy, která měla normální velikost a s velkou pravděpodobností budou vitální a budou schopná vyklíčit (semena linie RSY Obr. 12 A č. 57-60, 62-66, 68, 70-73, 75. Semena linie SIMKKi Obr. 12 B č. 78, 79, 82-92). Do druhé skupiny byla zařazena semena, která byla normálně veliká (případně trochu menší), ale měla tmavou barvu (semena linie RSY Obr. 12 A č. 55, 67, 69, 74. Semena linie SIMKKi Obr. 12 B č. 80, 81, 93, 95, 97). U těchto semen je větší pravděpodobnost, že nebudou vitální. Do třetí skupiny byla zařazena tmavá semena malé velikosti (semena linie RSY Obr. 12 A č. 54, 61. Semena linie SIMKKi Obr. 12 B č. 96, 94, 98), která nejspíš nebudou vitální a často mají jenom 2D rozměr (jsou tenké, uschlé a prázdné). Na Obr. 12 H jsou měřená semena (z Obr. 12 A a Obr. 14 B) rozdělena do kvalitativních skupin. Skutečná vitalita získaných semen se bude moct posoudit až zasazením semen do media nebo květináče a po vyhodnocení jejich klíčivosti. Pokud budeme počítat s tím, že světlá semena jsou vitální, tak vitálních semen u linie SIMKKi bylo srovnatelně se semeny 1. skupiny rostlin linie RSY (Tabulka 15). Toto porovnání zohledňuje jenom celkové % z obrázků semen RSY a SIMKKi hodnocených v této práci. Nezohledňuje jiné parametry související se sběrem semen, a to počet a typ (jakost) semen na rostlinu nebo na lusk a z toho vyplývající porovnání genotypů.



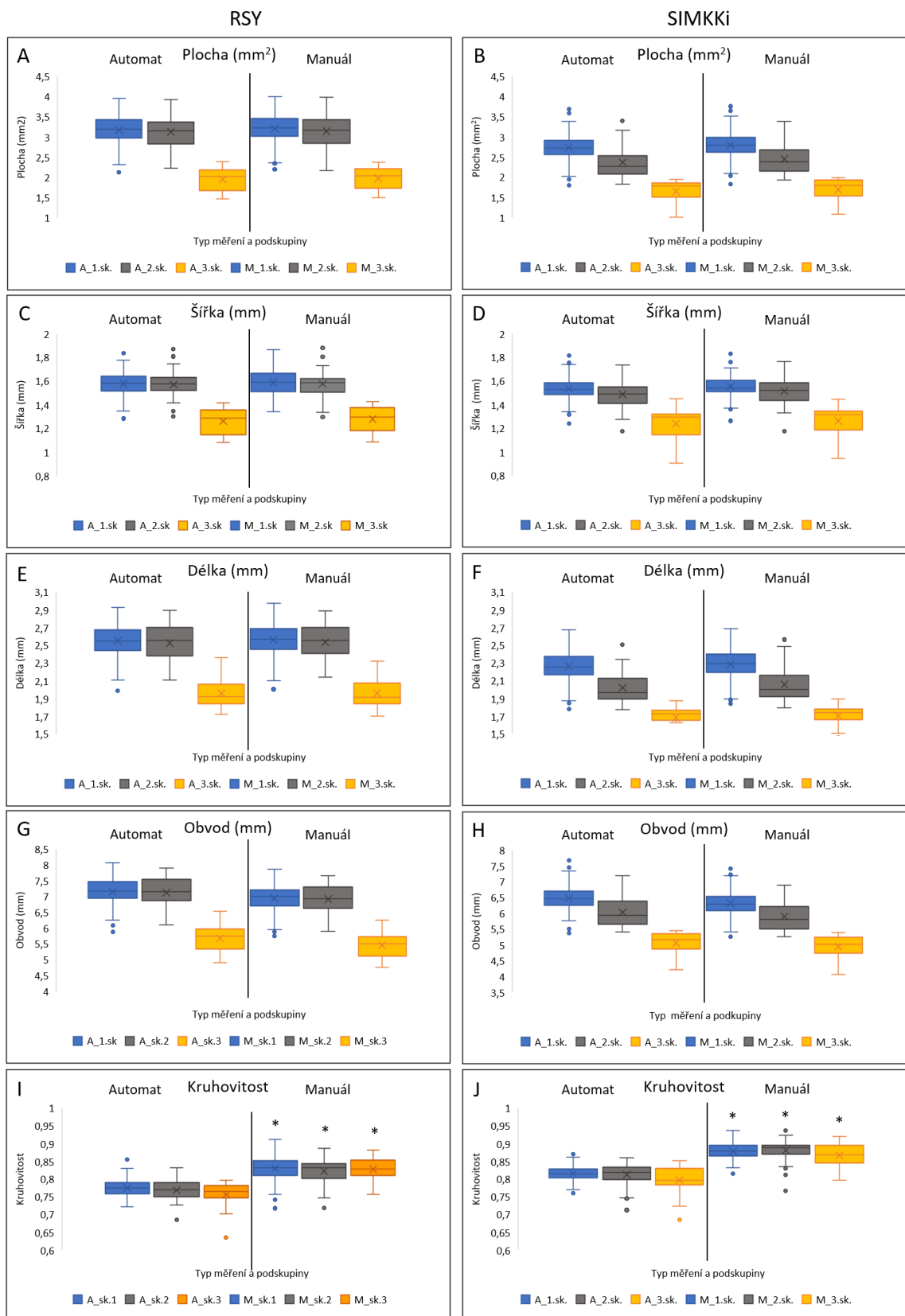
Obrázek 12: Měření fenotypu semen z rostlin trangenní linie *M. sativa* SIMKKi a kontroly RSY. **A** Semena rostlin *M. sativa* divokého typu RSY (N=196). **B** Semena rostlin *M. sativa* transgenní linie SIMKKi (N=211). **C-F** Porovnání vybraných parametrů semen *M. sativa* podle genotypu a kvalitativních kategorií: **C** plocha; **D** délka; **E** šířka; **F** kruhovitost, **G** Obvod. **H** Vypsána semena z A a B podle genotypu a kvalitativních skupin. A-B Reprezentativní semena 1. kategorie označeny šipkou (RSY N=144; SIMKKi N=156), 2. kategorie označeny hrotem šipky (RSY N=37; SIMKKi N=40), 3. kategorie označeny hvězdičkou (RSY N=15; SIMKKi N=15). Statistické porovnání je provedeno v rámci všech 6 skupin, a to pomocí ANOVA testu v programu SigmaPlot 11.0.

Tabulka 15: Počty semen, které byly využity pro měření fenotypu transgenní linie SIMKKi

Linie (zdroj semen)	Semen celkem	1. kvalitativní skupina	2. kvalitativní skupina	3. kvalitativní skupina
RSY2_2	196	144 (73,5 %)	37 (18,9 %)	15 (7,7 %)
SIMKKi	211	156 (73,9 %)	40 (19 %)	15 (7,1 %)

#### 4.2.2 Automatizace měření morfologie semen v programu ImageJ

Při měření morfologie semen *M. sativa* divokého typu RSY (Obr. 13 A, C, E, G, I) a transgenní linie SIMKKi (Obr. 13 B, D, F, H, J) byla otestována možnost automatizace měření v programu ImageJ (viz 3.5.2.2). Při porovnávání automatického a manuálního měření semen bylo zjištěno, že parametry plochy, šířky, délky a obvodu nebyly signifikantně rozdílné oproti hodnotám naměřeným manuálním (ručním) obkreslováním obvodu semen a následným sběrem dat programem ImageJ. Pouze u porovnávání hodnot kruhovitosti program ImageJ naměřil při automatickém měření signifikantně nižší hodnoty, než byly naměřeny při manuálním měření.

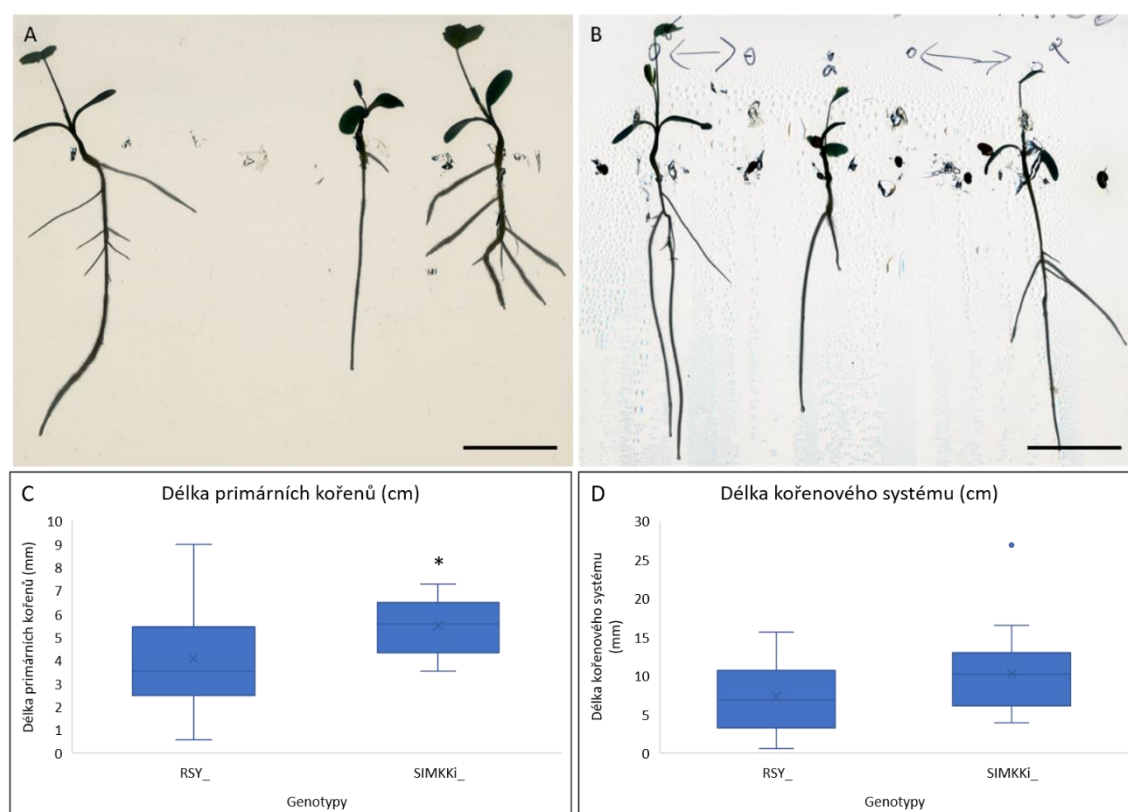


Obrázek 13: Porovnání automatického a manuálního měření semen linií RSY (A, C, E, G, I) (N=196) a SIMKKi (B, D, F, H, J) (N=211) pomocí programu ImageJ. **A-B** Plocha. **C-D** Šířka. **E-F** Délka. **G-H** Obvod. **I-J** Kruhovitost. Statistické porovnání je provedeno pouze v rámci jedné jakosti (tedy i barvy grafu) t-testem v Excelu. Semena 1. kategorie (RSY N=144; SIMKKi N=156), 2. kategorie (RSY N=37; SIMKKi N=40), 3. kategorie (RSY N=15; SIMKKi N=15).



#### 4.2.2 Délka kořenů semenáčů linie SIMKK RNAi

Při porovnávání vlivu mutantního genotypu na fenotyp linie SIMKKi, byla měřena délka hlavních a bočních kořenů u rostlin *M. sativa* linie RSY (Obr. 14 A) a SIMKKi (Obr. 14 B). Semena byla sterilizována a položena na Fährus medium bez dusíku (FAH-N2; Fährus, 1957), ponechány po dobu 4 dní v chladu (4 °C) a následně po 11 dní od přenesení (11 DAT – days after transfer) do fytotronu. Byly pořízeny skeny, které byly zaslané studentce pro analýzu. K měření byl využit program ImageJ (viz 3.5.2.2) a grafy byly zpracovány v programech Excel a PowerPoint. Z grafů z měření délky primárních kořenů lze vyčíst, že linie SIMKKi má v průměru větší délku primárních kořenů než rostliny linie RSY (Obr. 14 C). Při porovnání délky celého kořenového systému vyšlo měření bez signifikantního rozdílu (Obr. 14 D).



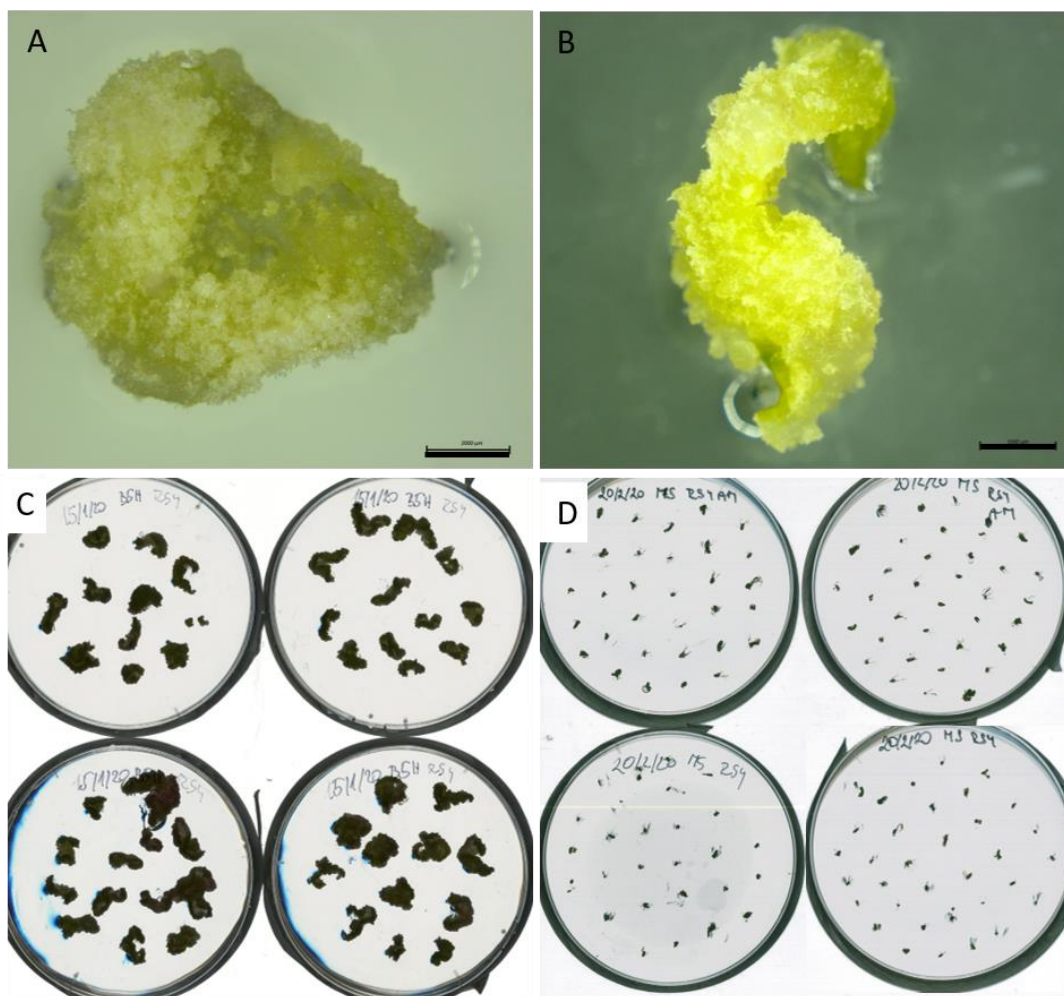
Obrázek 14 Měření délky primárních kořenů a kořenové soustavy 11 DAT *M. sativa* liní RSY a SIMKKi na Fährus medium bez dusíku. **A** Měřené rostliny *M. sativa* RSY\_5. **B** Měřené rostliny *M. sativa* SIMKKi\_6. **C** Délka primárních kořenů. **D** Délka kořenové soustavy. A-B Měřítka 2 cm. C-D Statistické porovnání provedeno pomocí t-testu v programu Excel.

### 4.3 Výsledky z laboratoře

Před uzavřením přístupu do laboratoří byla provedena somatická embryogeneze *M. sativa*, transientní transformace *N. benthamiana* a metoda PCR pro detekci T-DNA ve vzorcích *M. sativa* PRKK Cas9-G3. Somatická embryogeneze (SE) byla provedena pouze na liniích *M. sativa* RSY pro naučení metody SE pro následnou přípravu transgenních linií, ke které z důvodu uzavření laboratoří pro studenty nedošlo. Metoda SE je součástí protokolu stabilní transformace *M. sativa*, avšak lze ji vykonávat i samostatně, a to pro somatické množení (ne)transgenních rostlin. Další provedenou metodou v laboratoři byla transientní transformace na *N. benthamiana*, která sloužila ověření funkčnosti konstruktů v *A. tumefaciens* 35S::*PRKK:mRFP* v pGWB454. Poslední provedenou metodou byla PCR a detekce amplifikovaného fragmentu DNA PRKK pomocí elektroforézy na agarosovém gelu ze vzorků *M. sativa* PRKK Cas9-G3.

#### 4.3.1 Somatická embryogeneze *M. sativa*

Z vysterilizovaných listových explantátů *M. sativa* linie RSY byly vykultivovány nediferencované kalusy (Obr. 15 A, B), pomocí vhodného složení fytohormonů v dediferenciačním B5H mediu (Obr. 15 C). Kalusy byly poté přeloženy na diferenciační B50 medium (Obr. 15 D), které indukuje tvorbu diferencovaných embryí. Embrya byla dále přesazena na kultivační medium MMS, díky kterému se indukoval růst kořenů. Dále se mladé rostlinky přenesly na kultivační MS medium, díky kterému se vytvořily kompletní mladé rostliny (včetně stonkových výhonků), které mohly být následně přesazeny postupně (podle velikosti rostliny) do větších *in vitro* nádob s MS mediem. Na závěr se velké kytky mohou přesadit do květináče nebo se ponechají v *in vitro* podmínkách pro experimenty nebo pro odběr sterilních listů pro SE pomnožení rostlinního materiálu (viz 3.5.3).

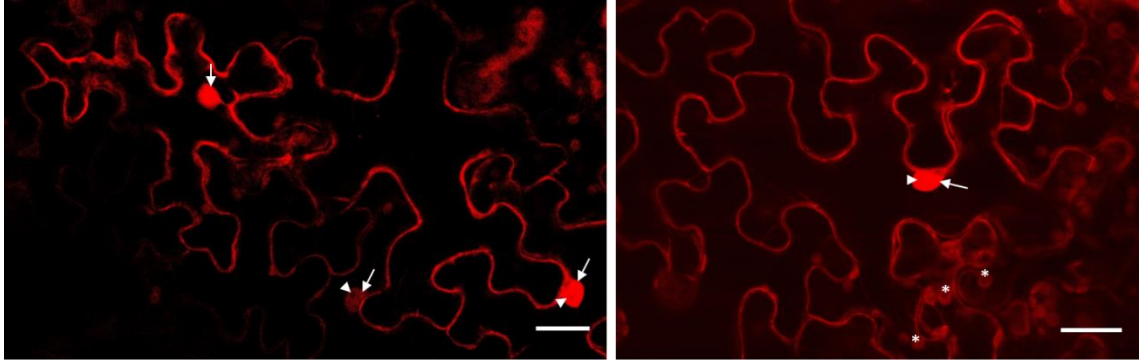


Obrázek 15: Somatická embryogeneze *M. sativa* linie RSY. **A, B** Detail kalusu vyfoceného Streo Zoom mikroskopem kultivována na B5H mediu. Měřítka 2 mm. **C** Kalusy v Petriho miskách foceny pomocí Image Scanner III kultivovány na B5H mediu. **D** Embrya v Petriho miskách na B50 mediu, foceny Image Scanner III. C-D Měřítka 2 cm.

#### 4.3.2 Transientní transformace *N. benthamiana*

Byla provedena transientní transformace listů *N. benthamiana* pomocí *A. tumefaciens* 35S::*PRKK:mRFP* v pGWB454 pro ověření funkčnosti vneseného konstruktu (viz 3.5.4). Při pozorování preparátu studentkou (pomocí CLSM) nebyl viditelný signál proteinu RFP, kdy bylo zjištěno, že poskytnutý testovaný konstrukt (17.1.2020) neexprimoval žádný RFP signál. Proto byl konstrukt naklonován znovu, vnesen do *A. tumefaciens* a celý pokus byl opakován Mgr. Jiřím Sojkou (26.2.2021) a obrazový materiál (soubory .czi) byl poskytnut studentce kvůli nemožnosti přístupu studentům do laboratoře z důvodu coronavirové epidemie. Buňky listu *N. benthamiana* s nově naklonovaným konstruktem exprimovaly protein PRKK (Obr. 16), kdy tento protein byl detekován v buněčné stěně a v jádře buněk. Fluorescenční signál byl detekován i v chloroplastech, což lze označit za

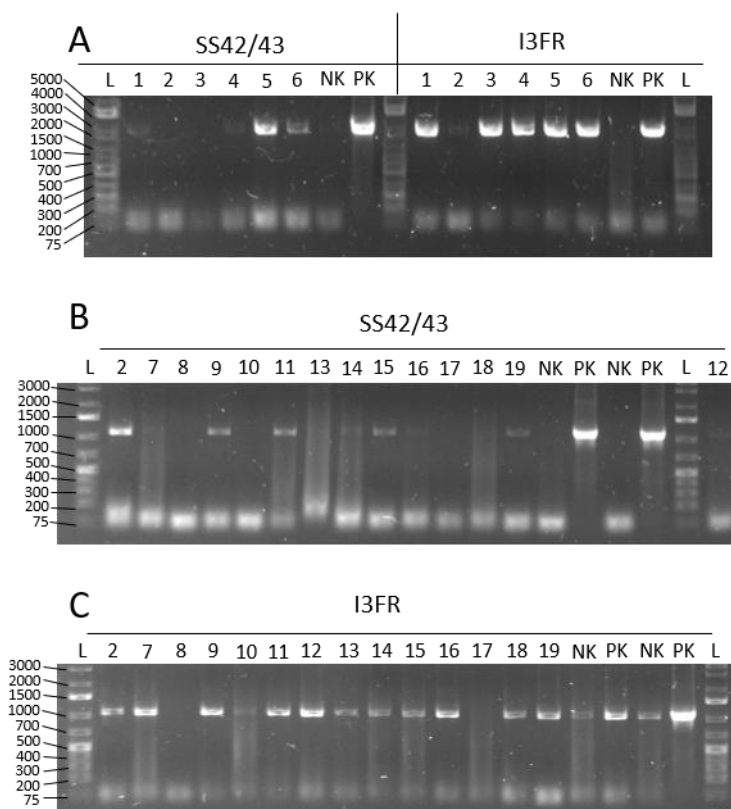
nespecifický signál, který je viditelný z důvodu neodstranění emisního spektra signálu RFP.



Obrázek 16: Transientní transformace listů *N. benthamiana* pomocí *A. tumefaciens* 35S::*PRKK:mRFP* v pGWB454. Snímky pořízeny a poskytnuty Mgr. Jiřím Sojkou a následně zpracovány a upraveny v programu Zen. Šipky značí jádro s fluorescenčním signálem. Hroty šipek značí jádro (bez signálu). Hvězdička značí chloroplasty. Měřítko 25  $\mu\text{m}$ .

### 4.3.3 PCR detekce transgenu PRKK Cas9-G3

Byla provedena metoda PCR na DNA izolované ze vzorků z listů *M. sativa* PRKK Cas9-G3 rostlin poskytnuty školitelem (viz 3.5.5). Konstrukty pro PRKK-Cas9 byly klonovány Dr. Stanisav Isayenkov, Dr. Sci a transformovány techničkou paní Katarínou Takáčovou a následně byly malé rostliny testovány PCR. Byly přesazeny do větších nádob v *in vitro* podmínkách pro dosažení dostatečné velikosti pro odběr vzorků a poté přesazeny do květináčů s půdou školitelem. Bylo testováno 19 vzorků, které byly získány z 6 rostlin *M. sativa* pěstovaných v *in vitro* podmínkách. PCR každého vzorku byla provedena minimálně ve dvou opakováních. Po separaci fragmentů DNA pomocí elektroforézy na 1% agarosovém gelu (Obr. 17) bylo určeno, že přítomnost amplifikovaného fragmentu pro detekci přítomnosti transgenu PRKK Cas9-G3 (T-DNA z konstruktu pDe-Cas9 obsahující gRNA-G3 pro mutaci *PRKK* genu) byla detekována ve vzorcích č. 5, 6 (Obr. 17 A), 2, 9, 11, 14, 15, 16 a 19 (Obr. 17 B, C).



Obrázek 17: Detekce amplifikovaného fragmentu DNA PRKK Cas9-G3 ze vzorků listů *M. sativa* po elektroforéze na agarosovém gelu. **A-C** Detekce fragmentu dokazuje přítomnost fragmentu PRKK Cas9-G3. L – GeneRuler 1 kbp Plus DNA Ladder. 1-19 - vzorky z transformovaných rostlin *M. sativa*. NK – negativní kontrola (s DNase RNAse free vodou). PK – pozitivní kontrola.

## 5 DISKUZE

Při porovnání sekvencí proteinů a nukleotidů SIMKK a MKK4/5 (viz 4.1.1.1) pomocí BLAST bylo zjištěno, že podobnost sekvencí nukleotidů (BlastN) je vyšší než podobnost sekvencí proteinů (BlastP). Sekvence nukleotidů SIMKK se shoduje s MKK4 v 75,03 % a s MKK5 v 75,90 %. Při porovnání sekvencí proteinů se SIMKK shoduje s MKK4 v 68,04 % a s MKK5 v 66,02 %. Předpoklad byl, že bude vyšší procentuální podobnost sekvence proteinů než nukleotidů, a to vzhledem na jednu z vlastností genetického kódu a to tu, že je genetický kód degenerovaný, a tedy jedna aminokyselina je kódována vícerymi kodony. V tomto případě je podstatné, které nukleotidy jsou rozdílné, jestli v pozici nukleotidu na prvním, druhém nebo třetím místě v kodonu. Tím pádem pravděpodobně došlo ke změně právě těch nukleotidů (pozice první), které jsou nejvíce podstatné pro sekvenci proteinu. Další možností, proč porovnání sekvencí vyšlo vyšší u nukleotidů, je dáno větší délkou sekvence nukleotidů než sekvence proteinů, a tudíž z matematického hlediska daná změna sekvence vytvoří menší procentuální rozdíl.

Při porovnání identifikovaných transkripčních faktorů (TF) na genu *AtMKK4* (viz 4.1.2.1) bylo zjištěno, že se MAPK kinasa MKK4 podílí na reakci rostlin na abiotický stres jako je reakce na světlo, a to pomocí několika transkripčních faktorů, a to skupiny MYB, bZIP, Box II a SORLIP (Sablowski *et al.*, 1994, Abe *et al.*, 1997, Hudson and Quail, 2003, Le Gourrierc *et al.*, 1999). Dále se účastní i dalších abiotických stresů, jako je zasolení nebo dehydratace (TF MYB, Sablowski *et al.*, 1994) nebo se podílí i na reakci na biotický stres (TF WRKY, Yu *et al.*, 2001). Při porovnání s teoretickou částí bakalářské práce bylo zjištěno, že *MKK4* reguluje reakci na zasolení stejně jako *SIMKK* u *M. sativa* (Ovečka *et al.*, 2014). Zato regulace reakce na světlo, která je u genu *MKK4* regulována několika transkripčními faktory, nebyla u genu *SIMKK* nalezena. Z databáze TAIR (viz 4.1.2.3) bylo zjištěno, že zvýšená hladina transkriptů *MKK4* byla detekována při ozáření UV-B světlem, což odpovídá detekovaným TF reagujícím na světlo. Dále byla detekována zvýšená hladina transkriptů i při biotickém stresu vyvolaném patogenním elicitorem, což bylo potvrzeno i v teoretické části bakalářské práce (Sun *et al.*, 2018).

Při porovnání protein-proteinových interakcí s MKK4 (viz 4.1.2.4) v *A. thaliana* na serveru IntAct EMBL EBI bylo zjištěno, že interaguje s dvěma MAP kinasami, a to s MPK3 (která odpovídá ortologu MsSAMK) a MPK6 (která odpovídá ortologu MsSIMK). U SIMKK je potvrzeno, že je aktivuje SIMK (Ovečka *et al.*, 2014). Ale interakce mezi SIMKK a SAMK nebyla v *M. sativa* potvrzena. Ale na možnou interakci

mezi SIMKK a SAMK poukazuje i interakce mezi dalšími ortology, a to mezi NtMEK2 (ortolog AtMKK4) a NtSIPK (ortolog MPK3) v *Nicotiana tabacum* (Jang *et al.*, 2009). Dále protein MKK4 interaguje s transkripčním faktorem MYB73, který reaguje na stres ze zasolení půdy (Altmann *et al.*, 2020), což odpovídá i SIMKK, který také reaguje na stres ze soli.

Při porovnání sekvencí mezi MsPRKK\_36 a MsPRKK\_48 se sekvencemi AtMKK1 a AtMKK2 pomocí BLAST (viz 4.1.3.1) bylo zjištěno, že podobnost sekvencí nukleotidů (BlastN) je v porovnání s podobností sekvencí proteinů (BlastP) nečekaně vyšší. Při BlastN byla shoda PRKK\_36 s MKK1 68,75 % a s MKK2 70,95 %. A při srovnání proteinů (BlastP) byla shoda PRKK\_36 s MKK1 63,97 % a s MKK2 68,54 %. Stejně jako u porovnání SIMKK, tak i u PRKK mohlo být vyšší procento podobnosti sekvence nukleotidů způsobeno změnou určitých nukleotidů nebo je to dáno rozdílnými délkami sekvencí nukleotidů a proteinů. Bylo zjištěno, že PRKK je v podobnosti sekvencí jak nukleotidů, tak proteinů bližší k MKK2. V literatuře o PRKK (Ichimura *et al.*, 1998a) je uvedeno, že se protein PRKK shoduje s MKK2 v 68% sekvence. Při porovnávání sekvencí proteinů pomocí serverů BlastP bylo zjištěno, že se proteiny PRKK\_36 a MKK2 shodují v 68,54 % a PRKK\_48 a MKK2 se shodují v 59,27 %. Tudíž v literatuře byla použita nejspíš verze sekvence podobná PRKK\_36.

Při porovnání identifikovaných TF na genu *AtMKK2* (viz 4.1.3.1) byly detekovány TF zapoující se do vývoje rostlin (CarG, Bellringer, LFY, RAV1 a T-BOX) a reagující na biotický i abiotický stres (ARF1, MYB2, MYC2, bZIP, WRKY a ABRE). V teoretické části bakalářské práce je uvedeno (Teige *et al.*, 2004), že kinasa MKK2 reaguje na stres z nízkých teplot, což odpovídá funkci identifikovaného transkripčního faktoru ABRE.

Podle informací z databáze TAIR (viz 4.1.3.2) bylo zjištěno, že transkripty *MKK2* mají zvýšenou hladinu při kontaktu rostliny se selenem, cykloheximidem a kyselinou salicylovou. Dále se účastní reakce na zvýšenou intenzitu světla (využito UV-B záření), což odpovídá i detekovaným transkripčním faktorům (bZIP, Abe *et al.*, 1997). Zvýšená hladina transkriptů *MKK2* byla detekována také při biotickém stresu, čemu odpovídá nalezená literatura (Nitta *et al.*, 2020) o *MKK2*, kde byla testována reakce na patogenní elicitor.

Dále byly porovnávány protein-proteinové interakce *MKK2* v *A. thaliana* (viz 4.1.3.4) kdy bylo zjištěno, že interaguje s 6 MAP kinasami a to MPK4, MPK6, MPK10, MPK11, MPK13 a MPK5. Z toho MPK4, MPK5, MPK6, MPK11 a MPK13 odpovídá ortologům v *M. sativa* (kromě SIMK), se kterými interaguje protein MsPRKK, a to jsou MsMMK2

(AtMPK4 a AtMPK5), MsSIMK (AtMPK6) a MsMMK3 (AtMPK13). Navíc AtMKK2 interaguje ještě s AtMPK10, která odpovídá ortologu MsMMK1.

Při fentoyповé analýze *M. sativa* mutantní linie SIMKKi (viz 4.2) bylo zjištěno, že semena divokého typu RSY byly v průměru o něco větší než semena SIMKKi (viz 4.2.1). To bylo dáno jejich rozdílnou délkou (což udalo rozdíl i v kruhovitosti semen), velikosti jejich povrchu a obvodu. Při porovnání vzhledu semen a jejich rozdělení do skupin podle předpokladu vitality bylo procentuální zastoupení semen ve všech třech skupinách jakosti z dostupných dat u obou linií srovnatelné.

Pro automatizaci měření a možnost zpracovat rychleji větší množství dat bylo provedeno porovnání manuálního měření semen s automatickým měřením, a to pomocí programu ImageJ (viz 4.2.2). Měření plochy, délky, šířky a obvodu semen linií RSY a SIMKKi vyšlo bez význačného rozdílu. Rozdíl byl detekován pouze u hodnoty kruhovitosti, kdy vyšly u manuálního měření vyšší hodnoty kruhovitosti než u automatického měření. Z výsledků lze usoudit, že automatické měření většího množství dat v programu ImageJ lze bez rozdílu výsledku využít pro parametry plochy, délky, šířky a obvodu. Tato metoda tedy může být využita v budoucnu pro kvantitativní měření (př. N=1000) dalších dosud neměřených semen pro zvýšení statistické přesnosti analýzy.

Dále se u SIMKKi linie porovnávala vůči RSY délka primárního kořene semenáčů a celkové kořenové soustavy (viz 4.2.3). Lepší růst jak hlavních, tak vedlejších kořenů byla detekována u linie SIMKKi, což může být způsobeno slabší obalovou vrstvou semen linie SIMKKi, a tudíž snadnějším otevřením tohoto obalu a rychlejším klíčením. Dalším problémem u tohoto experimentu byla různá doba vyklíčení semen, i když měla všechna semena stejné podmínky při kultivaci. Tento fakt měl za následek zhoršené porovnávání růstu kořenové soustavy. Při tomto experimentu bylo též nutné dodržovat přísné zásady práce ve sterilních podmínkách, jelikož při zanesení kontaminace na medium bylo nutné tuto část media vyřezat, mladé rostlinky přesadit nebo při vysoké kontaminaci vyhodit celou misku. I přes dodržení sterilních podmínek došlo k plísňové kontaminaci, která se objevila až po několika dnech od přenosu semen, kdy epicentrum růstu plísňových hyf bylo v prasklém semenném obalu, což naznačuje přítomnost spor uvnitř semene. Tudíž semeno nelze plně sterilizovat, jelikož se sterilizuje pouze povrch semen.

Metoda somatické embryogeneze (viz 4.3.1) je vhodná pro transformaci rostlin *M. sativa*, ale je velmi zdlouhavá. Proto je vhodné hledat způsoby, jak tuto metodu urychlit, ale aby se zároveň nesnížila kvalita transformace. Testují se proto různá složení využitých kultivačních medií (medium indukující tvorbu kalusu, medium indukující tvorbu embrya,



medium pro vývoj somatického embrya). V článku Sangra *et al.*, 2019, kde se zabývaly optimalizací transformace *M. sativa*, jsou testovány účinnosti různých kultivačních medií. Při indukci kalusů využili media B5H, MS2D a SH4K, kdy k nejrychlejší indukci kalusů došlo na mediu SH4K, ale za to byly vzniklé kalusy světlé (žluté až bílé). Kvalita vzniklých kalusů může mít pak následně vliv na tvorbu embryí. Proto je potřeba vybrat media i podle množství vytvořených embryí a jejich následného růstu a tvorby nových rostlin. Nejvyšší počet vytvořených kalusů byl při využití medií B5H a B50, které byly využity i při somatické embryogenezi v bakalářské práci. Dále byl vysoký počet embryí vytvořen i na mediích MS2D s B50 a SH4K s BOi2Y. Z tohoto výzkumu vyplývá, že media B5H a B50 poskytují nejvíce využitelných embryí *M. sativa*, a tudíž jsou tato media vhodná pro tvorbu transgenních rostlin. Zlepšení této metody by mohlo proběhnout pomocí testování dalších úprav složení medií (poměru fytohormonů, obsahu podpůrných látek) nebo úpravy kultivačních podmínek (světelný režim, teplota, vlhkost vzduchu).

Při pozorování buněk *A. tumefaciens* po transienční transformaci (viz 4.3.2) bylo možné pozorovat výrazný RFP signál v plazmatické membráně a v jádře buněk, ale v jádru signál detekován nebyl. Tato lokalizace se shoduje i s ortologem MKK2 (viz 4.1.4.2), který byl predikován v jádře, ale i v plazmatické membráně. Kromě toho byl predikován i v cytosolu a mitochondriích. Při transienční transformaci byl viditelný nespecifický RFP signál i v chloroplastech, který byl viditelný z důvodu neodfiltrování emisního spektra RFP.

Při PCR a následné elektroforéze na agarosovém gelu (viz 4.3.3) byl detekován amplifikovaný transgen PRKK Cas9-G3 ve vzorku z rostlin *M. sativa*, tudíž byl ve vzorku přítomný, ale nedokazuje to, jestli byly dané rostliny po transformaci mutantní. Transformace rostlin by se dala také dokázat pomocí selekčního markeru (například gen nesoucí rezistenci na antibiotikum kanamycin, hygromycin nebo na herbicid fosfintocrin) ve vneseném plasmidu a následnou selekcí rostlin na mediu obsahující dané antibiotikum nebo herbicid. Taková selekce proběhla již dřív, a to při růstu kalusů a somatických embryí. Avšak někdy dochází k tomu, že narostou i netransformované rostliny, tzv. „escapery“ a proto je nezbytné rostlinu dále testovat, a to již zmíněnou PCR pro detekci přítomnosti transgenu. Dále by se mohla využít metoda Western blot pro detekci hladiny zkoumaných proteinů využitím specifických protilátek. Pro zkoumání hladin transkriptů by bylo vhodné využít metodu kvantitativní PCR (qRT-PCR). Těmito dvěma metodami by se dali odhalit snížené hladiny exprimovaných genů a vyselektovat rostliny pro následnou sekvenaci a odhalení konkrétních mutací ve čtecím rámci.

## 6 ZÁVĚR

V první části bakalářské práce byla zpracována teoretická rešerše, která se zabývala popisem *M. sativa*. Dále byla práce zaměřená na symbiotickou interakci mezi rostlinami a hlízkovými bakteriemi (Rhizobia) a mechanismem vzniku této symbiózy. V další části rešerše byl popsán mechanismus reakcí v signální dráze MAP kinas, a kterých reakcích v rostlinách se účastní. Následně byly popsány některé z MAP kinas v *M. sativa*. Jelikož je práce zaměřená hlavně na MAPK kinasy SIMKK a PRKK, tak byly popsány dále známé MAP kinasy, se kterými interagují, a to SIMK, SAMK, MMK2 a MMK3. Dále byla bakalářská práce zaměřena na ortology těchto MAP2 kinas v *A. thaliana*. Popsány byly kinasy MKK4/MKK5, MKK1/MKK2, MPK4, MPK3/MPK6, MPK11, MPK13 a MPK10. Na závěr teoretické části byl popsán ortolog PRKK v *N. tabacum*, což je MAPK kinasa SIPKK, která má detekovanou nejvyšší procentuální homologii s PRKK.

V další části bakalářské práce byl popsán využitý materiál a použité metody v praktické části. Praktická část byla rozdělena na tři části, kdy první část se zabývala *in silico* analýzami u MsSIMKK, MsPRKK, AtMKK4 a AtMKK2. ve které byly vytvořeny 3D modely MAPK kinas SIMKK a PRKK. Dále byly tyto dvě kinasy porovnávány s jejich ortology v *A. thaliana*. Při *in silico* analýze AtMKK4 a AtMKK2 byla zjišťována vazebná místa transkripčních faktorů, subcelulární lokalizace, místa popsáných mutací a protein-proteinové interakce s těmito kinasami.

Dále se praktická část zabývala fenotypovou analýzou mutantní linie SIMKK RNAi. Byly vyhodnocovány rozměry semen získaných z transgenních rostlin, které byly upraveny pomocí somatické embryogeneze. Byl měřen jejich povrch, délka a šířka, obvod a kruhovitost. Dále byla tato semena pěstována v *in vitro* podmínkách na kultivačním mediu. Byly pořízeny snímky mladých rostlin z těchto semen, u kterých se měřily délky jejich hlavních a vedlejších kořenů.

Poslední praktická část bakalářské práce byla zaměřená na laboratorní úkony a původní cíle bakalářské práce, které bylo ještě možné provést před uzavřením přístupu do laboratoří. V této části je popsána somatická embryogeneze, ve které se využily listové explantáty *M. sativa* linií RSY. Dále byla provedena transientní transformace na listech *N. benthamiana* pomocí *A. tumefaciens* 35S::PRKK:mRFP v pGWB454, při které se v preparátech z transformovaných listů pozoroval červený fluorescenční signál RFP. Na závěr je popsána PCR, při které se zjišťovala přítomnost transgenu ve vzorcích z listů zkoumaných rostlin *M. sativa* PRKK Cas9-G3.

Charakterizace proteinů slouží k určení jejich funkce v rostlině, jako je například funkce MsSIMKK a MsSIMK v *M. sativa* a jejich vliv na nodulaci a interakci se symbiotickými Rhizobii nebo vliv těchto proteinů na růst stonkové biomasy. Získaných znalostí se poté využívá při zlepšování vlastností hospodářských plodin, jako je vyšší produkce, zlepšení nutričních vlastností nebo odolnost vůči škůdcům. Tím se dá zvýšit výtěžnost těchto plodin za využití stejné plochy pro pěstování. Množství těchto plodin pro spotřebu obyvatelstva je vysoká a zároveň se zmenšuje prostor pro pěstování z důvodu neustálého rozšiřování měst a zvětšování zastavěné plochy, která poté nelze využít pro zemědělství

## 7 REFERENCE

- Abe H., Yamaguchi-Shinozaki K., Urao T., Iwasaki T., Hosokawa D., Shinozaki K. (1997): Role of arabidopsis MYC and MYB homologs in drought-and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell.*; 9(10): 1859-1868. doi: 10.1105/tpc.9.10.1859. PMID: 9368419; PMCID: PMC157027.
- Altmann M., Altmann S., Rodriguez P. A., Weller B., Elorduy Vergara L., Palme J., Marín-de la Rosa N., Sauer M., Wenig M., Villaécija-Aguilar J. A., Sales J., Lin C. W., Pandiarajan R., Young V., Strobel A., Gross L., Carbonnel S., Kugler K. G., Garcia-Molina A., Bassel G. W., Falter C., Mayer K. F. X., Gutjahr C., Vlot A. C., Grill E., Falter-Braun P. (2020): Extensive signal integration by the phytohormone protein network. *Nature*. 2020 Jul;583(7815):271-276. doi: 10.1038/s41586-020-2460-0. Epub 2020 Jul 1. Erratum in: *Nature*. 2020 Aug; 584(7821): E34. PMID: 32612234.
- Arabidopsis Interactome Mapping Consortium (2011): Evidence for network evolution in an Arabidopsis interactome map. *Science*. 2011 Jul 29; 333(6042): 601-7. doi: 10.1126/science.1203877. PMID: 21798944; PMCID: PMC3170756.
- Balsemão-Pires E., Andrade L. R., Sachetto-Martins G. (2013): Functional study of TCP23 in Arabidopsis thaliana during plant development. *Plant Physiol Biochem*. 2013 Jun; 67: 120-5. doi: 10.1016/j.plaphy.2013.03.009. Epub 2013 Mar 26. PMID: 23562796.
- Bao X., Franks R. G., Levin J. Z., Liu Z. (2004): Repression of AGAMOUS by BELLRINGER in floral and inflorescence meristems. *Plant Cell.*; 16(6): 1478-1489. doi: 10.1105/tpc.021147. Epub 2004 May 21. PMID: 15155890; PMCID: PMC490040.
- Beck M., Komis G., Müller J., Menzel D., Šamaj J. (2010): Arabidopsis homologs of nucleus-and phragmoplast-localized kinase 2 and 3 and mitogen-activated protein kinase 4 are essential for microtubule organization. *Plant Cell* 22: 755–71. doi: 10.1105/tpc.109.071746. Epub 2010 Mar 9. PMID: 20215588; PMCID: PMC2861451.
- Beck M., Komis G., Ziemann A., Menzel D., Šamaj J. (2011): Mitogen-activated protein kinase 4 is involved in the regulation of mitotic and cytokinetic microtubule transitions in Arabidopsis thaliana. *New Phytol*. 189: 1069–83. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03565.x. Epub 2010 Dec 14. PMID: 21155826.

- Berriri S., Garcia A. V., Frei dit Frey N., Rozhon W., Pateyron S., Leonhardt N., Montillet J. L., Leung J., Hirt H., Colcombet J. (2012): Constitutively active mitogen-activated protein kinase versions reveal functions of *Arabidopsis* MPK4 in pathogen defense signaling. *Plant Cell*. Oct; 24(10): 4281-93. doi: 10.1105/tpc.112.101253. Epub 2012 Oct 31. PMID: 23115249; PMCID: PMC3517250.
- Berson T., von Wangenheim D., Takáč T., Šamajová O., Rosero A., Ovečka M., Komis G., Stelzer E. H., Šamaj J. (2014): Trans-Golgi network localized small GTPase RabA1d is involved in cell plate formation and oscillatory root hair growth. *BMC Plant Biol*. Sep 27; 14: 252. doi: 10.1186/s12870-014-0252-0. PMID: 25260869; PMCID: PMC4180857.
- Bögre L., Calderini O., Binarova P., Mattauch M., Till S., Kiegerl S., Jonak C., Pollaschek C., Barker P., Huskisson N. S., Hirt H., Heberle-Bors E. (1999): A MAP kinase is activated late in plant mitosis and becomes localized to the plane of cell division. *Plant Cell*. Jan; 11(1): 101-13. PMID: 9878635; PMCID: PMC144092.
- Bush S. M., Krysan P. J. (2007): Mutational evidence that the *Arabidopsis* MAP kinase MPK6 is involved in anther, inflorescence, and embryo development. *J. Exp. Bot.* 58: 2181–91. doi: 10.1093/jxb/erm092. Epub 2007 May 22. PMID: 17519351.
- Cardinale F., Jonak C., Ligterink W., Niehaus K., Boller T., Hirt H. (2000): Differential activation of four specific MAPK pathways by distinct elicitors. *J Biol Chem.*; 275(47): 36734-36740. doi: 10.1074/jbc.M007418200. PMID: 10973984.
- Cardinale F., Meskiene I., Ouaked F., Hirt H (2002): Convergence and divergence of stress-induced mitogen-activated protein kinase signaling pathways at the level of two distinct mitogen-activated protein kinase kinases. *Plant Cell*. Mar; 14(3): 703-11. PMID: 11910015; PMCID: PMC150590..
- Cardon G., Höhmann S., Klein J., Nettekheim K., Saedler H., Huijser P. (1999): Molecular characterisation of the *Arabidopsis* SBP-box genes. *Gene*. Sep 3; 237(1): 91-104. doi: 10.1016/s0378-1119(99)00308-x. PMID: 10524240.
- Chan C. S., Guo L., Shih M. C. (2001): Promoter analysis of the nuclear gene encoding the chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B subunit of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol.*; 46(2): 131-141. doi: 10.1023/a:1010602031070. PMID: 11442054.
- Chandran D., Inada N., Hather G., Kleindt C. K., Wildermuth M. C. (2009): Laser microdissection of *Arabidopsis* cells at the powdery mildew infection site reveals site-specific processes and regulators. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jan 5; 107(1): 460-

5. doi: 10.1073/pnas.0912492107. Epub 2009 Dec 14. PMID: 20018666; PMCID: PMC2806765.
- Chen W., Provart N. J., Glazebrook J., Katagiri F., Chang H. S., Eulgem T., Mauch F., Luan S., Zou G., Whitham S. A., Budworth P. R., Tao Y., Xie Z., Chen X., Lam S., Kreps J. A., Harper J. F., Si-Ammour A., Mauch-Mani B., Heinlein M., Kobayashi K., Hohn T., Dangl J. L., Wang X., Zhu T. (2002): Expression profile matrix of Arabidopsis transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *Plant Cell*. 2002 Mar; 14(3): 559-74. doi: 10.1105/tpc.010410. PMID: 11910004; PMCID: PMC150579.
- Cheng Z., Li J. F., Niu Y., Zhang X. C., Woody O. Z., Xiong Y., Djonović S., Millet Y., Bush J., McConkey B. J., Sheen J., Ausubel F. M. (2015): Pathogen-secreted proteases activate a novel plant immune pathway. *Nature*. May 14; 521(7551): 213-6. doi: 10.1038/nature14243. Epub 2015 Mar 2.
- Choi H., Hong J., Ha J., Kang J., Kim S. Y. (2000): ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *J Biol Chem.*; 275(3): 1723-1730. doi: 10.1074/jbc.275.3.1723. PMID: 10636868.
- Deakin W. J., Broughton W. J. (2009): Symbiotic use of pathogenic strategies: rhizobial protein secretion systems. *Nat Rev Microbiol*. 2009 Apr; 7(4): 312-20. doi: 10.1038/nrmicro2091. Epub 2009 Mar 9. PMID: 19270720.
- Dhanasekaran D. N., Kashef K., Lee C. M., Xu H., Reddy E. P. (2007): Scaffold proteins of MAP-kinase modules. *Oncogene* 26: 3185–202 May 14; 26(22): 3185-202. doi: 10.1038/sj.onc.1210411. PMID: 17496915.
- Dietrich A., Mayer J. E, Hahlbrock K. (1990): Fungal elicitor triggers rapid, transient, and specific protein phosphorylation in parsley cell suspension cultures. *J Biol Chem*. 1990; 265(11): 6360-6368.
- Eschen-Lippold L., Bethke G., Palm-Forster M. A., Pecher P., Bauer N., Glazebrook J., Scheel D., Lee J. (2012): MPK11-a fourth elicitor-responsive mitogen-activated protein kinase in Arabidopsis thaliana. *Plant Signal Behav*. 2012 Sep 1; 7(9): 1203-5. doi: 10.4161/psb.21323. Epub 2012 Aug 17. PMID: 22899057; PMCID: PMC3489662.
- Fähreus G. (1957): The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. *J Gen Microbiol*. 1957 Apr; 16(2): 374-81. doi: 10.1099/00221287-16-2-374. PMID: 13416514.

- Felix G., Grosskopf D. G., Regenass M., Boller T. (1991): Rapid changes of protein phosphorylation are involved in transduction of the elicitor signal in plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Oct 1; 88(19): 8831-4. doi: 10.1073/pnas.88.19.8831. PMID: 11607219; PMCID: PMC52604.
- Fraysse N., Couderc F., Poinot V. (2003): Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium-legume symbiosis. *Eur J Biochem*. 2003 Apr; 270(7): 1365-80. doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03492.x. PMID: 12653992.
- Gao M., Liu J., Bi D., Zhang Z., Cheng F., Chen S., Zhang Y. (2008): MEKK1, MKK1/MKK2 and MPK4 function together in a mitogen-activated protein kinase cascade to regulate innate immunity in plants. *Cell Res*. 2008 Dec; 18(12): 1190-8. doi: 10.1038/cr.2008.300. PMID: 18982020.
- Genot B., Lang J., Berriri S., Garmier M., Gilard F., Pateyron S., Hausteraete K., Van Der Straeten D., Hirt H., Colcombet J. (2017): Constitutively Active *Arabidopsis* MAP Kinase 3 Triggers Defense Responses Involving Salicylic Acid and SUMM2 Resistance Protein. *Plant Physiol*. Jun; 174(2): 1238-1249. doi: 10.1104/pp.17.00378. Epub Apr 11. PMID: 28400495; PMCID: PMC5462049.
- Gomi K., Ogawa D., Katou S., Kamada H., Nakajima N., Saji H., Soyano T., Sasabe M., Machida Y., Mitsuhashi I., Ohashi Y., Seo S. (2005): A mitogen-activated protein kinase NtMPK4 activated by SIPKK is required for jasmonic acid signaling and involved in ozone tolerance via stomatal movement in tobacco. *Plant Cell Physiol*. Dec; 46(12): 1902-14. doi: 10.1093/pcp/pci211. Epub 2005 Oct 5. PMID: 16207744.
- Guo J., Wang S., Wang J., Huang W. D., Liang J., Chen J. G. (2009): Dissection of the relationship between RACK1 and heterotrimeric G-proteins in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol*. 2009 Sep; 50(9): 1681-94. doi: 10.1093/pcp/pcp113. Epub Aug 3. PMID: 19651700.
- Hepworth S. R., Valverde F., Ravenscroft D., Mouradov A., Coupland G. (2002): Antagonistic regulation of flowering-time gene SOC1 by CONSTANS and FLC via separate promoter motifs. *EMBO J*; 21(16): 4327-4337. doi: 10.1093/emboj/cdf432. PMID: 12169635; PMCID: PMC126170.
- Hrbáčková M., Luptovciak I., Hlaváčková K., Dvořák P., Tichá M., Šamajová O., Novák D., Bednarz H., Niehaus K., Ovečka M., Šamaj J. (2020): Overexpression of alfalfa SIMK promotes root hair growth, nodule clustering and shoot biomass production. *Plant Biotechnol J*. 2020 Oct 28. doi: 10.1111/pbi.13503. Epub ahead of print. PMID: 33112469.

- Hoehenwarter W., Thomas M., Nukarinen E., Egelhofer V., Röhrig H., Weckwerth W., Conrath U., Beckers G. J. (2012): Identification of novel in vivo MAP kinase substrates in *Arabidopsis thaliana* through use of tandem metal oxide affinity chromatography. *Mol Cell Proteomics*. Feb; 12(2): 369-80. doi: 10.1074/mcp.M112.020560. Epub Nov 20. PMID: 23172892; PMCID: PMC3567860.
- Hord C. L., Sun Y. J., Pillitteri L. J., Torii K. U., Wang H., Zhang S., Ma H. (2008): Regulation of *Arabidopsis* early anther development by the mitogen-activated protein kinases, MPK3 and MPK6, and the ERECTA and related receptor-like kinases. *Mol Plant*. Jul;1(4):645-58. doi: 10.1093/mp/ssn029. Epub 2008 Jun 3. PMID: 19825569.
- Hudson M. E., Quail P. H. (2003): Identification of promoter motifs involved in the network of phytochrome A-regulated gene expression by combined analysis of genomic sequence and microarray data. *Plant Physiol*. Dec; 133(4): 1605-16. doi: 10.1104/pp.103.030437. PMID: 14681527; PMCID: PMC300717.
- Ichimura K., Mizoguchi T., Hayashida N., Seki M., Shinozaki, K. (1998a): Molecular cloning and characterization of three cDNAs encoding putative mitogen-activated protein kinase kinases (MAPKKs) in *Arabidopsis thaliana*. *DNA Res*. 5, 341–348. doi: 10.1093/dnares/5.6.341. PMID: 10048483.
- Ichimura K., Mizoguchi T., Irie K., Morris P., Giraudat J., Matsumoto K., Shinozaki K. (1998b): Isolation of ATMEKK1 (a MAP kinase kinase kinase)-interacting proteins and analysis of a MAP kinase cascade in *Arabidopsis*. *Biochem Biophys Res Commun*. Dec 18; 253(2): 532-43. doi: 10.1006/bbrc.1998.9796. PMID: 9878570.
- Ichimura K., Mizoguchi T., Yoshida R., Yuasa T., Shinozaki K. (2000): Various abiotic stresses rapidly activate *Arabidopsis* MAP kinases ATMPK4 and ATMPK6. *Plant J*. 24, 655–665. doi: 10.1046/j.1365-313x.2000.00913.x. PMID: 11123804.
- Ishihama N., Yoshioka H. (2012): Post-translational regulation of WRKY transcription factors in plant immunity. *Curr Opin Plant Biol*. 2012 Aug; 15(4): 431-7. doi: 10.1016/j.pbi.2012.02.003. Epub Mar 15. PMID: 22425194.
- Iyer-Pascuzzi A. S., Jackson T., Cui H., Petricka J. J., Busch W., Tsukagoshi H., Benfey P. N. (2011): Cell identity regulators link development and stress responses in the *Arabidopsis* root. *Dev Cell*. Oct 18; 21(4): 770-82.
- Jagodzik P., Tajdel-Zielinska M., Ciesla A., Marczak M., Ludwikow A. (2018): Mitogen-Activated Protein Kinase Cascades in Plant Hormone Signaling. *Front Plant Sci*. 2018 Oct 8; 9: 1387. doi: 10.3389/fpls.2018.01387. PMID: 30349547; PMCID: PMC6187979.



- Jang E. K., Min K. H., Kim S. H., Nam S. H., Zhang S., Kim Y. C., Cho B. H., Yang K. Y. (2009): Mitogen-activated protein kinase cascade in the signaling for polyamine biosynthesis in tobacco. *Plant Cell Physiol.* 2009 Mar; 50(3): 658-64. doi: 10.1093/pcp/pcp009. Epub 2009 Jan 16. PMID: 19151070.
- Jia W., Li B., Li S., Liang Y., Wu X., Ma M., Wang J., Gao J., Cai Y., Zhang Y., Wang Y., Li J., Wang Y. (2016): Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade MKK7-MPK6 Plays Important Roles in Plant Development and Regulates Shoot Branching by Phosphorylating PIN1 in *Arabidopsis*. *PLoS Biol.* Sep 12; 14(9): e1002550. doi: 10.1371/journal.pbio.1002550. PMID: 27618482; PMCID: PMC5019414.
- Jonak C, Nakagami H, Hirt H. (2004): Heavy metal stress. Activation of distinct mitogen-activated protein kinase pathways by copper and cadmium. *Plant Physiol.* 2004 Oct; 136(2): 3276-83. doi: 10.1104/pp.104.045724. Epub 2004 Sep 24. PMID: 15448198; PMCID: PMC523386.
- Jones K. M., Kobayashi H., Davies B. W., Taga M. E., Walker G. C. (2007): How rhizobial symbionts invade plants: the Sinorhizobium-Medicago model. *Nat Rev Microbiol.* 2007 Aug; 5(8): 619-33. doi: 10.1038/nrmicro1705. PMID: 17632573; PMCID: PMC2766523.
- Kagaya Y., Ohmiya K., Hattori T. (1999): RAV1, a novel DNA-binding protein, binds to bipartite recognition sequence through two distinct DNA-binding domains uniquely found in higher plants. *Nucleic Acids Res.* Jan 15; 27(2): 470-8. doi: 10.1093/nar/27.2.470. PMID: 9862967; PMCID: PMC148202.
- Kawczynski W., Dhindsa R. S. (1996): Alfalfa Nuclei Contain Cold-Responsive Phosphoproteins and Accumulate Heat-Stable Proteins during Cold Treatment of Seedlings, *Plant and Cell Physiology*, Volume 37, Issue 8, December 1996, Pages 1204–1210, <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a029075>
- Keshet Y., Seger R. (2010): The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions. *Methods Mol Biol*; 661: 3–38. doi: 10.1007/978-1-60761-795-2\_1. PMID: 20811974.
- Kiegerl S., Cardinale F., Siligan C., Gross A., Baudouin E., Liwosz A., Eklöf S., Till S., Bögre L., Hirt H., Meskiene I. (2000): SIMKK, a mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase, is a specific activator of the salt stress-induced MAPK, SIMK. *Plant Cell.* Nov; 12(11): 2247-58. doi: 10.1105/tpc.12.11.2247. PMID: 11090222; PMCID: PMC150171.

- Kilian J., Whitehead D., Horak J., Wanke D., Weinl S., Batistic O., D'Angelo C., Bornberg-Bauer E., Kudla J. and Harter K. (2007): The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. *The Plant Journal*, 50: 347-363. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03052.x. Epub 2007 Mar 21. PMID: 17376166.
- Kim S. Y., Chung H. J., Thomas T. L. (1997): Isolation of a novel class of bZIP transcription factors that interact with ABA-responsive and embryo-specification elements in the Dc3 promoter using a modified yeast one-hybrid system. *Plant J.* Jun; 11(6): 1237-51. doi: 10.1046/j.1365-313x.1997.11061237.x. PMID: 9225465.
- Kim T. W., Michniewicz M., Bergmann D. C., Wang Z. Y. (2012): Brassinosteroid regulates stomatal development by GSK3-mediated inhibition of a MAPK pathway. *Nature*. 2012 Feb 5; 482(7385): 419-22. doi: 10.1038/nature10794. PMID: 22307275; PMCID: PMC3292258.
- Klepikova A. V., Kasianov A. S., Gerasimov E. S., Logacheva M. D. and Penin A. A. (2016): A high resolution map of the *Arabidopsis thaliana* developmental transcriptome based on RNA-seq profiling. *Plant J.*, 88: 1058-1070. doi: 10.1111/tpj.13312. Epub 2016 Nov 19. PMID: 27549386.
- Kohoutová L., Kourová H., Nagy S. K., Volc J., Halada P., Mészáros T., Meskiene I., Bögre L., Binarová P. (2015): The *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase 6 is associated with  $\gamma$ -tubulin on microtubules, phosphorylates EB1c and maintains spindle orientation under nitrosative stress. *New Phytol.* Sep; 207(4): 1061-74. doi: 10.1111/nph.13501. Epub 2015 Jun 9. PMID: 26061286.
- Komis G., Šamajová O., Ovečka M., Šamaj J. (2018): Cell and Developmental Biology of Plant Mitogen-Activated Protein Kinases. *Annu Rev Plant Biol.* Apr 29; 69: 237-265. doi: 10.1146/annurev-arplant-042817-040314. Epub 2018 Feb 28. PMID: 29489398.
- Kosetsu K., Matsunaga S., Nakagami H., Colcombet J., Sasabe M., Soyano T., Takahashi Y., Hirt H., Machida Y. (2010): The MAP kinase MPK4 is required for cytokinesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell.* Nov; 22(11): 3778-90. doi: 10.1105/tpc.110.077164. Epub 2010 Nov 23. PMID: 21098735; PMCID: PMC3015120.
- Kubát K., Hroudá L., Chrtěk J. jun., Kaplan Z., Kirschner J., Štěpánek J. (2002): Klíč ke květeně České republiky – 928 p., *Academia*, Praha

- Lamb R. S., Hill T. A., Tan Q. K., Irish V. F. (2002): Regulation of APETALA3 floral homeotic gene expression by meristem identity genes. *Development* 2002; 129: 2079–2086. PMID: 11959818.
- Lampard G. R., Macalister C. A., Bergmann D. C. (2008): *Arabidopsis* stomatal initiation is controlled by MAPK-mediated regulation of the bHLH SPEECHLESS. *Science* 322: 1113–16. doi: 10.1126/science.1162263. PMID: 19008449.
- Le B. H., Cheng C., Bui A. Q., Wagmaister J. A., Henry K. F., Pelletier J., Kwong L., Belmonte M., Kirkbride R., Horvath S., Drews G. N., Fischer R. L., Okamoto J. K., Harada J. J., Goldberg R. B. (2010): Global analysis of gene activity during *Arabidopsis* seed development and identification of seed-specific transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 May 4; 107(18): 8063-70. doi: 10.1073/pnas.1003530107. PMID: 20385809; PMCID: PMC2889569.
- Le Gourrierec J., Li Y. F., Zhou D. X. (1999): Transcriptional activation by *Arabidopsis* GT-1 may be through interaction with TFIIA-TBP-TATA complex. *Plant J*. 1999 Jun; 18(6): 663-8. doi: 10.1046/j.1365-313x.1999.00482.x. PMID: 10417717.
- Lee J. S., Huh K. W., Bhargava A., Ellis B. E. (2008): Comprehensive analysis of protein-protein interactions between *Arabidopsis* MAPKs and MAPK kinases helps define potential MAPK signalling modules. *Plant Signal Behav*. 2008 Dec; 3(12): 1037-41. doi: 10.4161/psb.3.12.6848. PMID: 19513235; PMCID: PMC2634456.
- Lee J. S., Kuroha T., Hnilova M., Khatayevich D., Kanaoka M. M., McAbee J. M., Sarikaya M., Tamerler C., Torii K. U. (2012): Direct interaction of ligand-receptor pairs specifying stomatal patterning. *Genes Dev*. 2012 Jan 15; 26(2): 126-36. doi: 10.1101/gad.179895.111. Epub 2012 Jan 12. PMID: 22241782; PMCID: PMC3273837.
- Li Y., Rosso M. G., Strizhov N., Viehoveer P., Weisshaar B. (2003): GABI-Kat SimpleSearch: a flanking sequence tag (FST) database for the identification of T-DNA insertion mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Bioinformatics*. 2003 Jul 22; 19(11): 1441-2. doi: 10.1093/bioinformatics/btg170. PMID: 12874060.
- Ligterink W., Hirt H. (2001): Mitogen-activated protein [MAP] kinase pathways in plants: versatile signaling tools. *Int Rev Cytol*. 2001; 201: 209-75. doi: 10.1016/s0074-7696(01)01004-x. PMID: 11057833.
- Liu Y., Zhang S., Klessig D. F. (2000): Molecular cloning and characterization of a tobacco MAP kinase kinase that interacts with SIPK. *Mol Plant Microbe Interact*. 2000 Jan; 13(1): 118-24. doi: 10.1094/MPMI.2000.13.1.118. PMID: 10656593.

- Meskiene I., Bögre L., Glaser W., Balog J., Brandstötter M., Zwerger K., Ammerer G., Hirt H. (1998): MP2C, a plant protein phosphatase 2C, functions as a negative regulator of mitogen-activated protein kinase pathways in yeast and plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Feb 17; 95(4): 1938-43. doi: 10.1073/pnas.95.4.1938. PMID: 9465121; PMCID: PMC19217.
- Müller J., Beck M., Mettbach U., Komis G., Hause G., Menzel D., Samaj J. (2010): *Arabidopsis* MPK6 is involved in cell division plane control during early root development, and localizes to the pre-prophase band, phragmoplast, trans-Golgi network and plasma membrane. *Plant J*. 2010 Jan; 61(2): 234-48. doi: 10.1111/j.1365-313X.2009.04046.x. Epub 2009 Oct 12. PMID: 19832943.
- Munnik, T., Ligterink, W., Meskiene, I., Calderini, O., Beyerly, J., Musgrave, A., and Hirt, H. (1999): Distinct osmo-sensing protein kinase pathways are involved in signalling moderate and severe hyper-osmotic stress. *Plant J*. **20**, 381–388. doi: 10.1046/j.1365-313x.1999.00610.x. PMID: 10607291.
- Nakagami H., Kiegerl S., Hirt H. (2004): OMTK1, a novel MAPKKK, channels oxidative stress signaling through direct MAPK interaction. *J Biol Chem*. 2004 Jun 25; 279(26): 26959-66. doi: 10.1074/jbc.M312662200. Epub 2004 Mar 19. PMID: 15033984.
- Narsai R., Law S. R., Carrie C., Xu L., Whelan J. (2011): In-depth temporal transcriptome profiling reveals a crucial developmental switch with roles for RNA processing and organelle metabolism that are essential for germination in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 2011 Nov; 157(3): 1342-62.
- Nishimura A., Yamamoto K., Oyama M., Kozuka-Hata H., Saito H., Tatebayashi K. (2016): Scaffold protein Ahk1, which associates with Hkr1, Sho1, Ste11, and Pbs2, inhibits cross talk signaling from the Hkr1 osmosensor to the Kss1 mitogen-activated protein kinase. *Mol. Cell. Biol*. 36: 1109–23. doi: 10.1128/MCB.01017-15. PMID: 26787842; PMCID: PMC4800789.
- Nitta Y., Ding P., Zhang Y. (2014): Identification of additional MAP kinases activated upon PAMP treatment. *Plant Signal Behav*. 2014; 9(11): e976155. doi: 10.4161/15592324.2014.976155. PMID: 25482788; PMCID: PMC4623049.
- Nitta Y., Qiu Y., Yaghmaiean H., Zhang Q., Huang J., Adams K., Zhang Y. (2020): MEKK2 inhibits activation of MAP kinases in *Arabidopsis*. *Plant J*, 103: 705-714. <https://doi.org/10.1111/tpj.14763>

- Oldroyd G. E., Murray J. D., Poole P. S., Downie J. A. (2011): The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annu Rev Genet.* 2011; 45: 119-44. doi: 10.1146/annurev-genet-110410-132549. Epub 2011 Aug 11. PMID: 21838550.
- O'Malley R. C., Alonso J. M., Kim C. J., Leisse T. J., Ecker J. R. (2007): An adapter ligation-mediated PCR method for high-throughput mapping of T-DNA inserts in the *Arabidopsis* genome. *Nat Protoc.* 2007; 2(11): 2910-7. doi: 10.1038/nprot.2007.425. PMID: 18007627.
- Orvar B. L., Sangwan V., Omann F., Dhindsa R. S. (2000): Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *Plant J.* 2000 Sep; 23(6): 785-94. doi: 10.1046/j.1365-313x.2000.00845.x. PMID: 10998189.
- Ouaked F., Rozhon W., Lecourieux D., Hirt H. (2003): A MAPK pathway mediates ethylene signaling in plants. *EMBO J.* 2003 Mar 17; 22(6): 1282-8. doi: 10.1093/emboj/cdg131. PMID: 12628921; PMCID: PMC151067.
- Ovečka M., Takáč T., Komis G., Vadovič P., Bekešová S., Doskočilová A., Šamajová V., Luptovčiak I., Samajová O., Schweighofer A., Meskiene I., Jonak C., Křenek P., Lichtscheidl I., Škultéty L., Hirt H., Šamaj J. (2014): Salt-induced subcellular kinase relocation and seedling susceptibility caused by overexpression of *Medicago* SIMKK in *Arabidopsis*. *J Exp Bot.* 2014 Jun; 65(9): 2335-50. doi: 10.1093/jxb/eru115. Epub 2014 Mar 19. PMID: 24648569; PMCID: PMC4036504.
- Peck M. C., Fisher R. F., Long S. R. (2006): Diverse flavonoids stimulate NodD1 binding to nod gene promoters in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol.* 2006 Aug; 188(15): 5417-27. doi: 10.1128/JB.00376-06. PMID: 16855231; PMCID: PMC1540014.
- Petersen M., Brodersen P., Naested H., Andreasson E., Lindhart U., Johansen B., Nielsen H. B., Lacy M., Austin M. J., Parker J. E., Sharma S. B., Klessig D. F., Martienssen R., Mattsson O., Jensen A. B., Mundy J. (2000): *Arabidopsis* map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell.* 2000 Dec 22; 103(7): 1111-20. doi: 10.1016/s0092-8674(00)00213-0. PMID: 11163186.
- Pitzschke A. (2015): Modes of MAPK substrate recognition and control. *Trends Plant Sci.* 2015 Jan; 20(1): 49-55. doi: 10.1016/j.tplants.2014.09.006. Epub 2014 Oct 6. PMID: 25301445.
- Popescu S. C., Popescu G. V., Bachan S., Zhang Z., Gerstein M., Snyder M., Dinesh-Kumar S. P. (2009): MAPK target networks in *Arabidopsis thaliana* revealed using functional protein microarrays. *Genes Dev.* 2009 Jan 1; 23(1): 80-92. doi: 10.1101/gad.1740009. Epub 2008 Dec 18. PMID: 19095804; PMCID: PMC2632172.

- Procházka Stanislav (1998): Fyziologie rostlin. Vyd. 1. Praha: *Academia*. ISBN 80-200-0586-2.
- Randuška D., Šomšák L., Háberová I. (1986): Barevný atlas rostlin. 3. Vydání (2. čes. opr. vyd.). *Obzor*: Bratislava. ISBN 65-010-86, 640 stran.
- Ryu K. H., Huang L., Kang H. M., Schiefelbein J. (2019): Single-Cell RNA Sequencing Resolves Molecular Relationships Among Individual Plant Cells. *Plant Physiol.* 2019 Apr; 179(4): 1444-1456. doi: 10.1104/pp.18.01482. Epub 2019 Feb 4. PMID: 30718350; PMCID: PMC6446759.
- Sablowski R. W., Moyano E., Cullanez-Macia F. A., Schuch W., Martin C., Bevan M. (1994): A flower-specific Myb protein activates transcription of phenylpropanoid biosynthetic genes. *EMBO J.* 1994 Jan 1; 13(1): 128-37. PMID: 8306956; PMCID: PMC394786.
- Šamaj J., Ovečka M., Hlavačka A., Lecourieux F., Meskiene I., Lichtscheidl I., Lenart P., Salaj J., Volkmann D., Bögre L., Baluska F., Hirt H. (2002): Involvement of the mitogen-activated protein kinase SIMK in regulation of root hair tip growth. *EMBO J.* 2002 Jul 1; 21(13): 3296-306. doi: 10.1093/emboj/cdf349. PMID: 12093731; PMCID: PMC126098.
- Šamajová O., Komis G., Šamaj J. (2013): Emerging topics in the cell biology of mitogen-activated protein kinases. *Trends Plant Sci.* 2013 Mar; 18(3): 140-8. doi: 10.1016/j.tplants.2012.11.004. Epub 2013 Jan 4. PMID: 23291243.
- Sangra A., Shahin L., Dhir S. K. (2019): Long-Term Maintainable Somatic Embryogenesis System in Alfalfa (*Medicago sativa*) Using Leaf Explants: Embryogenic Sustainability Approach. *Plants (Basel)*. 2019 Aug 9; 8(8): 278. doi: 10.3390/plants8080278. PMID: 31405007; PMCID: PMC6724077.
- Sangwan V., Foulds I., Singh J., Dhindsa R.S. (2001): Cold-activation of Brassica napus BN115 promoter is mediated by structural changes in membranes and cytoskeleton, and requires Ca<sup>2+</sup> influx. *Plant J.* 2001 Jul; 27(1): 1-12. doi: 10.1046/j.1365-313x.2001.01052.x. PMID: 11489178.
- Sangwan V., Orvar B. L., Beyerly J., Hirt H., Dhindsa R. S. (2002): Opposite changes in membrane fluidity mimic cold and heat stress activation of distinct plant MAP kinase pathways. *Plant J.* 2002; 31(5): 629-638. doi: 10.1046/j.1365-313x.2002.01384.x. PMID: 12207652.

- Sangwan V., Dhindsa R. S. (2002): In vivo and in vitro activation of temperature-responsive plant map kinases. *FEBS Lett.* 2002 Nov 20; 531(3): 561-4. doi: 10.1016/s0014-5793(02)03626-8. PMID: 12435611.
- Satoh R., Fujita Y., Nakashima K., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2004): A novel subgroup of bZIP proteins functions as transcriptional activators in hypoosmolarity-responsive expression of the ProDH gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 2004 Mar; 45(3): 309-17. doi: 10.1093/pcp/pch036. PMID: 15047879.
- Singh R., Lee M. O., Lee J. E., Choi J., Park J. H., Kim E. H., Yoo R. H., Cho J. I., Jeon J. S., Rakwal R., Agrawal G. K., Moon J. S., Jwa N. S. (2012): Rice mitogen-activated protein kinase interactome analysis using the yeast two-hybrid system. *Plant Physiol.* 2012 Sep; 160(1): 477-87. doi: 10.1104/pp.112.200071. Epub 2012 Jul 11. PMID: 22786887; PMCID: PMC3440221.
- Smékalová V., Doskočilová A., Komis G., Šamaj J. (2014a): Crosstalk between secondary messengers, hormones and MAPK modules during abiotic stress signalling in plants. *Biotechnol Adv.* 2014 Jan-Feb; 32(1): 2-11. doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.07.009. Epub 2013 Aug 2. PMID: 23911976.
- Smékalová V., Luptovčíak I., Komis G., Šamajová O., Ovečka M., Doskočilová A., Takáč T., Vadovič P., Novák O., Pechan T., Ziemann A., Košútová P., Šamaj J. (2014b): Involvement of YODA and mitogen activated protein kinase 6 in *Arabidopsis* post-embryogenic root development through auxin up-regulation and cell division plane orientation. *New Phytol.* 2014 Sep; 203(4): 1175-93. doi: 10.1111/nph.12880. Epub 2014 Jun 13. PMID: 24923680; PMCID: PMC4414326.
- Sörensson C., Lenman M., Veide-Vilg J., Schopper S., Ljungdahl T., Grøtli M., Tamás M. J., Peck S. C., Andreasson E. (2012): Determination of primary sequence specificity of *Arabidopsis* MAPKs MPK3 and MPK6 leads to identification of new substrates. *Biochem J.* 2012 Sep 1; 446(2): 271-8. doi: 10.1042/BJ20111809. PMID: 22631074.
- Stanko V., Giuliani C., Retzer K., Djamei A., Wahl V., Wurzinger B., Wilson C., Heberle-Bors E., Teige M., Kragler F. (2014): Timing is everything: highly specific and transient expression of a MAP kinase determines auxin-induced leaf venation patterns in *Arabidopsis*. *Mol Plant.* 2014 Nov; 7(11): 1637-1652. doi: 10.1093/mp/ssu080. Epub 2014 Jul 26. Erratum in: *Mol Plant.* 2015 May;8(5):829. PMID: 25064848; PMCID: PMC4228985.

- Su S. H., Krysan P. J. (2016): A double-mutant collection targeting MAP kinase related genes in *Arabidopsis* for studying genetic interactions. *Plant J.* 2016 Dec; 88(5): 867-878. doi: 10.1111/tpj.13292. Epub 2016 Oct 18. PMID: 27490954.
- Su J., Xu J., Zhang S. (2015): RACK1, scaffolding a heterotrimeric G protein and a MAPK cascade. *Trends Plant Sci.* 2015 Jul; 20(7): 405-7. doi: 10.1016/j.tplants.2015.05.002. Epub 2015 May 16. PMID: 25986967.
- Suhita D., Raghavendra A. S., Kwak J. M., Vavasseur A. (2004): Cytoplasmic alkalization precedes reactive oxygen species production during methyl jasmonate and abscisic acid-induced stomatal closure. *Plant Physiol.* 2004 Apr; 134(4): 1536-45. doi: 10.1104/pp.103.032250. Epub 2004 Apr 2. PMID: 15064385; PMCID: PMC419829.
- Sun T., Nitta Y., Zhang Q., Wu D., Tian H., Lee J. S., Zhang Y. (2018): Antagonistic interactions between two MAP kinase cascades in plant development and immune signaling. *EMBO Rep.* 2018 Jul; 19(7): e45324. doi: 10.15252/embr.201745324. Epub 2018 May 22. PMID: 29789386; PMCID: PMC6030703.
- Suzuki T., Matsushima C., Nishimura S., Higashiyama T., Sasabe M., Machida Y. (2016): Identification of Phosphoinositide-Binding Protein PATELLIN2 as a Substrate of *Arabidopsis* MPK4 MAP Kinase during Septum Formation in Cytokinesis. *Plant Cell Physiol.* 2016 Aug; 57(8): 1744-55. doi: 10.1093/pcp/pcw098. Epub 2016 May 19. PMID: 27335345; PMCID: PMC4970614.
- Tanoue T., Nishida E. (2003): Molecular recognitions in the MAP kinase cascades. *Cell Signal.* 2003 May; 15(5): 455-62. doi: 10.1016/s0898-6568(02)00112-2. PMID: 12639708.
- Teakle G. R., Manfield I. W., Graham J. F., Gilmartin P. M. (2002): *Arabidopsis thaliana* GATA factors: organisation, expression and DNA-binding characteristics. *Plant Mol Biol.* 2002 Sep; 50(1): 43-57. doi: 10.1023/a: 1016062325584. PMID: 12139008.
- Teige M., Scheikl E., Eulgem T., Dóczi R., Ichimura K., Shinozaki K., Dangl J. L., Hirt H. (2004): The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in *Arabidopsis*. *Mol Cell.* 2004 Jul 2; 15(1): 141-52. doi: 10.1016/j.molcel.2004.06.023. PMID: 15225555.
- Tremousaygue D., Manevski A., Bardet C., Lescure N., Lescure B. (1999): Plant interstitial telomere motifs participate in the control of gene expression in root meristems. *Plant J.* 1999 Dec; 20(5): 553-61. doi: 10.1046/j.1365-313x.1999.00627.x. PMID: 10652127.



- Turner J. G., Ellis C., Devoto A. (2002): The jasmonate signal pathway. *Plant Cell*. 2002; 14 Suppl (Suppl): S153-64. doi: 10.1105/tpc.000679. PMID: 12045275; PMCID: PMC151253.
- Ulmasov T., Hagen G., Guilfoyle T. J. (1999): Dimerization and DNA binding of auxin response factors. *Plant J*. 1999 Aug; 19(3): 309-19. doi: 10.1046/j.1365-313x.1999.00538.x. PMID: 10476078.
- Van Hoewyk D., Takahashi H., Inoue E., Hess A., Tamaoki M., Pilon-Smits E. A. H. (2008): Transcriptome analyses give insights into selenium-stress responses and selenium tolerance mechanisms in *Arabidopsis*. *Physiologia Plantarum*, 132: 236-253. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.01002.x>
- Van Leene J., Han C., Gadeyne A., Eeckhout D., Matthijs C., Cannoot B., De Winne N., Persiau G., Van De Slijke E., Van de Cotte B., Stes E., Van Bel M., Storme V., Impens F., Gevaert K., Vandepoele K., De Smet I., De Jaeger G. (2019): Capturing the phosphorylation and protein interaction landscape of the plant TOR kinase. *Nat Plants*. 2019 Mar; 5(3): 316-327. doi: 10.1038/s41477-019-0378-z. Epub 2019 Mar 4. PMID: 30833711.
- Viard M. P., Martin F., Pugin A., Ricci P., Blein J. P. (1994): Protein Phosphorylation Is Induced in Tobacco Cells by the Elicitor Cryptogein. *Plant Physiol*. 1994 Apr; 104(4): 1245-1249. doi: 10.1104/pp.104.4.1245. PMID: 12232163; PMCID: PMC159287.
- Vaz Martins T., Livina V. N. (2019): What Drives Symbiotic Calcium Signalling in Legumes? Insights and Challenges of Imaging. *Int J Mol Sci*. 2019 May 7; 20(9): 2245. doi: 10.3390/ijms20092245. PMID: 31067698; PMCID: PMC6539980.
- Wang H., Ngwenyama N., Liu Y., Walker J. C., Zhang S. (2007): Stomatal development and patterning are regulated by environmentally responsive mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 2007 Jan; 19(1): 63-73. doi: 10.1105/tpc.106.048298. Epub 2007 Jan 26. PMID: 17259259; PMCID: PMC1820971.
- Wang W., Barnaby J. Y., Tada Y., Li H., Tör M., Caldelari D., Lee D. U., Fu X. D., Dong X. (2011): Timing of plant immune responses by a central circadian regulator. *Nature*. 2011 Feb 3; 470(7332): 110-4. doi: 10.1038/nature09766. PMID: 21293378; PMCID: PMC6601609.
- Wang F., Shang Y., Fan B., Yu J. Q., Chen Z. (2014): *Arabidopsis* LIP5, a positive regulator of multivesicular body biogenesis, is a critical target of pathogen-responsive

- MAPK cascade in plant basal defense. *PLoS Pathog.* 2014 Jul 10;10(7): e1004243. doi: 10.1371/journal.ppat.1004243. PMID: 25010425; PMCID: PMC4092137.
- Waskiewicz A. J., Cooper J. A. (1995): Mitogen and stress response pathways: MAP kinase cascades and phosphatase regulation in mammals and yeast. *Curr Opin Cell Biol.* 1995 Dec; 7(6): 798-805. doi: 10.1016/0955-0674(95)80063-8. PMID: 8608010.
- Whitmarsh A. J., Davis R. J. (1998): Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals. *Trends Biochem Sci.* 1998 Dec; 23(12): 481-5. doi: 10.1016/s0968-0004(98)01309-7. PMID: 9868371.
- Winter D., Vinegar B., Nahal H., Ammar R., Wilson G. V., Provart N. J. (2007): An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS One.* 2007 Aug 8; 2(8): e718. doi: 10.1371/journal.pone.0000718. PMID: 17684564; PMCID: PMC1934936.
- Xing T., Malik K., Martin T., Miki B. L. (2001): Activation of tomato PR and wound-related genes by a mutagenized tomato MAP kinase kinase through divergent pathways. *Plant Mol Biol.* 2001 May; 46(1): 109-20. doi: 10.1023/a:1010633215445. PMID: 11437246.
- Yang S., Wang Q., Fedorova E., Liu J., Qin Q., Zheng Q., Price P. A., Pan H., Wang D., Griffiths J. S., Bisseling T., Zhu H. (2017): Microsymbiont discrimination mediated by a host-secreted peptide in *Medicago truncatula*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017 Jun 27; 114(26): 6848-6853. doi: 10.1073/pnas.1700460114. Epub 2017 Jun 12. PMID: 28607056; PMCID: PMC5495240.
- Yu D., Chen C., Chen Z. (2001): Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of NPR1 gene expression. *Plant Cell.* 2001 Jul; 13(7): 1527-40. doi: 10.1105/tpc.010115. PMID: 11449049; PMCID: PMC139550.
- 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*. *New Phytol.* 2010 Nov; 188(3): 762-73. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03422.x. Epub 2010 Aug 26. PMID: 20796215.
- Zeng Q., Sritubtim S., Ellis B. E. (2011a): AtMKK6 and AtMPK13 are required for lateral root formation in *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav.* 2011 Oct; 6(10): 1436-9. doi: 10.4161/psb.6.10.17089. Epub 2011 Oct 1. PMID: 21904115; PMCID: PMC3256364.
- Zeng Q., Chen J. G., Ellis B. E. (2011b): AtMPK4 is required for male-specific meiotic cytokinesis in *Arabidopsis*. *Plant J.* 2011 Sep; 67(5): 895-906. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04642.x. Epub 2011 Jun 29. PMID: 21575092.

### **Hypertextové odkazy:**

Ref. 1: <https://botany.cz/cs/medicago-sativa> (navštíveno 27.8.2020)

Ref. 2: <https://biology.anu.edu.au/news-events/news/nodulation-legumes> (navštíveno 18.4.2021)

Ref. 3:

([http://www.botanickafotogalerie.cz/fotogalerie.php?lng=cz&latName=Medicago%20sativa&czName=tolice%20set%C3%A1%20\(vojt%C4%9B%C5%A1ka\)&title=Medicago%20sativa%20|%20tolice%20set%C3%A1%20\(vojt%C4%9B%C5%A1ka\)&showPhoto\\_variant=photo\\_description&show\\_sp\\_descr=true&spec\\_syntax=species&sortby=cz](http://www.botanickafotogalerie.cz/fotogalerie.php?lng=cz&latName=Medicago%20sativa&czName=tolice%20set%C3%A1%20(vojt%C4%9B%C5%A1ka)&title=Medicago%20sativa%20|%20tolice%20set%C3%A1%20(vojt%C4%9B%C5%A1ka)&showPhoto_variant=photo_description&show_sp_descr=true&spec_syntax=species&sortby=cz)) (navštíveno 9.4.2021)

Ref. 4: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (navštíveno 3.11.2020)

Ref. 5: <https://www.alfalfatoolbox.org/> (navštíveno 24.11.2020)

Ref. 6: <https://swissmodel.expasy.org> (navštíveno 10.11.2020)

Ref. 7: <https://www.expasy.org/> (navštíveno 11.4.2021)

Ref. 8: <https://web.expasy.org/translate/> (navštíveno 10.4.2021)

Ref. 9: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (navštíveno 24.11.2020)

Ref. 10: <https://agris-knowledgebase.org> (navštíveno 20.9.2020)

Ref. 11: <https://www.arabidopsis.org/index.jsp> (navštíveno 3.11.2020)

Ref. 12: <https://suba.live/> (navštíveno 21.9.2020)

Ref. 13: <https://www.ebi.ac.uk/intact/> (navštíveno 3.12.2020)

Ref. 14: <https://www.uniprot.org/> (navštíveno 3.12.2020)

Ref. 15: <https://www.arabidopsis.org/portals/expression/microarray/ATGenExpress.jsp> (navštíveno 3.12.2020)

Ref. 16: <https://jorgensen.biology.utah.edu/wayned/ape/> (navštíveno 5.12.2020)

Ref. 17: <http://dog.biocuckoo.org/down.php> (navštíveno 4.11.2020)

Ref. 18: <https://imagej.nih.gov/ij/download.html> (navštíveno 4.11.2020)

Ref. 19: <https://www.zeiss.com/microscopy/int/products/microscope-software/zen-lite.html> (navštíveno 15.11.2020)

Ref. 20: [https://www.arabidopsis.org/entity/person\\_detail/4551](https://www.arabidopsis.org/entity/person_detail/4551) (navštíveno 18.5.2021)

Ref. 21: [https://www.arabidopsis.org/entity/person\\_detail/4624](https://www.arabidopsis.org/entity/person_detail/4624) (navštíveno 18.5.2021)

Ref. 22: [https://jana-strouhalova.webnode.cz/\\_files/200000244-e6646e7608/vojteska\\_den\\_7\\_%20\(2\).JPG](https://jana-strouhalova.webnode.cz/_files/200000244-e6646e7608/vojteska_den_7_%20(2).JPG) (navštíveno 21.5.2021)

Ref. 23: [https://web2.mendelu.cz/af\\_222\\_multitext/trek/index.php?N=5&I=2](https://web2.mendelu.cz/af_222_multitext/trek/index.php?N=5&I=2) (navštíveno 21.5.2021)

## **8 SEZNAM ZKRATEK**

ARF1 (z angl. auxin response factor 1, faktor odpovídající na auxin 1)

BiFC (z angl. Bimolecular fluorescent complementation)

BLAST (z angl. Basic local alignment search tool)

BRX (z lat. Brevix radix, krátký kořen)

CD motiv (z angl. common docking motif, obecný dokovací motiv)

CDS (z angl. coding sequences, kódující sekvence)

CHC2 (z angl. Clathrin heavy chain 2, těžký řetězec na Clathrin 2)

Col-0 (Columbia-0)

CSN5B (z angl. COP5 signalosome complex subunit 5B, COP5 podjednotka 5B signalosomového komplexu)

DAT (z angl. days after cultivation, dny po kultivaci)

D motiv (z angl. docking motif, dokovací motiv)

FPA (z angl. Flowering time control, kontrola doby kvetení)

GFP (z angl. green fluorescent protein, zelený fluorescenční protein)

IPT (isopentenyltransferáza)

JA (z angl. jasmonic acid, jasmoová kyselina)

LB medium (z angl. lysogeny broth)

LFY (Leafy)

LIP5 (Lyst-interacting protein 5)

LSM (z angl. light sheet microscopy)

MAPK (mitogen aktivovaná protein kinasa)

MAPKK (mitogen aktivovaná protein kinasa kinasa)

MAPKKK (mitogen aktivovaná protein kinasa kinasa kinasa)

MS medium (Murashige and Skoog medium)

MsPRKK\_36 (MsPRKK\_MSAD\_280536)

MsPRKK\_48 (MsPRKK\_MSAD\_250548)

MVB (z angl. multivesicular bodies, multivezikulární tělíska)

NCBI (z angl. National center for biotechnology information, Národní centrum pro biotechnologické informace)

NCR protein (z angl. nodule-specific cysteine rich protein, nodulově specifický protein bohatý na cystein)

NPR1 (z angl. nonexpressor of PR genes 1, neexpresor PR genů)

OD (z angl. optical density, optická denzita)

OMTK1 (z angl. oxidative-stress activated MAPKKK, oxidativním stresem aktivovaná MAPKKK)

PAMP (z angl. pathogen-associated molecular pattern, molekulární struktury asociované s patogenem)

PIN1 (Pinformed 1)

PME31 (pektin esterasa 31)

PRKK (patogenním elicitorem aktivovaná MAPKK)

OE (z angl. overexpression, nadexprese)

qRT-PCR (z angl. quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, kvantitativní polymerázová řetězová reakce využívající reverzní transkripci)

RFP (z angl. red fluorescent protein, červený fluorescenční protein)

RSY (Regen SY)

SAMK (stresem aktivovaná MAPK)

SIMK (solným stresem indukovaná MAPK)

SIMKK (solným stresem indukovaná MAPKK)

SIMKKi (SIMKK RNA interference)

SOS1 (z angl. Salinity overly sensitive 1)

SPL (Sporocytless)

TAIR (z angl. The Arabidopsis information resources)

YDA (MAPKKK YODA)

YE (z angl. yeast elicitor, kvasinkový elicitor)

YFP (z angl. yellow fluorescent protein, žlutý fluorescenční protein)

## 9. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Seznam použitých primerů pro PCR	35
Tabulka 2: Složení PCR reakce pro testování přítomnosti transgenů v <i>M. sativa</i> PRKK Cas9-G3	35
Tabulka 3: PCR cyklus v Thermocycleru	35
Tabulka 4: Porovnání sekvence proteinů (BlastP) a nukleotidů (BlastN) mezi MsSIMKK a AtMKK4/5	38
Tabulka 5: Vazebná místa pro transkripční faktory na promotoru genu <i>AtMKK2</i>	40
Tabulka 6: Protein-proteinové interakce AtMKK4	42
Tabulka 7: Mutace genu <i>AtMKK4</i> s koordinátami 19154323 - 19156338 bp na chromosomu 1	43
Tabulka 8: Proteinové domény na proteinu AtMKK4 (AT1G51660.1)	44
Tabulka 9: Porovnání sekvence proteinů (BlastP) mezi MsPRKK a AtMKK1/2	45
Tabulka 10: Porovnání sekvence nukleotidů (BlastN) mezi MsPRKK a AtMKK1/2	45
Tabulka 11: Vazebná místa pro transkripční faktory na promotoru genu <i>AtMKK2</i>	47
Tabulka 12: Protein-proteinové interakce AtMKK2	49
Tabulka 13: Mutace genu <i>AtMKK2</i> s koordinátami 14593039 - 14595303 bp na chromosomu 4	50
Tabulka 14: Proteinové domény na proteinu AtMKK2 (AT4G29810.2)	51
Tabulka 15: Počty semen, které byly využity pro měření fenotypu transgenové SIMKKi	54

## 10. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Životní cyklus <i>M. sativa</i>	4
Obrázek 2: Symbiotické bakterie fixující dusík (Rhizobia)	5
Obrázek 3: Obecné schéma MAPK kaskády	8
Obrázek 4 Schéma MAPK kaskád v <i>M. sativa</i> obsahující MAPK kinasy SIMKK a PRKK	10
Obrázek 5: Vliv MAP kinasy SIMK na růst nadzemní části rostliny a nodulaci.	13
Obrázek 6: 3D struktura MsSIMKK s vyznačenými Ser/Thr sekvencemi.	37
Obrázek 7: Umístění vazebných míst pro transkripční faktory na protomoru genu <i>AtMKK4</i> .	40
Obrázek 8: Znázornění domén a lokalizace možných mutací mitogen-aktivované protein kinasy <i>AtMKK4</i> v programu DOG.2.0.	44
Obrázek 9: 3D struktura MsPRKK s vyznačenými Ser/Thr sekvencemi.	44
Obrázek 10: Umístění vazebných míst pro transkripční faktory na protomoru genu <i>AtMKK2</i> .	47
Obrázek 11: Znázornění domén a lokalizace možných mutací mitogen-aktivované protein kinasy <i>AtMKK2</i> v programu DOG.2.0.	51
Obrázek 12: Měření fenotypu semen z rostlin trangenní linie <i>M. sativa</i> SIMKKi a kontroly RSY.	53
Obrázek 13: Porovnání automatického a manuálního měření semen linií RSY (A, C, E, G, I) a SIMKKi (B, D, F, H, J) pomocí programu ImageJ.	55
Obrázek 14: Somatická embryogeneze <i>M. sativa</i> linie RSY.	56
Obrázek 15: Transientní transformace listů <i>N. benthamiana</i> pomocí <i>A. tumefaciens</i> 35S:: <i>PRKK:mRFP</i> v pGWB454.	58
Obrázek 16: Transientní transformace listů <i>N. benthamiana</i> pomocí <i>A. tumefaciens</i> 35S:: <i>PRKK:mRFP</i> v pGWB454.	59
Obrázek 17: Detekce amplifikovaného fragmentu DNA PRKK Cas9-G3 ze vzorků listů <i>M. sativa</i> po elektroforéze na agarosovém gelu.	60

## **11. SEZNAM PŘÍLOH**

Příloha 1: Sekvence využitých MAPK kinas

1. MsSIMKK sekvence nukleotidů (z NCBI)
2. MsSIMKK sekvence proteinu (z NCBI)
3. AtMKK4 sekvence nukleotidů (z NCBI)
4. AtMKK4 sekvence proteinu (z NCBI)
5. AtMKK5 sekvence nukleotidů (z NCBI)
6. AtMKK5 sekvence proteinu (z NCBI)
7. MsPRKK\_36 sekvence nukleotidů (z Alfalfa Tool box)
8. MsPRKK\_36 sekvence proteinu (z Alfalfa Tool box)
9. MsPRKK\_48 sekvence nukleotidů (z Alfalfa Tool box)
10. MsPRKK\_48 sekvence proteinu (z Alfalfa Tool box)
11. AtMKK1 sekvence nukleotidů (z NCBI)
12. AtMKK1 sekvence proteinu (z NCBI)
13. AtMKK2 sekvence nukleotidů (z NCBI)
14. AtMKK2 sekvence proteinu (z NCBI)



Příloha 1: Sekvence nukleotidů a proteinů využitých MAPK kinas (zeleně značené start kodony, červeně značené stop kodony)

1. MsSIMKK sekvence nukleotidů (z NCBI, Ref. 4)

>AJ293274.1 *Medicago sativa* subsp. *x varia* mRNA for MEK map kinase kinase (simkk gene)

**ATG**AGGCCGATTCAGCTTCCACCACCAACCGCCACCGGCTCAGCCACCGCC  
TCCGGTTCACCAAACAACAACAACAGCCGCCCTCAACGCCGCCGCAAA  
GATCATCTAACTCTACCGCTTCCACAGCGTGACACAAACCTCGCTGTTCCAC  
TTCCGCTTCCACCATCCGGTGGCAGCGGTGGAAGCGGTGGTGGAGGAAACG  
GAAGCGGTAGCGGAGGAGCGAGTCAACAGCTAGTGATTCTTTTTCCGAGC  
TAGAAAGATTGAACCGGATCGGAAGCGGAAGTGGAGGAACGGTTTACAAA  
GTAGTTCACAAAATCAACGGTCGTGCTTATGCTTTGAAGGTGATATACGGAC  
ATCACGAGGAATCAGTTCGTCGTCAGATCCATCGTGAAATCCAGATCTTGCG  
TGATGTTGATGATGTTAACGTGGTCAAGTGTCATGAGATGTACGATCACAAAC  
GCTGAGATTCAGGTTTTGCTTGAGTACATGGACGGTGGATCTCTCGAAGGG  
AAACATATTCCTCAGGAAAATCAACTCGCTGACGTGGCACGTCAGATCCTC  
CGTGGACTCGCCTATCTCCACCGTCGTCACATCGTTCATCGTGATATCAAAC  
CTTCGAATCTGTTGATAAATTCACGGAAACAGGTGAAGATCGCTGATTTTGG  
TGTAGGAAGAATTCTGAATCAAACGATGGATCCGTGTAATTCATCGGTAGG  
AACAATTGCTTACATGTCACCGGAGAGGATAAACACTGATATCAACGATGG  
ACAATATGATGCATACGCCGGTGATATATGGAGTTTAGGCGTGAGTATATT  
GGAGTTTTATATGGGAAGGTTTCCATTTGCGGTTGGTAGACAAGGTGATTGG  
GCGAGTTTGATGTGTGCAATTTGTATGTCACAACCACAGAAGCTCCAACG  
ACTGCTTCTCCGGAGTTTAGGGATTTGTTTTCGAGGTGTTTGCAGAGAGACC  
CGTCGAGGAGATGGACTGCTTCGAGGTTGCTTTCACATCCTTTTCTTGTGAG  
AAATGGTTCTAATCATAATCAGAGTCCTCAAATATGCATCAGTTACTTCTCCT  
CCACCACCAAGATCACTTTCTTCT**TAG**

2. MsSIMKK sekvence proteinu (z NCBI, Ref. 4)

>CAC69137.1 MEK map kinase kinsae [*Medicago sativa* subsp. *x varia*]

MRPIQLPPTATGSATASGSPNNNNNSRPQRRRKDHLTLPLPQRDTNLA VPLPLP  
PSGGSGSGGGGNGSGSGGASQQLVIPFSELERLN RIGSGSGGT VYKVVHKING  
RAYALKVIYGHHEESVRRQIHREIQILRDVDDVNVVKCHEMYDHNAEIQV LLE  
YMDGGSLEGKHIPQENQLADVARQILRGLAYLHRRHIVHRDIKPSNLLINSRKQ

VKIADFGVGRILNQTMDPCNSSVGTIAYMSPERINTDINDGQYDAYAGDIWSLG  
VSILEFYMGFRPFAVGRQGDWASLMCAICMSQPPEAPTTASPEFRDFVSRCLQR  
DPSRRWTASRLLSHPFLVRNGSNHNQSPPNMHQLLPPPPRSLSS

3. AtMKK4 sekvence nukleotidů (z NCBI, Ref. 4)

>NM\_104044.3 Arabidopsis thaliana mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4), mRNA

**ATG**AGACCGATTCAATCGCCTCCAGGAGTTTCCGTTCCGGTGAAAAGCCGTC  
CCCGTCGCCGTCCTGATCTTACCTTACCGCTTCCTCAACGCGATGTTTCTCTC  
GCTGTACCTCTTCCCTCTCCACCTACTTCCGGTGGTTCCGGTGGCTCTAGTGG  
ATCTGCGCCGTCTTCTGGTGGTTCGGCGTCTTCAACGAACACTAACAGCTCC  
ATAGAAGCGAAGAAGTATTCGGATTTAGTGAGAGGTAACCGTATCGGAAGC  
GGAGCAGGTGGAACGGTATACAAAGTGATTCACCGTCCGAGTTCTCGTCTA  
TATGCACTTAAGGTGATATACGGTAACCACGAGGAGACTGTGAGACGTCAG  
ATCTGTAGAGAGATCGAGATTTTACGAGATGTGAATCATCAAACGTTGTG  
AAATGTCACGAGATGTTTGATCAGAACGGTGAGATCCAGGTTTTGCTTGAGT  
TTATGGATAAAGGTTCTTTAGAAGGTGCTCATGTGTGGAAAGAGCAACAAT  
TAGCTGATCTATCTCGTCAGATTCTTAGTGGTTTAGCTTATCTCCATAGCCGT  
CACATAGTTCATCGTGATATCAAACCATCGAATCTTTTGATAAACTCTGCTA  
AAAACGTTAAGATTGCTGATTTTGGAGTTAGTAGGATCTTGGCTCAGACTAT  
GGATCCGTGTAATTCATCTGTTGGAACCATGCTTATATGAGTCCTGAGAGG  
ATTAACACTGATTTGAATCAGGGAAAGTATGATGGTTATGCTGGAGATATTT  
GGAGCTTAGGTGTTAGCATTTTGGAGTTTTACTTGGGGAGGTTTCCTTTCCCT  
GTGAGTAGACAAGGTGATTGGGCTAGTCTTATGTGTGCCATTTGTATGTCTC  
AGCCTCCAGAAGCTCCAGCGACTGCGTCGCCGGAGTTTCGGCATTATCTC  
GTGTTGCTTGCAGAGAGAACCGGGAAAAGGAGGAGTGCTATGCAGCTATT  
GCAGCATCCTTTCATATTAAGAGCAAGTCCGAGCCAGAACAGGTCTCCTCA  
GAATCTACATCAACTCTTGCTCCTCCTCGTCCTCTGTCTCTCGTCTTCTTCTC  
CAACCACA**TAG**

4. AtMKK4 sekvence proteinu (z NCBI, Ref. 4)

>OAP16008.1 MKK4 [Arabidopsis thaliana]

MRPIQSPPGVSVPVKSRPRRRPDLTLPLPQRDVSLAVPLPLPPTSGGSGGSSGSAP  
SSGGSASSTNTNSSIEAKNYSIDLVRGNRIGSGAGGTVYKVIHRPSSRLYALKVIY

GNHEETVRRQICREIEILRDVNHPNVVKCHEMFDQNGEIQVLLEFMDKGSLEGA  
HVWKEQQLADLSRQILSGLAYLHSRHIVHRDIKPSNLLINSAKNVKIADFGVSRI  
LAQTMPCNSSVGTIAYMSPERINTDLNQGKYDGYAGDIWSLGVSILEFYLGFR  
PFPVSRQGDWASLMCAICMSQPPEAPATASPEFRHFISCCLOREPGKRRSAMQL  
LQHPPFILRASPSQNRSPQNLHQLLPPRPLSSSSSPTT

5. AtMKK5 sekvence nukleotidů (z NCBI, Ref. 4)

>NM\_001338511.1 Arabidopsis thaliana MAP kinase kinase 5 (MKK5), mRNA

**ATG**AAACCGATTCAATCTCCTTCTGGAGTAGCTTCACCTATGAAGAACCGTT  
TACGCAAACGTCCTGACCTAAGCTTACCACTCCCACACCGCGACGTCGCTCT  
CGCCGTACCTCTCCCTCTCCCACCTCCTTCTTCTCCTTTCATCCGCTCCGGCGT  
CTTCTCCGCGATCTCAACCAACATCTCCGCCGCTAAAAGCTTATCCGAGCT  
AGAACGAGTGAACCGAATCGGAAGCGGAGCCGGAGGAACGGTTTACAAAG  
TAATCCACACTCCGACGTCACGTCCTTTCGCTCTCAAAGTGATTTACGGAAA  
CCACGAAGATACCGTGAGACGTCAGATCTGTAGAGAGATCGAGATCTTAAG  
AAGTGTTGATCATCCAAACGTTGTGAAATGTCACGATATGTTTGATCATAAC  
GGTGAGATCCAGGTTTTGCTTGAGTTTATGGATCAAGGATCTCTTGAAGGAG  
CTCATATATGGCAAGAACAGGAATTAGCTGATCTCTCTCGTCAGATTCTTAG  
TGGATTAGCTTATCTTCATCGTCGTCATATCGTTCATCGTGATATCAAACCTT  
CGAATCTTCTTATAAACTCAGCTAAAAATGTGAAAATTGCTGATTTTGGTGT  
GAGTAGGATCTTGGCACAACAATGGATCCTTGTAATTCATCTGTTGGTACT  
ATTGCTTATATGAGTCCTGAGAGGATTAATACTGATTTGAATCATGGTCGTT  
ACGATGGTTATGCTGGAGATGTTTGGAGTTTAGGTGTTAGTATCTTGGAGTT  
TACTTGGGGAGGTTTCTTTTGCTGTGAGTAGACAAGGTGATTGGGCTAGT  
CTTATGTGTGCTATTTGTATGTCTCAGCCACCTGAAGCTCCGGCTACGGCGT  
CTCAGGAGTTTCGTCACCTTTGTTTCTTGTTGTTTACAGAGTGATCCTCCTAAG  
AGATGGTCAGCTCAACAGCTTTTGCAGCATCCTTTCATACTTAAAGCTACCG  
GTGGTCCTAATCTCCGTCAAATGTTGCCGCCGCTCGTCCTCTTCTTCTGCC  
TCT**TAG**

6. AtMKK5 sekvence proteinu (z NCBI, Ref. 4)

>NP\_001319606.1 MAP kinase kinase 5 [Arabidopsis thaliana]

MKPIQSPSGVASPMKNRLRKRPDLSLPLPHRDVALAVPLPLPPSSSSSAPASSSA  
ISTNISAAKSLSELERVNRIGSGAGGTVYKVIHTPTSRPFALKVIYGNHEDTVRR

QICREIEILRSVDHPNVVKCHDMFDHNGEIQVLLEFMDQGSLEGAHIWQEQLA  
DLRQILSGLAYLHRRHIVHRDIKPSNLLINSAKNVKIADFGVSRILAQTMDPCN  
SSVGTIAYMSPERINTDLNHGRYDGYAGDVWSLGVSILEFYLGFRPFPAVSRQGD  
WASLMCAICMSQPPEAPATASQEFRHFVSCCLQSDPPKRWSAQQLLQHPFILKA  
TGGPNLRQMLPPRPLPSAS

7. MsPRKK\_36 sekvence nukleotidů (z Alfalfa Tool box, Ref. 5)

>MSAD\_280536.t1

ID=MSAD\_280536.t1|Name=MSAD\_280536.t1|organism=Medicago

sativa|type=mRNA|length=5482bp

**ATG**AAGAAAGGAAATTTGGGTCTCGGTCTCAAACCTCTCTGTTTCCTCAAACCTG  
ATCAAGTTGCTTTTGC AAAGTTTCTGACTGAAAGTGGAACGTTTAAGGATGG  
AGATCTGCTTGTTAACAGAGACGGTGTTTCGAATTGTTTCTGAGACTGAAGTT  
GAAGCTCCACCCCAATCAAGGCAACAGACAACCAGTTAAGTTTGGCAGAC  
ATAGACATAGTGAAAGTTGTTGGAAAGGGAAACGGAGGGGTGGTTCAATTG  
GTGCAACACAAATGGACTAATCAGTTTTTTGCATTAAAGATAATTCAAATGA  
ATATTGAAGAGTCCGTGCGCAAGCAGATAGCTAAAGAGCTGAAAATTAATC  
AAGCAGCACAGTGTCTTATGTTGTTGTCTGCTACCAGTCATTCTATGACAA  
CGGTGTCATATCAATCATTTTAGAGTACATGGATGGAGGCTCCATGGCTGAT  
CTTCTGAAGAAAGTTAAAACAATACCAGAGCCTTATCTTTCTGCCATTTGTA  
AGCAGGTTCTGAAGGGTTTAATATATCTTCACCATGAAAGACATATTATCCA  
CAGAGACTTGAAGCCTTCTAATTTGTTGATCAATCACACAGGCGAGGTTAA  
GATTACTGATTTTGGTGTTAGTGCAATTATGGAAAGTACATCTGGTCAAGCA  
AATACTTTCATTGGCACATACTATATGTCTCCAGAGAGAATCAATGGA  
AGCCAACGTGGCTACAAC TACAAAAGTGATATATGGAGTTTGGGACTGATA  
TTGCTGGAGTGTGCTATGGGGCGGTTTCCTTACACACCACCAGATCAAAGTG  
AAAGATGGGAAAGTATATTTGAGCTTATTGAAACTATTGTGGATAAACCTC  
CTCCTAGTGCTCCATCTGAACAATTTTCCTCAGAATTTTGCTCATTTATCTCT  
GCATGTCTACAGAAAGACCCAGGAAGCAGACTGTCGGCTCAGGAACTTATG  
GAACTTCCTTTCATCAGCATGTATGATGACTTGCATGTGGATCTCTCAGCTT  
ATTTCTCCGATGCAGGATCTCCACTCGCAACCTTA**TAA**

8. MsPRKK\_36 sekvence proteinu (z Alfalfa Tool box, Ref. 5)

>MSAD\_280536.t1-protein ID=MSAD\_280536.t1 protein| Name=MSAD\_280536.t1|  
organism=Medicagosativa|type=polypeptide|length=357bp

MKKGNLGLGLKLSVPQTDQVAFAKFLTESGTFKDGDLLVNRDGVRIVSETEVE  
APPIKATDNQLSLADIDIVKVVGKNGGVVQLVQHKWTNQFFALKIIMNIEE  
SVRKQIAKELKINQAAQCPYVVVCYQSFYDNGVISIILEYMDGGSMADLLKKV  
KTIPEPYLSAICKQVLKGLIYLHHERHIIHRDLKPSNLLINHTGEVKITDFGVSAI  
MESTSGQANTFIGTYNYMSPERINGSQRGYNYKSDIWSLGLILLECAMGRFPYT  
PPDQSERWESIFELIETIVDKPPPSAPSEQFSSEFCSFISACLQKDPGSRLSAQELM  
ELPFISMYDDLHVDLSAYFSDAGSPLATL.

9. MsPRKK\_48 sekvence nukleotidů (z Alfalfa Tool box, Ref. 5)

>MSAD\_280548.t1 organism=Medicago sativa

**ATG**AAGAAAGGAAATTTGGGTCTCGGTCTCAAACCTCTCTGTTCCCTCAAACCTG  
ATCAAGTTGCTTTTGC AAAGTTTCTGACTGAAAGTGGAACGTTTAAGGATGG  
AGATCTGCTTGTTAACAGAGACGGTGTTTCGAATTGTTTCTGAGACTGAAGTT  
GAAGCTATAATTCAAATGAATATTGAAGAGTCCGTGCGCAAGCAGATAGCT  
AAAGAGCTGAAAATTAATCAAGCAGCACAGTGTCCTTATGTTGTTGTCTGCT  
ACCAGTCATTCTATGACAACGGTGTCATATCAATCATTTTAGAGTACATGGA  
TGGAGGCTCCATGGCTGATCTTCTGAAGAAAGTTAAAACAATACCAGAGCC  
TTATCTTTCTGCCATTTGTAAGCAGGTTCTGAAGGGTTTAATATATCTTCACC  
ATGAAAGACATATTATCCACAGAGACTTGAAGCCTTCTAATTTGTTGATCAA  
TCACACAGGCGAGGTTAAGATTACTGATTTTGGTGTTAGTGCAATTATGGAA  
AGCACATCTGGTCAAGCAAATACTTTCATTGGCACATACTAATATATGTCTC  
CAGAGAGAATCAATGGAAGCCAACGTGGCTACAACCTACAAAAGTGATATAT  
GGAGTTTGGGACTGATATTGCTGGAGTGTGCTATGGGGCGGTTTCCTTACAC  
ACCACCAGATCAAAGTGAAAGATGGGAAAGTATATTTGAGCTTATTGAAAC  
TATTGTGGATAAACCTCCTCCTAGTGCTCCATCTGAACAATTTTCCTCAGAA  
TTTTGCTCATTTATCTCTGCATGTCTACAGAAAGACCCAGGAAGCAGACTGT  
CGGCTCAGGAACTTATGGAACCTCCTTTCATCAGCATGTATGATGACTTGCA  
TGTGGATCTCTCAGCTTATTTCTCCGATGCAGGATCTCCACTCGCAACCTTA**T**  
**AA**

10. MsPRKK\_48 sekvence proteinu (z Alfalfa Tool box, Ref. 5)

>MSAD\_280548.t1-protein

ID=MSAD\_280548.t1-

protein|Name=MSAD\_280548.t1|organism=Medicago

sativa|type=polypeptide|length=312bp

MKKGNLGLGLKLSVPQTDQVAFKFLTESGTFKDGDLLVNRDGVVRIVSETEVE  
AIIQMNIIEESVRKQIAKELKINQAAQCPYVVVCYQSFYDNGVISIILEYMDGGSM  
ADLLKKVKTIPEPYLSAICKQVLKGLIYLHHERHIIHRDLKPSNLLINHTGEVKIT  
DFGVSAIMESTSGQANTFIGTYNYMSPERINGSQRGYNYSKSDIWSLGLILLECA  
MGRFPYTPPDQSERWESIFELIETIVDKPPPSAPSEQFSSEFCSFISACLQKDPGSR  
LSAQELMELPFISMYDDLHVDLSAYFSDAGSPLATL.

11. AtMKK1 sekvence nukleotidů (z NCBI, Ref. 4)

>NM\_202890.2 Arabidopsis thaliana MAP kinase/ ERK kinase 1 (MEK1), mRNA

**ATG**AACAGAGGAAGCTTATGCCCTAATCCCATCTGTCTCCCTCCTCTTGAGC  
AATCCATCTCCAAATTCTTAACACAGAGTGGAACGTTTAAAGATGGAGATC  
TTCGAGTGAACAAAGATGGAATCCAGACCGTGTCTCTGTCCGAACCAGGAG  
CTCCACCTCCTATTGAGCCATTGGACAACCAATTGAGTTTGGCAGATTTAGA  
AGTGATCAAAGTCATTGGCAAAGGAAGTAGTGGTAATGTCCAGTTGGTCAA  
ACACAAACTCACTCAACAGTTTTTCGCTCTTAAGGTCATTCAATTGAACACA  
GAAGAATCAACATGTCGGGCGATTTCTCAGGAGCTGAGAATAAACTTGAGC  
TCGCAATGTCCATATCTTGTCTCATGTTATCAATCTTTCTACCACAACGGTCT  
TGTTTCAATCATATTGGAATTCATGGATGGTGGATCCCTTGCAGACTTGTTA  
AAGAAAGTCGGAAAAGTTCCTGAAAACATGCTATCTGCCATCTGCAAGCGA  
GTTCTTCGAGGTCTTTGTTATATTCATCATGAGAGGCGAATCATTTCATCGGG  
ACTTAAAGCCTTCAAACCTTGCTAATCAATCATAGAGGTGAAGTCAAGATCA  
CAGACTTTGGTGTGTCAGCAAGATCTTGACAAGCACAAAGTAGTCTTGCTAATTC  
TTTCGTGGGCACATACCCTTATATGTCTCCAGAGAGAATCAGCGGGAGTTTG  
TACAGTAACAAGAGCGATATTTGGAGCTTGGGACTGGTTTTGCTCGAATGTG  
CAACGGGTAAATTCCCGTATACTCCTCCAGAACACAAGAAAGGATGGAGTA  
GCGTGTACGAGCTTGTGGACGCCATTGTTGAAAACCCGCCTCCTTGTGCACC  
TTCCAATCTCTTTTCTCCAGAGTTTTGCTCCTTCATCTCGCAATGTGTACAAA  
AAGATCCAAGGGACAGAAAATCAGCAAAGGAGCTTCTGGAACACAAGTTC  
GTAAAGATGTTTGAAGATTTCGGATACAAATCTCTCGGCTTACTTCACCGACG  
CAGGATCTTTGATTCCCCCACTTGCTAACTA**GAA**

12. AtMKK1 sekvence proteinu (z NCBI, Ref. 4)

>NP\_974619.1 MAP kinase/ ERK kinase 1 [Arabidopsis thaliana]

MNRGSLCPNPICLPPLEQSISKFLTQSGTFKDGDLRVNKDGIQTVSLSEPGAPPI  
EPLDNQLSLADLEVIKVIKVGSSGNVQLVKHKL TQQFFALKVIQLNTEESTCRAI  
SQELRINLSSQCPYLVSCYQSFYHNGLVSIILEFMDGGSLADLLKKGKVPENM  
LSAICKRVLRLGLCYIHHERRIIHRDLKPSNLLINHRGEVKITDFGVSKILTSTSSLA  
NSFVGTYPYMSPERISGSLYSNKSDIWSLGLVLLECATGKFPYTPPEHKKGWSS  
VYELVDAIVENPPPCAPSNLFSPEFCFISQCVQKDPDRDRKSAKELLEHKFVKMF  
EDSDTNLSAYFTDAGSLIPPLAN

13. AtMKK2 sekvence nukleotidů (z NCBI, Ref. 4))

>NM\_001036674.2 Arabidopsis thaliana MAP kinase kinase 2 (MKK2), mRNA

**ATG**AAGAAAGGTGGATTCAGCAATAATCTCAAGCTCGCAATTCCTGTTGCT  
GGCGAGCAATCCATCACCAAATTCCTGAGGAAAGGTTTTGGTTCTCTCTGTA  
GGACTCAAAGCGGTACGTTTAAGGATGGAGATCTACGTGTTACAAGGATG  
GAGTTCGAATCATTCTCAATTGGAGCCTGAAGTCCTGTCTCCAATTAAGCC  
AGCTGATGATCAGCTGAGCTTGTCGGATTTGGATATGGTTAAAGTCATTGGC  
AAAGGAAGTAGTGGTGTGTTTCAGCTGGTTCAACACAAATGGACTGGCCAA  
TTTTTCGCCTTGAAGGTCATTCAACTAAATATTGATGAAGCAATTCGCAAGG  
CAATTGCACAAGAGCTCAAATAAATCAATCGTCACAGTGTCCAAATCTTG  
TTACCTCGTACCAGTCATTTTATGACAATGGCGCAATCTCACTAATCTTGGA  
GTACATGGACGGAGGATCTCTAGCAGACTTTCTCAAGTCAGTTAAAGCCAT  
CCCTGACTCCTATCTTTCTGCCATCTTTAGACAAGTGCTTCAAGGATTAATCT  
ATCTTCATCACGATAGGCATATCATCCATCGTGACTTGAAACCATCCAATCT  
GTTGATCAACCACAGAGGAGAAGTCAAATAACTGACTTTGGTGTGAGTAC  
CGTTATGACAAACACCGCAGGTTTAGCAAACACATTTGTGGGGACTTACAA  
TTATATGTCTCCAGAGAGAATCGTTGGAAACAAGTACGGAAATAAAAGTGA  
TATATGGAGCTTGGGTTTAGTAGTACTCGAATGTGCAACAGGAAAGTTCCCT  
TATGCACCTCCGAATCAAGAGGAAACATGGACCAGTGTTTTTCGAGTTGATG  
GAAGCCATTGTTGACCAACCGCCACCCGCTCTTCCTTCAGGAAATTTCTCCC  
CTGAGTTATCTTCATTCATCTCCACATGTTTGCAGAAGGATCCAAACAGTCG  
AAGCTCTGCAAAGGAACTGATGGAACATCCTTTCTTGAACAAATACGACTA  
CTCGGGGATCAATCTCGCGTCCTACTTCACAGATGCAGGATCGCCACTTGCA  
ACACTTGGGAACCTGTCTGGTACGTTCTCCGTG**TAA**

14. AtMKK2 sekvence proteinů (z NCBI, Ref. 4)

>OAP00208.1 MKK2 [Arabidopsis thaliana]

MKKGGFSNNLKLAI PVAGEQSITKFLTQSGTFKDGDLRVNKDGVRIISQLEPEVL  
SPIKPADDQLSLSDLDMVKVIGKGSSGVVQLVQHKWTGQFFALKVIQLNIDEAI  
RKAIAQELKINQSSQCPNLVTSYQSFYDNGAISLILEYMDGGSLADFLKSVKAIP  
DSYLSAIFRQVLQGLIYLHHRHIIHRDLKPSNLLINHRGEVKITDFGVSTVMTN  
TAGLANTFVGTYNMSPERIVGNKYGNKSDIWSLGLVVLECATGKFPYAPPNQ  
EETWTSVFELMEAIVDQPPALPSGNFSPELSSFISTCLQKEPNSRSSAKELMEHP  
FLNKYDYSGINLASYFTDAGSPLATLGNLSGTFSV