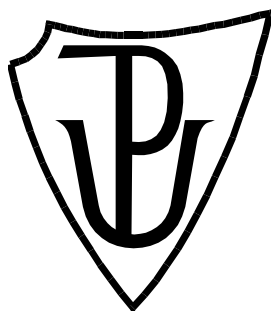


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Charakterizace mutanta mitogen-aktivované proteinkinasy 3 z *Arabidopsis thaliana* připraveného technologií CRISPR/Cas9

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: **Lenka Janálová**
Studijní program: B1406 Biochemie
Studijní obor: Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: **Mgr. Veronika Zapletalová, Ph.D.**
Rok: 2018

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

V Olomouci dne *podpis bakaláře*

Poděkování

Děkuji Mgr. Veronice Zapletalové, Ph.D., za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnovala. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Křenkovi, Ph.D., za poskytnutí cenných rad a celému oddělení buněčné biologie za umožnění vypracování experimentální části. Mé poděkovat patří také rodině, která mě podporuje po celou dobu mého studia.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Lenka Janálová
Název práce	Charakterizace mutanta mitogen-aktivované proteinkinasy 3 z <i>Arabidopsis thaliana</i> připraveného technologií CRISPR/Cas9
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Oddělení buněčné biologie, Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, PřF UP
Vedoucí práce	Mgr. Veronika Zapletalová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2018

Abstrakt

Kaskády mitogen-aktivovaných proteinkinás jsou zapojeny do odpovědi rostlin na různé podněty, především na biotický a abiotický stres. Pomocí přenosu signálu dochází k regulaci růstu a vývoje rostlin. Tímto způsobem je zajištěna adaptace na nepříznivé podmínky v okolním prostředí. Součástí těchto kaskád je i mitogen-aktivovaná proteinkinasa 3, která je aktivována různými vnějšími faktory, například kyselinou abscisovou, reaktivními kyslíkovými radikály, působením těžkých kovů, při osmotickém stresu nebo elicitory patogenů. V této práci byli použiti mutanti *Arabidopsis thaliana mpk3-5* s žádoucí mutací v genu *MPK3* připravené metodou CRISPR/Cas9. Tento nástroj pro cílenou editaci genomu, založený na CRISPR a s ním asociované nuklease (Cas9) pocházející z bakterie *Streptococcus pyogenes*, byl použit pro vytvoření dvojitých zlomů v DNA s následnou aktivací opravných mechanismů, při kterých může dojít ke vzniku mutace v požadované sekvenci DNA. Hlavním cílem této práce byla selekce homozygotních mutantů *mpk3-5* ve vybraných liniích 1/14 a 1/17 a následným sekvencováním určit typ mutace v sekvenci genu *MPK3*. Vzorokly identifikovaných mutantních linií byly podrobeny semikvantitativní RT-PCR pro zjištění, zdá dochází k tvorbě transkriptu *MPK3*. Dále byla ověřena nepřítomnost proteinu *MPK3* v homozygotních liniích mutanta *mpk3-5*. Na závěr byly homozygotní linie v T3 generaci použity pro zkoumání vlivu solného stresu na růst mutantních rostlin *A. thaliana*.

Klíčová slova	Mitogen aktivované proteinkinasy (MAPKs), <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>MPK3</i> , abiotický stres, solný stres
Počet stran	57
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Lenka Janálová
Title	Characterization of <i>Arabidopsis thaliana</i> mitogen-activated protein kinase 3 mutant prepared by Crispr/CAS9 technology
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Cell Biology, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Faculty of Science, UP
Supervisor	Mgr. Veronika Zapletalová, Ph.D.
The year of presentation	2018

Abstract

Mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascades are included in plant response to various extracellular stimuli, especially to biotic and abiotic stress. MAPK signal transmission regulates the growth and development of plants. By this way adaptation to unfavorable environmental conditions is ensured. These cascades also include mitogen-activated protein kinase 3 (MPK3), which is activated by many external factors including abscisic acid, reactive oxygen species, heavy metal pollution, osmotic stress and pathogen elicitors. *Arabidopsis thaliana* mutants called *mpk3-5* with required mutation in *MPK3* gene prepared by CRISPR/Cas9 method were used in this work. This tool used for target editing of the genome based on CRISPR and CRISPR-associated nuclease (Cas9) originating from bacterium *Streptococcus pyogenes* is used to create double strand breaks in DNA with subsequent activation of repair mechanisms that may result in a mutation in the desired DNA sequence. Main aim of this work was election of *mpk3-5* homozygous mutants in 1/14 and 1/17 lines and determination of mutation type in *MPK3* gene by subsequent sequencing. Identified mutant lines were subjected to semiquantitative RT-PCR to know if *MPK3* transcript is present. Then absence of MPK3 protein was confirmed in *mpk3-5* homozygous mutant lines. Finally, homozygous lines in the T3 generation were used to investigate the effect of salt stress on the growth of mutant *A. thaliana* plants.

Keywords	Mitogen-activated protein kinase, <i>Arabidopsis thaliana</i> , MPK3, abiotic stress, salt stress
Number of pages	57
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1 ÚVOD	1
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	2
2.1 Signální dráha mitogen-aktivovaných proteinkinás	2
2.1.1 Aktivace MAP kinás fosforylační kaskádou	2
2.1.2 Klasifikace MAPKs	4
2.1.3 Scaffold proteiny.....	5
2.1.4 Inaktivace mitogen-aktivovaných proteinkinás	6
2.1.5 Mitogen-aktivované proteinkinasy a reakce na stres	7
2.1.6 Solný a osmotický stres	9
2.2 Nástroje pro úpravu genomu eukaryotických organismů.....	12
2.2.1 Indukce DSBs umělými nukleasami.....	12
2.3 Modelový organismus <i>Arabidopsis thaliana</i>	21
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	23
3.1 Materiály	23
3.1.1 Použité přístroje	23
3.1.2 Software pro zpracování výsledků.....	23
3.1.3 Enzymy a chemikálie.....	23
3.1.4 Složení médií a roztoků	25
3.1.5 Rostlinný materiál.....	27
3.2 Metody.....	28
3.2.1 Povrchová sterilizace semen <i>Arabidopsis thaliana</i>	28
3.2.2 Setí semen <i>Arabidopsis thaliana</i>	28
3.2.3. Selektce mutantních rostlin <i>A. thaliana mpk3-5</i> v T2 generaci.....	28
3.2.4 Extrakce genomové DNA (gDNA).....	28
3.2.5 Polymerasová řetězová reakce (PCR).....	29
3.2.6. Agarosová elektroforéza	30
3.2.7 Purifikace DNA	30
3.2.8 Příprava vzorků na sekvencování	30
3.2.9 Polymerasová řetězová reakce spojená s reverzní transkripcí (RT-PCR)	31
3.2.10 Izolace proteinů z rostlinného materiálu.....	33
3.2.11 Denaturující polyakrylamidová elektroforéza (SDS-PAGE)	33
3.2.12 Western blot.....	33
3.2.13 Aplikace solného stresu na rostliny <i>Arabidopsis</i>	34
4 VÝSLEDKY A DISKUZE	35
4.1 Selektce mutantních rostlin <i>A. thaliana mpk3-5</i>	35
4.2 Genotypizace mutantů <i>mpk3-5</i> z vybraných linií 1/14 a 1/17	36

4.3 Testování přítomnosti transkriptu <i>MPK3</i> u mutantů <i>mpk3-5</i>	43
4.4 Testování přítomnosti proteinu <i>MPK3</i> u mutantů <i>mpk3-5</i>	44
4.5 Snížená rezistence mutantu <i>mpk3-5</i> na solný stres	46
5 ZÁVĚR.....	49
6 LITERATURA	50
7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	56

CÍLE PRÁCE

TEORETICKÁ ČÁST

Zpracování literární rešerše na téma mitogen-aktivované proteinkinasy a editace genomu pomocí programovatelných endonukleas, se zaměřením zejména na technologii Crispr/CAS9. Dále rešerše týkající se *Arabidopsis thaliana* jako modelového organismu.

PRAKTICKÁ ČÁST

1. Selektce transformovaných semen *A. thaliana* generace T1 připravených stabilní transformací.
2. Amplifikace mutované části genu *mitogen-aktivované proteinkinasy 3 (MPK3)* metodou PCR.
3. Ověření přítomnosti mutace v *MPK3* genu prostřednictvím sekvencování DNA.
4. Potvrzení absence proteinu MPK3 v mutantních rostlinách *A. thaliana* připravených technologií Crispr/CAS9.
5. Zkoumání vlivu solného stresu na růst homozygotních mutantů *mpk3-5*.

1 ÚVOD

Signální dráha mitogen-aktivovaných proteinkinás (MAPKs) je vysoce konzervovaný komplex, který zprostředkovává přenos a amplifikaci extracelulárního signálu do buňky, kde dojde k příslušné odpovědi. MAPK signální dráha je zapojena při adaptivním procesu všech eukaryotních organismů (Meng a Zhang, 2013). Součástí MAPK kaskád je mitogen-aktivovaná protein kinasa 3 (MPK3), která je zapojena v procesech, jako je buněčná proliferace, diferenciace, apoptóza a reakce na stres z prostředí nebo elicitory patogenů (Plotnikov *et al.*, 2011). Pro tuto práci byly použity rostliny *A. thaliana* s názvem *mpk3-5*, u nichž byl editován právě gen pro *MPK3* metodou CRISPR/Cas9. Segmenty nahromaděných pravidelně rozložených krátkých palindromických sekvencí (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat, CRISPR) a jejich asociované proteiny (CRISPR-associated proteins, CAS) představují adaptivní imunitní systém bakterií a archaea. Tento systém umožňuje organismům reagovat na invazní genetický materiál a odstranit jej (Ishino *et al.*, 1987). Využitím tohoto systému je možné cíleně editovat genom různých organismů vytvořením dvojitého zlomu v jejich DNA. Následným působením buněčných opravných mechanismů v místě dvojitého zlomu tak může dojít ke vzniku mutace. Vysoká účinnost a nenáročnost CRISPR/Cas9 systému vedla k jeho širokému využití např. v zemědělství. Tento nástroj byl použit nejen k úpravě genomu modelových rostlin, jako je *Arabidopsis thaliana* nebo *Nicotiana benthamiana* (Song *et al.*, 2016), ale také u zemědělských plodin (Lawrenson *et al.*, 2015; Woo *et al.*, 2015; Karkute *et al.*, 2017). Dalšími užívanými přístupy pro modifikaci genomu jsou endonukleasy zinkových prstů a typu TALEN. Tyto přístupy jsou však drahé a časově náročné, což omezuje jejich široké využití pro mnohé studie.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Signální dráha mitogen-aktivovaných proteinkinás

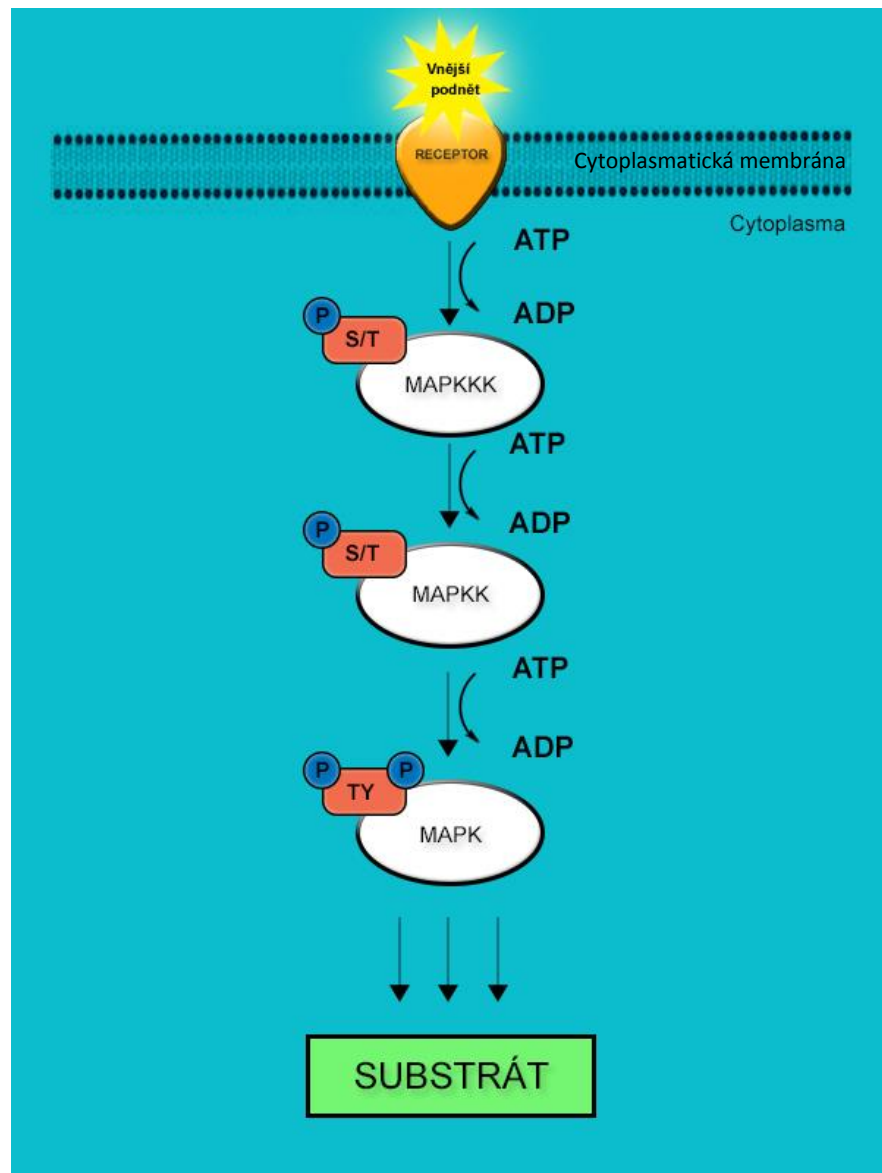
Rostliny jsou organismy žijící přisedlým životem. Nemohou tak změnit prostředí, aby se dostaly z nepříznivých podmínek. Ke svému přežití proto potřebují sít rozsáhlých a hustě propojených systémů pro rychlé vnímání signálů, reakci a adaptaci na okolní podmínky. Signální dráha mitogen-aktivovaných proteinkinás (MAPKs) je multienzymový komplex, který nalezneme u eukaryotních organismů. Hraje důležitou roli při adaptivním procesu rostlin (Colcombet a Hirt, 2008; Suarez-Rodriguez *et al.*, 2010) od reakcí na stres až po buněčnou diferenciaci a vývoj orgánů. MAPK dráhy se navíc podílejí na vnímání enviromentálních a fyziologických změn. Některé MAPKs se účastní hned několika různých signalizačních drah a mohou mít integrační funkci pro reakci rostlin na jejich prostředí (Chardin *et al.*, 2017).

2.1.1 Aktivace MAP kinas fosforylační kaskádou

Přenos signálu probíhá prostřednictvím MAPK modulů, díky kterým je zajištěna adaptace rostliny na dané podmínky. MAPK modul běžně obsahuje tři typy kinas kódovaných odlišnými genovými rodinami: mitogen-aktivované proteinkinasy (MAPK nebo MPK), mitogen-aktivované proteinkinasy kinasy (MAPKK nebo MKK) a mitogen-aktivované proteinkinasy kinasy kinasy (MAPKKK nebo MEKK) (Obr. 1). Přenos signálu a jeho amplifikace je zprostředkován posttranslační modifikací, konkrétně reverzibilní fosforylací, díky které dochází k aktivaci jednotlivých komponent MAPK modulu. K přenosu signálu MAPK kaskádou dochází po přijetí podnětu pomocí receptoru nebo kinasy podobné receptoru (Receptor-Like-Kinase, RLK), kterou může být například mitogen-aktivovaná proteinkinasa kinasa kinasa kinasa (MAPKKKK). Z receptoru je signál přenesen fosforylací na MAPKKK, která dále reverzibilně fosforyluje MAPKK, a ta poté fosforyluje MAPK (Xu a Zhang, 2015).

MAPKKKs jsou serin/threoninové kinasy fosforylující dvě aminokyseliny (serin nebo threonin) v S/T - X₃₋₅- S/T motivu aktivační smyčky MAPKK. MAPKKs řadíme mezi duálně specifické kinasy, které aktivují MAPKs přes dvojitou fosforylací threoninu a tyrosinu T-X-Y motivu aktivační smyčky. MAPKs náleží do skupiny

serin/threoninových kinas schopných fosforylovat široký rozsah substrátů, včetně dalších kinas nebo transkripčních faktorů (Colcombet a Hirt, 2008) (Obr. 1).



Obr. 1 Schématické znázornění MAPK kaskády. Z vnějšího prostředí dojde k zachycení signálu prostřednictvím receptoru na plazmatické membráně. Následně je tento signál přenesen na MAPKKK fosforylací serinového nebo threoninového residua a pokračuje aktivací MAPKK opět pomocí fosforylace serinového nebo threoninového residua. Poslední komponentou dráhy je MAPK, která je aktivována dvojitou fosforylací threoninu a tyrosinu. Signál je poté přenesen na koncové substráty.

2.1.2 Klasifikace MAPKs

2.1.2.1 Mitogen-aktivované proteinkinasy (MAPKs nebo MPKs)

V kompletní sekvenci genomu *Arabidopsis thaliana* bylo identifikováno 20 genů kódujících MPKs. Tyto MPKs můžeme rozdělit do čtyř skupin (A-D). Porovnáním sekvencí zachovaného motivu aminokyselin TxY lze MPKs rozdělit na dvě podskupiny podle obsahu kyseliny glutamové (TEY) nebo asparagové (TDY). TEY podskupina může být dále klasifikována do tří skupin A, B a C, zatímco TDY podskupina tvoří více odlišnou skupinu D (Ichimura *et al.*, 2002).

MPKs z podskupiny A se nejčastěji účastní environmentální a hormonální odpovědi. Řadíme zde velmi dobře charakterizované MPK3 a MPK6. Například exprese genu *MPK3* je indukována stresem z prostředí (Mizoguchi *et al.*, 1996) a protein MPK3 je aktivován oxidativním stresem (Kovtun *et al.*, 2000; Shinozaki a Yamaguchi-Shinozaki, 2000; Bowler a Fluhr, 2000).

2.1.2.2 Mitogen-aktivované proteinkinasy kinasy (MAPKKs nebo MKKs)

V genomu *Arabidopsis* se vyskytuje jen 10 genů kódujících MAPKKs. To znamená, že jediná MKK aktivuje hned několik MPKs a komunikace mezi jednotlivými drahami, které přenášejí signál, může být koncentrována na této úrovni rostlinných MAPK kaskád. Porovnáním sekvencí lze rostlinné MAPKKs rozdělit do čtyř skupin (A-D) (Ichimuta *et al.*, 2002).

Do skupiny A náleží MKK1 a MKK2, které jsou regulujícím faktorem MPK4 (Huang *et al.*, 2000). MKK1 je aktivována řadou stresů, např. H₂O₂ a bakteriálním elicitorem flagelinem. MKK2 je aktivována např. chladem a solným stresem (Teige *et al.*, 2004). Zajímavostí je, že geny pro MAPKKs řazené do skupiny C a D neobsahují introny (Ichimura *et al.*, 2002).

2.1.2.3 Mitogen-aktivované proteinkinasy kinasy kinasy

V porovnání s MPKs a MPKKs má rodina MAPKKKs mnohem více členů s větší rozmanitostí v primární struktuře a složení domény. MAPKKKs lze rozdělit do tří základních skupin. V první skupině MEKK-like MAPKKKs bylo identifikováno 10 genů, pro druhou skupinu RAF-like MAPKKKs bylo objeveno 48 genů a do třetí skupiny jsou řazeny ZIK-like MAPKKKs (Colcombet a Hirt, 2008; Ichimura *et al.*,

2002). Skupina MEKK-like může být dále rozdělena do čtyř podskupin. První podskupina zahrnuje proteinkinasy AtMEKK1-4. Exprese *AtMEKK1* je zvýšena v podmínkách sucha, vysokého zasolení a při dotyku (Mizoguchi *et al.*, 1996). *AtMEKK1* je součástí signální dráhy MEKK1-MKK1/MKK2-MPK4, která je aktivována při biotickém stresu (Suarez-Rodriguez *et al.*, 2007).

2.1.3 Scaffold proteiny

Scaffold proteiny mají zásadní roli při regulaci mnoha signálních kaskád. Vazbou na dvě a více komponent signální dráhy mohou pomoci při přenosu signálu a při lokalizaci signálních molekul ve specifických částech buňky, jako je plasmatická membrána, jádro, Golgiho aparát, endosomy, případně mitochondrie. Dále mohou přispět ke zvýšení účinnosti signální dráhy (Shaw a Filbert, 2009).

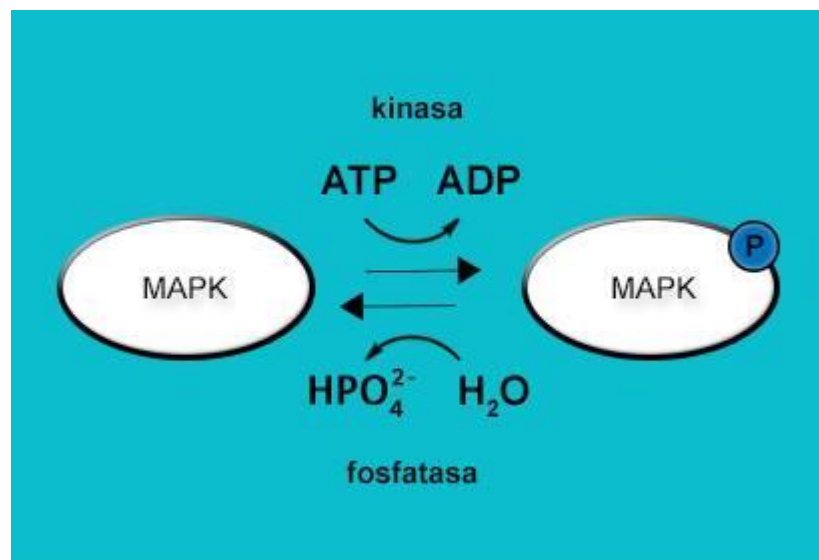
Scaffold proteiny mohou plnit nejméně čtyři funkce. Mohou vytvářet oblasti, na kterých se shlukují signální molekuly, lokalizovat signální molekuly na specifických místech buňky, koordinovat pozitivní a negativní signální odpověď kvůli změně signální dráhy a chránit aktivované signální molekuly před inaktivací (Nakanishi *et al.*, 1997).

Nejběžnější funkcí scaffold proteinů je shromažďování signálních komponent kaskády. Koncentrací signálních komponent lze zvýšit účinnost signální kaskády, a také zvýšit specifitu signálu zabráněním falešné interakci mezi signálními proteiny. Je například známo, že scaffold protein může zvýšit specifitu fosforylace vazbou na proteinkinasy a její substrát (Levchenko *et al.*, 2000; Ferrell, 2000).

Jako první scaffold protein, který váže kinasové komponenty MAPK kaskády, byl identifikován protein *S. cerevisiae* Ste5p. Mutanti, u kterých se tento protein netvořil, byli sterilní, jelikož nedocházelo k přenosu signálu přes feromonem indukovanou dráhu, která je zásadní pro množení kvasinek (Pearson *et al.*, 2001). Je také známo, že funkci scaffold proteinů mohou plnit i některé MAPKKs, tak jako již zmiňovaná MEKK1, která se váže na MKK1, MKK2 a MPK4 a usnadňuje tak přenos signálu na cílové molekuly (Ichimuta *et al.*, 1998).

2.1.4 Inaktivace mitogen-aktivovaných proteinkinás

Rozsah a doba trvání aktivace MAPK kaskády je rozhodujícím faktorem při biologickém účinku. Hlavní roli při negativní kontrole MAPK signální dráhy hrají MAPK fosfatasy (MKPs) (Obr. 2). Pro aktivitu MAPK je nezbytná modifikace reziduí threoninu a tyrosinu v aktivačním motivu, defosforylace jednoho z těchto zbytků enzymy deaktivuje (Obr. 2). Rozlišujeme tři druhy fosfatasy, které inaktivují MAPK. Protein-tyrosin fosfatasy defosforylují jen fosfotyrosinové zbytky, serin/threonin specifické proteinfosfatasy defosforylují fosfothreonin a nakonec duálně specifické fosfatasy, které mohou odstranit fosfáty z obou aminokyselinových zbytků (Keyse, 2000; Saxena a Mustelin, 2000).



Obr. 2 Reverzibilní fosforylace MAPK. Fosforylaci katalyzují kinasy, které přenášejí fosfátovou skupinu za hydrolýzy ATP. Fosfatasy naopak katalyzují hydrolýzu esterově vázaného fosfátu a inaktivují tak MAPK.

2.1.5 Mitogen-aktivované proteinkinasy a reakce na stres

Rostliny žijí v neustále se měnícím prostředí, které může být nepříznivé pro jejich růst a vývoj. Tyto nepříznivé podmínky jsou způsobeny jednak biotickým stresem, jako je infekce rostliny patogenem nebo napadení býložravci, a také abiotickým stresem, který může být způsoben suchem, vysokou nebo nízkou teplotou, nedostatkem živin, nadbytkem solí nebo přítomností toxických kovů v půdě (Zhu, 2016).

Každý stresový podnět může být vnímán jiným způsobem a spustit tak specifickou odpověď. Vystavení rostlin biotickému nebo abiotickému stresu aktivuje specifické iontové kanály a kinasové kaskády (Fraire-Velázquez *et al.*, 2011), dále vede k akumulaci reaktivních kyslíkových radikálů (Laloi *et al.*, 2004) a fytohormonů (Spoel a Dong, 2008), jako je kyselina abscisová, kyselina salicylová, kyselina jasmonová a ethylen. Následné reprogramování genetických mechanismů vede k přiměřené obranné reakci a ke zvýšení odolnosti rostliny (Fujita *et al.*, 2006).

Stres vyvolaný nízkou teplotou nebo vysokou koncentrací soli spouští signální modul MEKK1–MKK2–MPK4, zatímco při suchu nebo poranění je aktivován modul MKK1–MPK4. Při odpovědi na oxidativní stres MKK5 aktivuje MPK6 a MPK3 (Miles *et al.*, 2009; Xing *et al.*, 2013). Dalším signálním proteinem, jehož aktivita je spuštěna oxidativním stresem, je MAPK fosfatasa 2 (MKP2). MKP2 defosforyluje MPK3 a MPK6, a tím podporuje toleranci vůči oxidativnímu stresu (Lee a Ellis, 2007).

MPKs jsou součástí kaskády, která hraje zásadní roli v obranné signalizaci proti patogenním látkám. Tato signální dráha je spuštěna vazbou bakteriálního elicitoru flagelinu na receptor FLS2, který následně aktivuje MKK4 a MKK5. Tyto MPKs fosforylují a aktivují MPK3 a MPK6, což vede k expresi genů zodpovědných za obranu rostliny (Asai *et al.*, 2002). Transkripce *MPK3* genu a kinasová aktivita je aktivována také houbovým elicitorem chitinem (Wang *et al.*, 2001; Schenk *et al.*, 2003).

2.1.5.1 Zapojení mitogen-aktivované proteinkinasy 3 při abiotickém stresu

Mitogen-aktivovaná proteinkinasa 3 (MPK3) je aktivována různými faktory, například kyselinou abscisovou (ABA), reaktivními kyslíkovými radikály, elicitory patogenů, dále při mechanickém poškození, solném stresu nebo nízké teplotě. Tato proteinkinasa má tedy významnou signální funkci v odpovědi na různé typy stresů v rostlinách obecně. MPK3 je exprimována ve svěracích buňkách průduchů a podílí se na signalizaci ABA a H₂O₂, čímž je regulováno otevírání a zavírání průduchů (Gudesblat *et al.*, 2007).

H₂O₂ aktivuje specifickou MAPKKK zvanou ANP1 (*Arabidopsis* NPK1-like protein kinase), která spouští fosforylační kaskádu zahrnující MPK3 a MPK6. Tato MAPK kaskáda má dvojí funkci při regulaci genové exprese. Jednak aktivuje expresi genů, které chrání rostlinu před stresem z prostředí, a dále blokuje aktivitu auxinu, důležitého rostlinného hormonu (Kovtun *et al.*, 2000). Auxin je nezbytný pro konrolovaný růst rostlin a jejich vývoj. Potlačením jeho aktivity dochází k inhibici růstu kořene a narušení vývojových procesů. Interakce mezi ROS a auxinem poskytuje rostlině optimalizaci růstu při nepříznivých podmínkách (Blomster *et al.*, 2011).

MPK3 a MPK6 jsou dále zapojeny v odpovědi na stres indukovaným těžkými kovy, konkrétně kadmíem, a to prostřednictvím akumulace ROS v *Arabidopsis* (Liu *et al.*, 2010). Kadmium má negativní vliv na normální růst a vývoj rostlin. Způsobuje inhibici růstu kořene, chlorózu listů (Wojcik a Tukendorf, 1999; Nocito *et al.*, 2002), dále inhibuje otevírání průduchů a také fotosyntézu (Nyitrai *et al.*, 2003).

2.1.6 Solný a osmotický stres

Nedostatek vody je jednou z nejzávažnějších hrozeb pro přežití rostlin v přírodě. Sucho a s ním spojený solný a osmotický stres rostlinám výrazně ztěžují získání vody z půdy. Rostliny se s nedostatkem vody vyrovnávají v krátkodobé nebo dlouhodobé odpovědi. Při krátkodobé odpovědi dochází k zavírání průduchů, čímž se sníží ztráta vody, ale také dojde k inhibici příjmu CO₂. Proto tato odpověď funguje jako kompromis mezi zachováním obsahu vody a průběhem fotosyntézy. Jako dlouhodobou odpověď rostliny produkují různé látky (např. ionty solí, cukry), které dělají cytoplasmatický osmotický potenciál více negativní, chrání tak buňku a potlačují růst rostliny. Obecně platí, že při nedostatku vody dochází ke značné redukci růstu nadzemní části rostliny v porovnání s kořenovou částí (Sharp a Davies, 1989).

Rostliny si vyvinuly systém pro redukci svého růstu při různém stresu, aby tak usnadnily své přežití. Jedná se tedy o aktivní proces. V případě solného stresu je potlačení růstu částečně zprostředkováno modulací represorových proteinů (Achard *et al.*, 2006).

Do signalizace při osmotickém stresu jsou zapojeny mnohé ze sekundárních přenašečů, jako jsou Ca²⁺ ionty, ROS, ale také kalcium-dependentní proteinkiny a mitogen-aktivované proteinkiny (Deinlein *et al.*, 2014; Gollack *et al.*, 2014). V rostlinách *Arabidopsis* způsobuje osmotický stres aktivaci MKKK20. Mutanti *mkkk20* jsou citlivější na vysoké koncentrace soli a vykazují vyšší ztráty vody za podmínek sucha ve srovnání s kontrolními rostlinami. Potlačení přepisu tohoto genu má rovněž za následek vyšší akumulaci superoxidů. Naopak při nadexpresi genu *MPKKK20* vykazují transgenní rostliny odolnost vůči solnému stresu. Transkripce *MKKK20* byla zvýšena po ošetření NaCl, mannitolem, sorbitolem a také při nízkých teplotách. *MKKK20* je zapojena v odpovědi na abiotický stres, zejména na osmotický stres prostřednictvím regulace aktivity MPK6 (Kim *et al.*, 2012).

2.1.6.1 Zapojení MPK3 při osmotickém stresu

Osmotický stres aktivuje několik mitogen-aktivovaných proteinkin, které mohou zprostředkovat osmotickou homeostázu a odpověď na detoxifikaci (Zhu, 2002). Jako důležitý mediátor odpovědi rostliny na osmotický stres byl identifikován protein MKK4. Mutanti *mkk4* jsou citlivější k vysokým koncentracím soli než kontrolní rostliny a vykazují větší ztráty vody při jejím nedostatku. U těchto mutantů navíc dochází

k akumulaci ROS. Naproti tomu transgenní rostliny *MKK4*, u kterých dochází k nadexpresi tohoto proteinu, jsou tolerantní k vysokým koncentracím soli a dochází u nich k nižší ztrátě vody (Kim *et al.*, 2011). *MKK4* reguluje aktivitu *MPK3* v přítomnosti NaCl. Po ošetření mutantů *mkk4* roztokem NaCl došlo ke snížení aktivity *MPK3* v porovnání s rostlinami divokého typu. U rostlin nadexprimujících gen *MKK4* byla naopak pozorována zvýšená aktivita *MPK3*. Z toho vyplývá, že *MKK4* je zapojena v odpovědi na osmotický stres prostřednictvím regulace aktivity *MPK3* (Kim *et al.*, 2011).

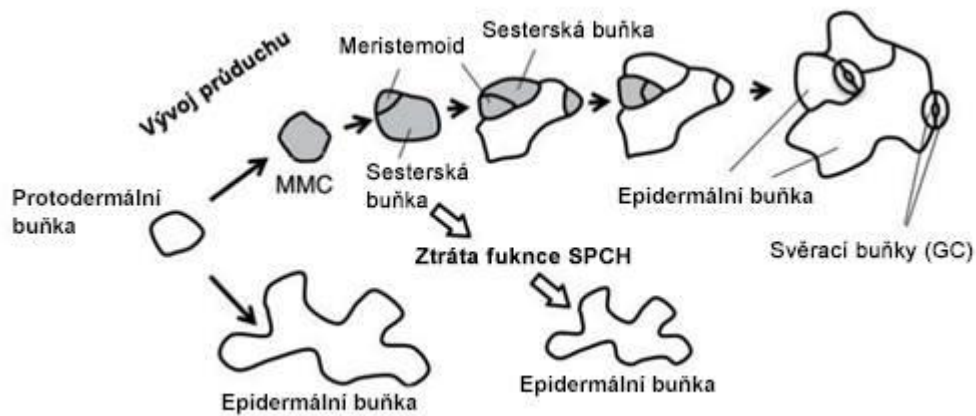
Při vývoji listu se protodermální buňky mohou diferencovat na epidermální buňky nebo na meristemoidní mateřské buňky (MMCs). MMCs jsou definované jako buňky, které podstupují asymetrické buněčné dělení pro vytvoření malé trojúhelníkové buňky zvané meristemoid a velké sesterské buňky. Oba druhy buněk mohou projít dalším kolem asymetrického buněčného dělení za vzniku svěracích buněk průduchů a epidermálních buněk (Nadeau a Sack, 2002) (Obr. 3).

Vývoj průduchů a jejich umístění je regulováno geneticky a pomocí signálů vnějšího prostředí. Hlavní roli při odpovědi na vnější podmínky sehrávají *MPK3* a *MPK6* a jejich nadřazené MAPK kinasy *MKK4* a *MKK5*. Ztráta funkce *MKK4/MKK5* nebo *MPK3/MPK6* narušuje koordinovaný vývoj buněk v procesu tvorby průduchu. Mezi jednotlivými průduchy se nevytváří epidermální buňka. Průduchy tedy nejsou odděleny a dochází k jejich shlukování. Naopak aktivace kaskády *MKK4/MKK5-MPK3/MPK6* způsobuje potlačení asymetrického dělení buněk a specifický vývoj průduchů. To vede k nedostatečné diferenciaci průduchů. Modul *MKK4/MKK5-MPK3/MPK6* je regulován proteinkinasou *YODA* (*YDA*), která náleží do třídy *MAPKKK* (Wang *et al.*, 2007). Exprese genu *YDA* reguluje základní vývoj buněk v epidermis *Arabidopsis*. Pokud dojde k potlačení exprese tohoto genu, buňky vstupují do vývojové dráhy tvorby průduchů a vznikají tak průduchové klastry. Naopak pokud je gen *YDA* exprimován neustále, všechny buňky se vyvíjí jako epidermální a průduchy nejsou na listech vůbec přítomny. Normální exprese tohoto genu je tak nutná k udržení rovnováhy mezi proliferací a diferenciací meristemoidů (Bergmann *et al.*, 2004).

Modul *MKK4/MKK5-MPK3/MPK6* má duální funkci. Kromě zapojení při vývoji průduchů se rovněž účastní odpovědi na biotický i abiotický stres. Jelikož tento signální modul zajišťuje optimální poměr mezi průduchy a epidermálními buňkami, což je důležité pro správný vývoj rostlinného organismu, jeho aktivace je velmi důležitá

pro odolnost rostliny na oba druhy stresu (Tena *et al.*, 2001; Zhang a Klessig, 2001; Nakagami *et al.*, 2005; Pedley a Martin, 2005).

Hlavním pozitivním regulátorem působícím při vývoji průduchů je transkripční faktor SPEECHLESS (SPCH), který je jako substrát fosforylován výše zmiňovanou dráhou YDA-MKK4/5-MPK3/6 (MacAlister *et al.*, 2007; Pillitteri *et al.*, 2007; Pillitteri a Torii, 2012; Pillitteri a Dong, 2013). Rostliny *Arabidopsis* v odpovědi na osmotický stres post-transkripčně snižují hladinu proteinu SPCH, čímž dochází k redukcii počtu průduchů, místo kterých vznikají epidermální buňky (Obr. 3). Rostlina je tak chráněna před nechtěným úbytkem vody, ale zároveň dochází k inhibici jejího růstu právě vlivem stresu (Kumari *et al.*, 2014).



Obr. 3 Popis geneticky naprogramované dráhy epidermálního vývoje listu. Meristemoidní mateřské buňky (MMCs) odvozené z protodermálních buněk jsou prekurzory svěracích buněk průduchů (GC). Pro vývoj průduchů je nezbytná aktivace transkripčního faktoru SPEECHLESS (SPCH). U *spch* mutantů se všechny protodermálních buňky diferencují v epidermální buňky a nedochází tak k vývoji průduchů (převzato z Kumari *et al.*, 2014).

2.2 Nástroje pro úpravu genomu eukaryotických organismů

Pro výzkumné účely je využíván přístup tzv. editace genomu, který můžeme nalézt ve studiích zaměřených na funkční genomiku, transgenní organismy a genovou terapii. Editace genomu je založena na navržených, programovatelných a vysoce specifických nukleasách. Tyto nukleasy mohou způsobit lokální změny v genomu organismu přes DNA domény, jež se specificky váží na sekvenci DNA, a přes DNA domény, které nesespecificky štěpí DNA. Tyto chimérické nukleasy umožňují přesné a účinné genetické změny vytvořením cílených dvouvláknových zlomů (double-strand breaks, DSBs), které stimulují buněčné opravné mechanismy DNA vedoucí k reparaci zlomů. Dochází tak k vytvoření inserce, delece nebo substituce na požadovaném místě (Zhang *et. al.*, 2014).

Existují dva obecné způsoby opravy DSBs, mezi které patří nehomologní spojování volných konců (non-homologous end joining, NHEJ) a homologní rekombinace (homologous recombination, HR) (Wyman a Kannar, 2006). Při NHEJ opravné dráze DSBs dochází ke spojení dvou zlomených konců dohromady. Není tak využíván homologní templát, a tak typicky dochází k zavedení malé inserce nebo delece v místě zlomu. Takové změny často vedou k posunutí čtecího rámce a k následnému vyřazení funkce genu. Naopak HR je opravná cesta závislá na templátu. Přidáním donorového homologního templátu pomocí specifické nukleasy následně dochází k vložení donorové molekuly DNA do cílového místa a k jeho opravě. Tento přístup umožňuje inserci jednoho nebo více transgenů, jakož i substituci jednoho nukleotidu (Gaj *et. al.*, 2013).

2.2.1 Indukce DSBs umělými nukleasami

Vznik DSBs v cílovém genu vyžaduje navržení nukleas, které mohou způsobit zlomy na vybraném místě v genomu (Puchta a Fauser, 2014; Voytas, 2013). Pro tyto účely byly navrženy čtyři typy nukleas. Do první třídy řadíme modifikované meganukleasy odvozené od navádějících endonuklas, jako je I-SceI (Colleaux *et al.*, 1986). Dalším typem jsou nukleasy zinkových prstů (Zinc Finger Nucleases, ZFNs), což jsou první programovatelné nukleasy odvozené od transkripčních faktorů s motivem zinkových prstů (Kim *et al.*, 1996). Třetím typem nukleas jsou efektorové nukleasy typu TALEN (Transcription Activator-like Effector Nucleases) odvozené od patogenní bakterie rodu *Xanthomonas*, která poskytuje více možností při vybírání cílové sekvence než ZFNs

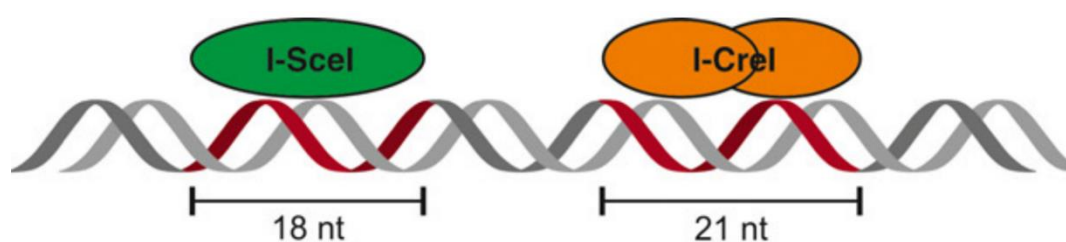
(Boch *et al.*, 2009; Moscou a Bogdanove, 2009). Nedávno se stal dostupný také čtvrtý typ navržených nukleas, a to CRISPR/Cas systém (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromid Repeat/CRISPR Associated System). Je odvozen od adaptivního imunitního systému bakterií a archae, který degraduje invazní cizorodý plasmid nebo virální DNA (Wiedenheft *et al.*, 2012).

2.2.1.1 Meganukleasy

Základní mechanismy opravy DSBs v rostlinném genomu byly objasněny použitím řízených endonukleas I-SceI. Tyto meganukleasy byly objeveny v mitochondriích kvasinek (Jacquier a Dujon, 1985) a jejich použitelnost pro opravu DSBs byla demonstrována *in vivo* využitím molekul plasmidu v protoplastu modelové rostliny *Nicotiana* (Puchta *et al.*, 1993).

I-SceI je monomerní meganukleasa, která po navázání odstříhne rozpoznávací místo o velikosti 18 nukleotidů (Obr. 4). Mezi další meganukleasy řadíme I-CreI. Jedná se o dimer, který rozpoznává vazebné místo o velikosti 21 nukleotidů (Obr. 4). Pro rozpoznání uměle vytvořených cílů však musela být DNA vazebná doména meganukleasy I-CreI modifikována (Puchta a Fauser, 2014).

Enzymy I-CreI byly úspěšně použity pro mutagenезi zprostředkované pomocí NHEJ v kukuřici (Gao *et al.*, 2010), dále pro vyštěpení transgenní sekvence v *Arabidopsis* (Antunes *et al.*, 2012) a také pro skládání genů v bavlníku (D'Halluin *et al.*, 2013).



Obr. 4 Přirozeně se vyskytující meganukleasy I-SceI a I-CreI. I-SceI je monomerní meganukleasa, která se váže na rozpoznávací místo o velikosti 18 nt, kde dochází k sestříhu DNA. I-CreI je dimerní meganukleasa rozpoznávající 21 nt vazebné místo (převzato z Puchta a Fauser, 2014).

2.2.1.2 Nukleasy zinkových prstů (ZFNs)

Nukleasy s motivem zinkových prstů byly vyvinuty jako účinný nástroj pro manipulaci genomu. Pomocí ZFNs bylo provedeno mnoho experimentů, které prokázaly obrovský potenciál umělých nukleas obecně. Tyto nukleasy byly původně vyvinuty skupinou Srinivasana Chandrasegarana (Kim *et al.*, 1996) a Dana Carrolla (Smith *et al.*, 2000)

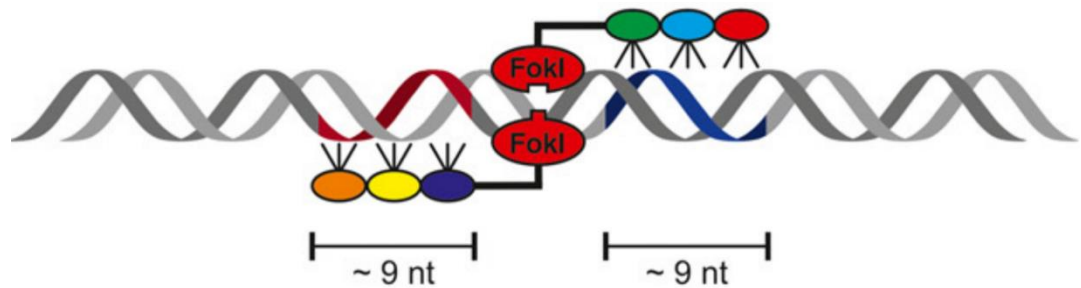
ZFNs jsou enzymy skládající se ze dvou nezávislých částí: endonukleasové domény restričního enzymu *FokI* pocházejícího z *Flavobacterium okeanoikoites* a vazebné části zinkového prstu, která se vyskytuje u transkripčních faktorů (Kim *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 2000). DNA vazebná doména ZFNs je obvykle složena ze tří až čtyř vazebných oblastí, které rozpoznávají tři nukleotidy jdoucí po sobě. Na monomer proteinu může být celkově rozpoznáno 9-12 nukleotidů sekvence DNA. Aby se enzym stal aktivní, musí dojít k dimerizaci dvou domén endonukleasy *FokI*. Teprve potom může dojít k sestřihu dvojvlákna DNA (Puchta a Fauser, 2014) (Obr. 5).

Rozhodujícím průlomem pro editaci genů v rostlinných buňkách bylo prokázání, že ZFNs lze použít pro tzv. cílení genů (gene targeting, GT). Pomocí obnovení funkce defektního markerového genu pro β -glukuronidasu (*GUS*) v protoplastech tabáku bylo demonstrováno, že frekvence GT lze zvýšit pomocí ZFNs v porovnání s náhodnou integrací (Wright *et al.*, 2005). Dále bylo prokázáno, že ZFNs lze použít k přeměně uměle zavedeného restričního místa v genomu *Arabidopsis* za použití NHEJ (Lloyd *et al.*, 2005). V tabáku byly ZFNs použity ke zprostředkování GT na endogenní rostlinné geny, konkrétně geny pro acetohydroxykyselinové syntasy (*SuRA* a *SuRB*). Specifickou mutací těchto genů se rostlina může stát rezistentní na imidazolové a sulfonylmočovinné herbicidy (Townsend *et al.*, 2009). Dalším příkladem je využití ZFNs pro GT genu *IPK1* kukuřice, který kóduje inositol-1, 3, 4, 5, 6 -pentakisfosfát-2-kinasu. Jedná se o enzym katalyzující konečný krok při biosyntéze fytátu v semenech kukuřice (Sun, Y. *et al.*, 2007). Mutace tohoto genu je důležitá pro redukci fytátu, který přispívá ke znečištění životního prostředí a snižuje využitelnost důležitých živin (Raboy, 2015; Stevenson-Paulik *et al.*, 2005).

I když se ZFNs staly účinným nástrojem pro editaci rostlinného genomu, byly vyvinuty novější a mnohem dostupnější nástroje pro indukci DSBs na specifických místech. Uměle navržené nukleasy se obecně potýkají s problémem, že mohou přerušit další oblasti v genomu, které jsou podobné, ale ne identické s cílovým místem.

Následkem mohou být mutace, které by vedly k nevyžádaným vedlejším efektům (Voytas, 2013).

Další nevýhodou je větší časová náročnost konstrukce ZFN než u systémů TALEN nebo CRISPR/Cas. Rovněž se jedná o méně univerzální systém, jelikož návrh konkrétní ZFN je často omezen nevhodností cílové sekvence (Puchta a Fauser, 2014).



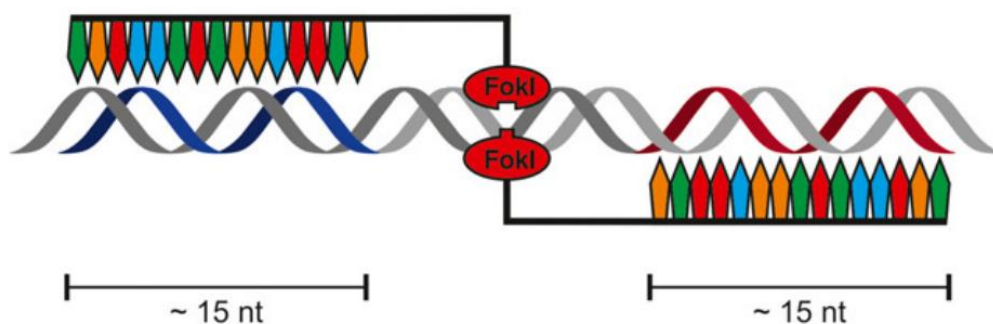
Obr. 5 Nukleasy zinkových prstů (ZFNs) fungují pouze ve formě dimerů. Tyto enzymy se skládají ze dvou nezávisle navržených podjednotek. Každá podjednotka je rozdělena na DNA-vazebnou doménu a nukleasovou doménu. Nejčastěji se jako endonukleasa používá heterodimerní verze enzymu *FokI*. Řada tři až čtyř zinkových prstů je spojena s DNA-vazebnou doménou a každý zinkový prst rozpoznává 3 nt. DNA rozpoznávací místo tak může být charakterizováno 9-12 nukleotidy (převzato z Puchta a Fauser, 2014).

2.2.1.3 Endonukleasy typu TALEN

TALEN (Transcription Activator-like Effector Nucleases) systém je spojen s bakterií rodu *Xanthomonas*. Tato patogenní bakterie napadá plodiny jako je rýže, paprika nebo rajče a způsobuje tak značné ztráty v zemědělství. Bylo zjištěno, že při napadení rostliny bakterie vylučují efektorové proteiny (TALEs) do cytoplasmy rostlinných buněk. To má za následek ovlivnění probíhajících buněčných procesů a zvýšení náchylnosti rostliny k patogenu. Efektorové proteiny jsou schopny vázat se na DNA a aktivovat tak expresi cílových genů podobně jako transkripční faktory v eukaryotických buňkách (Nemudryi *et al.*, 2014).

TALE proteiny jsou složeny z centrální domény odpovědné za vazbu na DNA a domény, která aktivuje transkripci cílového genu (Schomack *et al.*, 2006). DNA-vazebná doména obsahuje vysoce konzervovanou sekvenci složenou z 33-35 opakujících se aminokyselin, z nichž každá 12. a 13. aminokyselina je variabilní, a je tak zodpovědná za rozpoznání jednotlivého nukleotidového páru. Tím je zajištěna specifita štěpení. Variabilní aminokyselinová residua se mohou vázat na několik nukleotidů s různou účinností (Lamb *et al.*, 2013). Součástí TALE nukleas je katalytická doména, která je odvozena od endonukleasy *FokI* a štěpí DNA pouze jako dimer stejně jako v případě ZFNs (Li *et al.*, 2011) (Obr. 6).

Nukleasy typu TALEN našly využití zejména při editaci genomu u rostlin. Pomocí těchto nukleas byla například zavedena mutace v promotoru genu *OsSWEET14* z rýže. Tento gen kóduje jeden ze SWEET transportérů zajišťující vylučování sacharosy a je zodpovědný za sensitivitu vůči houbové plísni. Mutací vazebného motivu pro transkripční faktor patogenu byla zvýšena odolnost rýže vůči bakteriálnímu onemocnění (Li *et al.*, 2012). Dále byla tato metoda použita pro cílené vyřazení několika genů v *Brachypodium* (Shan *et al.*, 2013), a také pro zavedení mutací v genomu ječmene (Wendt *et al.*, 2013).



Obr. 6 Schéma endonukleas typu TALEN. Jedná se o dimerní enzymy, které jsou strukturně velmi podobné nukleasám zinkových prstů. Jako nukleasová doména je použita opět endonukleasa *FokI*. DNA-vazebná doména se skládá z aminokyselinových repetitivních specifických vždy pro určité nukleotidy (převzato z Puchta a Fauser, 2014).

2.2.1.4 CRISPR/Cas systém

Segmenty nahromaděných pravidelně rozložených krátkých palindromických repetitivních (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat, CRISPR) a jejich asociované proteiny (CRISPR-associated proteins, Cas) představují adaptivní imunitní systém bakterií a archaea. Tento systém umožňuje organismům reagovat na invazní genetický materiál a odstranit jej. V roce 1980 byly tyto repetitivce objeveny v *E. coli* (Ishino *et al.*, 1987), nicméně jejich funkce nebyla dlouho potvrzena. Až v roce 2007 se podařilo prokázat, že *Streptococcus thermophilus* je schopen získat rezistenci vůči bakteriofágu integrací genomového fragmentu infekčního viru do CRISPR lokusu (Barrangou *et al.*, 2007).

Klasifikace CRISPR/Cas systému

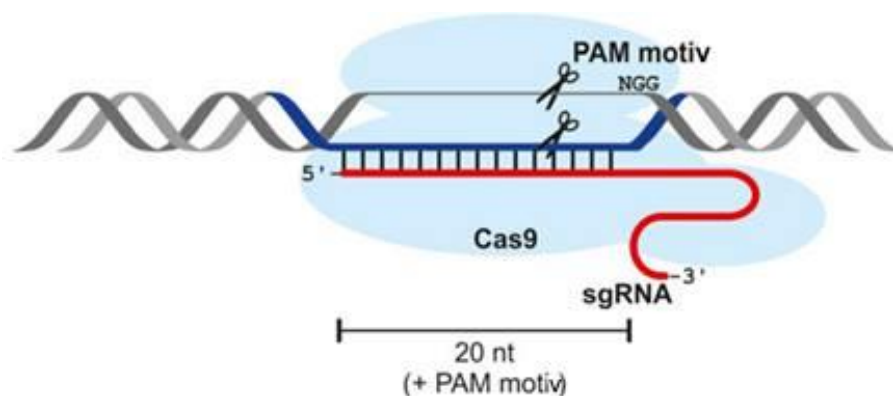
CRISPR/Cas systém lze rozdělit do dvou hlavních tříd, které jsou dále klasifikovány na šest typů a několik podtypů. Toto rozdělení je založeno na výskytu efektorových Cas proteinů, které štěpí cizorodou DNA. V 1. třídě obsahující typ I, III a IV se efektorový modul skládá z multiproteinových komplexů, zatímco 2. třída obsahující typ II, V a VI využívá jediný efektorový protein (Makarova *et al.*, 2015).

Nejvíce pozornosti je věnováno právě Cas nukleasám typu II. V tomto systému dochází ke štěpení invazní virové DNA nebo plasmidů na krátké fragmenty, které jsou vmezeřeny do CRISPR lokusů uprostřed řady krátkých repetitivních (okolo 20 bp). Místa jsou

transkribována a transkript je poté dále zpracován pro vytvoření tzv. crRNA (CRISPR RNA), která slouží k navádění efektorových Cas endonukleas. Ty se poté mohou vázat na invazní DNA na základě komplementarity bází (Jinek *et al*, 2012).

Molekulární mechanismus CRISPR/Cas9

Objasněním molekulárního mechanismu typu II CRISPR/Cas systému pocházejícího z bakterie *Streptococcus pyogenes* došlo k odhalení jednoduchého tříložkového systému. Protein Cas9 je nukleasa schopná štěpit dvojlákno DNA a skládá se ze dvou nukleasových domén RuvC a HNH, z nichž každá štěpí jedno vlákno DNA. Cílová specifita je řízena crRNA, která se váže přímo na sekvenci cílové DNA o velikosti 20 nt nazývanou protospacer (Obr. 7). Pro vazbu a následné štěpení nukleasou Cas9 je potřebný další 3-nukleotidový prvek označován jako motiv přilehlý k protospaceru (protospacer-adjacent motif, PAM) s dinukleotidem guaninu (NGG) za cílovou sekvencí. Znamená to, že nukleasa Cas9 může být cílena na každou sekvenci přesahující 23 nukleotidů a končící dvěma guaniny. Transaktivací crRNA (tracrRNA) interaguje s crRNA a dochází tak k jejich fúzi za vzniku chimérické single-guide RNA (sgRNA), která slouží k navedení Cas9 k cílové sekvenci, kde dojde ke štěpení DNA a následnému vzniku DSBs (Jinek *et al*, 2012) (Obr. 7).



Obr. 7 Schéma CRISPR/Cas systému. Nukleasa Cas9 tvoří komplex s chimérickou sgRNA (single-guide RNA), která je zodpovědná právě za specifitu nukleasy Cas9. V tomto systému je rozpoznávací místo definováno tzv. protospacerem o velikosti 20 nt končící motivem NGG, který je označován jako tzv. PAM motiv. sgRNA navádí Cas9 nukleasu na protospacer na základě komplementarity bází (převzato z Puchta a Fauser, 2014).

Využití CRISPR/Cas systému

Vysoká účinnost a nenáročnost CRISPR/Cas9 systému vedla k jeho širokému využití např. v zemědělství. Tento nástroj byl použit nejen k úpravě genomu modelových rostlin jako je *Arabidopsis thaliana* nebo *Nicotiana benthamiana* (Song *et al.*, 2016), ale také u plodin jako je rýže, pšenice, rajče, hlávkový salát nebo brukev (Lawrenson *et al.*, 2015; Woo *et al.*, 2015; Karkute *et al.*, 2017).

Například u rajčete bylo nezávisle na sobě upraveno 18 různých genů. Jedním z genů je *ARGONAUTE7 (SIAGO7)*, který je zapojen ve vývoji listu. Ztráta funkce tohoto genu se projevila tím, že listy vypadaly jako jehlice nebo byly zvrásnělé (Brooks *et al.*, 2014).

Systém CRISPR/Cas9 byl také použit pro zlepšení vlastností zeleninových plodin. Využitím systému CRISPR/Cas9 byl identifikován gen zodpovědný za partenokarpii neboli bezsemennost. Mutace genu *SIAGAMOUS-LIKE 6 (SIAGL6)* umožňuje rajčeti produkovat plody při tepelném stresu. Tato mutace má za následek fakultativní partenokarpii projevující se tvorbou bezsemenných plodů (Klap *et al.*, 2017). CRISPR/Cas systém byl také využit pro zlepšení kvality brambor. Kvalita škrobu obsaženého v bramborách je důležitým faktorem pro výběr potravin i pro technické využití (Klosgen *et al.*, 1986). Škrob je zásobní polysacharid složený ze dvou různých polysacharidů amylosy a amylopektinu. Upravením poměru těchto dvou složek dojde ke změně vlastností škrobu (Zeeman *et al.*, 2010). Za syntézu amylosy je zodpovědný enzym GBSS (granule-bound starch synthase), který je v bramborech a většině ostatních rostlin kódován jedním lokusem (*GBSSI*) mající čtyři alely. Umlčením funkce genu *GBSSI* tak bylo dosaženo produkce brambor s vysokým obsahem amylopektinu. (Andersson *et al.*, 2017).

CRISPR/Cas9 je rovněž důležitým nástrojem pro navození rezistence vůči virovým onemocněním. V genomu rostlin se nachází geny důležité pro odolnost rostlin vůči onemocnění, ale i geny, které jsou vůči nemoci citlivější. Vyřazením příslušného citlivějšího genu se rostlina stává rezistentní vůči určité chorobě. Tohoto bylo dosaženo v rajčeti vyřazením genu *Mildew resistant locus o 1 (SIMlo1)* z činnosti, který rostlině uděluje vnímavost vůči houbě *Oidium neolycopersici* způsobující plísňovou chorobu. (Nekrasov *et al.*, 2017). Mutací genu *SIMlo1* ve dvou místech pomocí dvou sgRNA došlo k vytvoření rajčete rezistentního vůči této chorobě

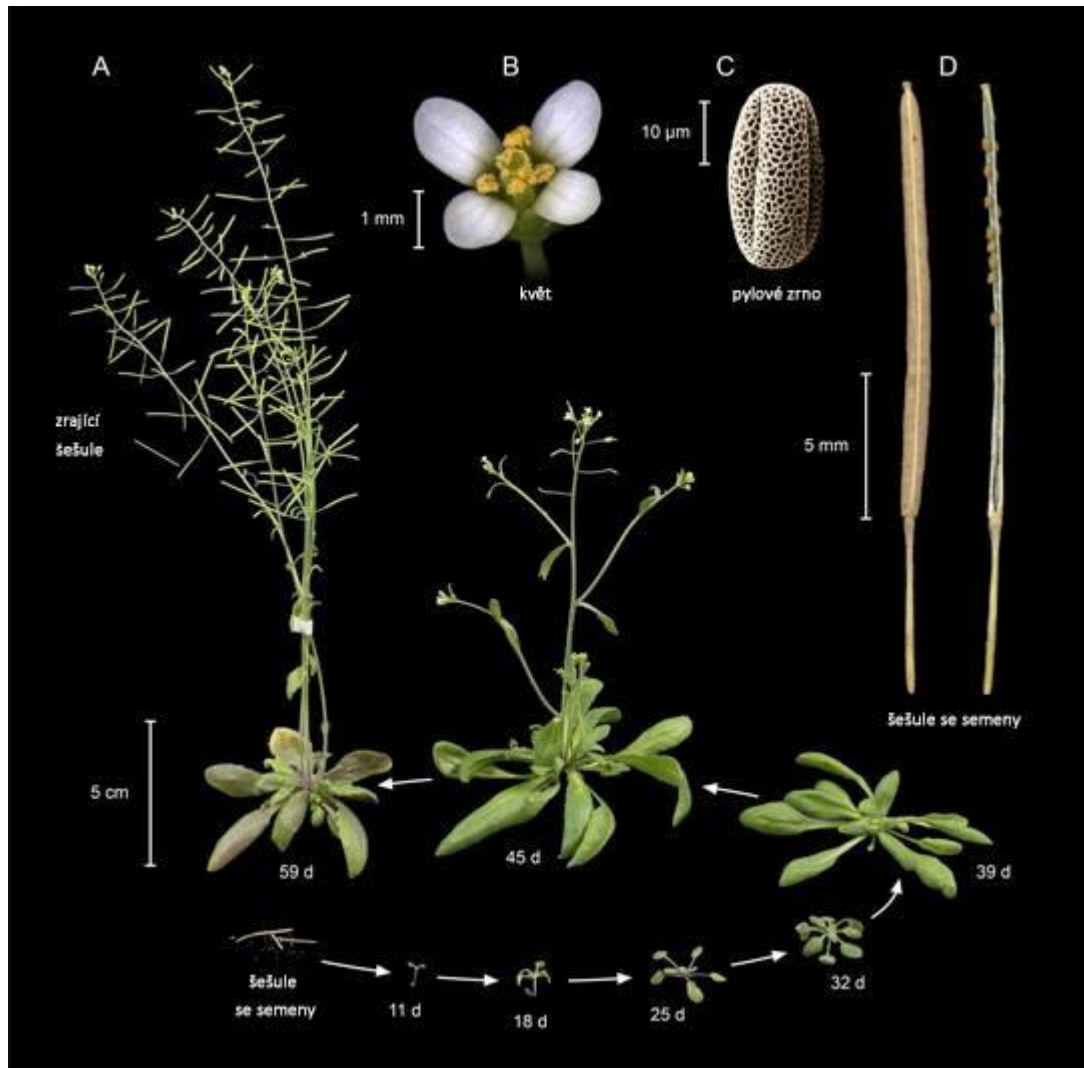
(Nekrasov *et al.*, 2017). Podobný přístup byl použit ke vzniku rezistence vůči plísňové chorobě u pšenice (Wang *et al.*, 2014).

2.3 Modelový organismus *Arabidopsis thaliana*

Již po desetiletí je rostlina *Arabidopsis thaliana* používána jako modelový organismus pro biologický a genetický výzkum. Tato jednoduchá krytosemenná rostlina je vhodným modelem nejen pro rostlinnou biologii, ale také pro řešení zásadních otázek biologické struktury a funkce společné všem vyšším rostlinám (Meyerowitz a Somerville, 1994). *A. thaliana* byla poprvé vybrána jako modelový genetický organismus Friedrichem Laibachem v Evropě a později detailněji studována Redéiem ve Spojených státech (Laibach, 1943; Rédei, 1970). Posun směrem k *Arabidopsis* získal dynamiku na začátku 80. let po vydání podrobné genetické mapy (Koornneef *et al.*, 1983) a publikace, která popisuje hodnotu *Arabidopsis* pro studium rostlinné fyziologie, biochemie a vývoje (Meike a Sussex, 1979; Koornneef, 1980; Somerville a Ogren, 1979). Toto bylo doprovázeno dvěma významnými pokroky, a to navržením transformačního protokolu (An *et al.*, 1986; Lloyd *et al.*, 1986; Feldmann a Marks, 1987) a demonstrací malého genomu *Arabidopsis* přístupného pro podrobné molekulární analýzy (Meyerowitz a Pruitt, 1985).

Díky své stresové toleranci a přizpůsobivosti lze tuto rostlinu nalézt v různých klimatických oblastech a stanovištích. Její populace se vyskytují v Evropě, Asii a Africe. Nalezena byla i v Severní Americe a Austrálii, kam se pravděpodobně dostala z Evropy (Meyerowitz a Somerville, 1994).

Jako modelový organismus byla *Arabidopsis* vybrána také kvůli snadné kultivaci v podmínkách *in vitro* i v podmínkách *in vivo*. Celý životní cyklus této rostliny je dokončen za 6 až 8 týdnů (Obr. 8). Krátký generační cyklus nám tak umožňuje získat 6–8 generací do jednoho roku. *A. thaliana* je samosprašná, jediná rostlina tak může produkovat stovky až tisíce semen. V další generaci je tedy možné dosáhnout stejného počtu potomků, což se využívá v genetické analýze (Meike *et al.*, 1989). Hlavní výhodou je však velikost a struktura genomu této rostliny. V jádře se nachází 5 párů chromozomů a haploidní genom obsahuje 125×10^6 páru bází. V porovnání s ostatními modelovými organismy je genom *Arabidopsis thaliana* 25krát větší než genom *Escherichia coli*, 10krát větší než genom kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, je srovnatelný s genomem živočišného modelového organismu *Drosophila melanogaster* a přibližně 26krát menší než lidský genom (Řepková, 2007).



Obr. 8 Životní cyklus *Arabidopsis thaliana*. (A) *A. thaliana* v různých stádiích svého životního cyklu, od semene (dole vlevo) přes semenáček (stáří 11 dní), rostlinu ve vegetativním období (stáří 39 dnů), až po rostlinu v reprodukčním období (stáří 45 dní). (B) Květ. (C) Pylové zrno. (D) Zralé sešule (převzato z Krämer, 2015).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiály

3.1.1 Použité přístroje

Analytické váhy (XA 110/2X, RADWAG)

Automatické pipety (Eppendorf)

Dokumentační zařízení Geldoc™ EZ systém (Bio-Rad)

Fytotron (Weiss Gallenkamp)

Horizontální agarosová elektroforéza (Bio-Rad)

Chemidoc™ MP systém (Bio-Rad)

Chlazená centrifuga (Beckman)

Laboratorní digestoř (M 1200, MERCI)

Magnetická míchačka (MSH-420, BOECO)

NanoDrop™ Lite spektrofotometr (Thermo Fisher Scientific)

pH metr (PC 2700, Eutech Instruments)

Předvážky (S1502, BEL Engineering)

Termoblok (CHB-202, Bioer)

Thermocycler (MyCycler™ Personal Thermal Cycler Bio-Rad)

Třepačka (Labnet)

UV/Vis Spektrofotometr (DU 700, Beckman Coulter)

Vertikální elektroforéza denaturovaných proteinů SDS-PAGE (Bio-Rad)

3.1.2 Software pro zpracování výsledků

ApE

ImageLab

EPSONscan

3.1.3 Enzymy a chemikálie

Standardy pro elektroforézu

- GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (Bio-Rad, USA)

Protilátky použité pro Western blot

- Primární protilátka proti MPK3 produkovaná v králíkovi (rabbit anti-MPK3) (Sigma, USA)
- Sekundární protilátka proti králičí primární protilátce produkovaná v koze (goat anti-rabbit) značená křenovou peroxidasou (HRP) (Novex™, USA)

Použité kity

- PCR Purification Kit (250) (QIAGEN, Německo)
- Phire Plant Direct PCR kit (Thermo Fisher Scientific, USA)

Další použité chemikálie

- 4x vzorkovací Laemmli pufr, 5x M-MVL RT pufr (Promega, USA), M-MLV reverzní transkriptasa (Promega), 6x Gel Loading Dye (Thermo Fisher Scientific), 10x Dream Taq pufr (Thermo Fisher Scientific), agarosa (Sigma), BCP (Sigma), Bradfordovo činidlo (Serva, Německo), Dream Taq polymerasa, EDTA (Sigma), Clarity™ Western ELC Substrat (Bio-Rad), 96% etanol (Sigma), 70% etanol (Sigma), fluorid sodný (Sigma), fosfinotricin (Duchefa, Nizozemí), guma gellan (Sigma), glycerol (Sigma), HEPES (Duchefa), hydroxid draselný (Sigma), chlorid hořečnatý (Sigma), chlorid sodný (Sigma), inhibitory proteas a fosfatas - Complete™, DTT (Roche, Švýcarsko), Pefablock (Roche, Švýcarsko), PhoStop™ (Roche), isopropanol (Sigma), kyselina octová (Sigma), β-merkptoetanol (Sigma), MES (Sigma), Midori green DNA Staining Solution, metanol, Murashige-Skoog médium bez vitamínů (Duchefa), inhibitor RNas RNasin® (Promega, USA), sacharosa (Sigma), SDS (Sigma), TRI Reagent® Solution (Sigma), Tris (Sigma), Tween20 (Sigma).

3.1.4 Složení médií a roztoků

½ Murashige & Skoog médium (½ MS) bez vitamínů (1 l)

- 2,2 g Murashige-Skoog média bez vitamínů
- 10 g sacharózy
- 1 g MES
- 0,6% gumy gellan

Roztok byl doplněn dH₂O na konečný objem 1 l a pH bylo upraveno na 5,8 pomocí 1 M KOH. Poté byl roztok nalit do lahví obsahujících gumu gellan a sterilizován autoklávováním.

50x TAE pufr pro agarosovou elektroforézu (1 l)

- 242 g Tris
- 57,1 ml ledové kyseliny octové
- 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)

Extrakční pufr E (100 ml)

- 1,19 g HEPES, pH 7,5 (NaOH)
- 0,43 g NaCl
- 0,038 g EGTA
- 100 µl 1M MgCl₂
- 0,004 g NaF
- 10 ml glycerolu

Připravený extrakční pufr E byl sterilizován pomocí filtru s velikostí pórů 22 µm.

Před použitím byl extrakční pufr E doplněn inhibitory proteas a fosfatas. Na 1 ml pufru bylo přidáno:

- 1 μ l 1M DTT
- 20 μ l Pefablock
- 20 μ l Complete™
- 100 μ l PhoStop™

10x elektrodoový pufr (1 l)

- 30 g Tris
- 144 g glycinu
- 10 g SDS

Transferový pufr (1 l)

- 24,2 g Tris
- 112,6 g glycinu

10x TBS pufr (1 l)

- 24 g Tris/HCl, pH 7,4-7,6
- 80 g NaCl

1x TBS-T pufr (1 l)

- 100 ml 10x TBS
- 1 ml Tween 20

Ponceau S (100 ml)

- 0,001 g Ponceau S rozpuštěn v 5% kyselině octové

3.1.5 Rostlinný materiál

Arabidopsis thaliana, ekotyp Columbia (Col-0)

Arabidopsis thaliana – mutant *mpk3-4/2* s T-DNA inzercí v promotorové oblasti genu *MPK3* (SAIL_873_G05, Sessions *et al.*, 2002)

Arabidopsis thaliana – mutant *mpk3-1* s T-DNA inzercí v kódující sekvenci genu *MPK3* (SALK_151594, Alonso *et al.*, 2003)

Arabidopsis thaliana – heterozygotní mutant *mpk3-5*, linie 1/14, generace T2 připravený metodou CRISPR/Cas9 s mutací v prvním exonu genu *MPK3*

Arabidopsis thaliana – heterozygotní mutant *mpk3-5*, linie 1/17, generace T2 připravený metodou CRISPR/Cas9 s mutací v prvním exonu genu *MPK3*

3.2 Metody

3.2.1 Povrchová sterilizace semen *Arabidopsis thaliana*

Semena *A. thaliana* byla sterilizována v laminárním boxu. 100 μ l semen bylo odsypáno do zkumavky o objemu 1,5 ml a pomocí pipety byl přidán 1 ml 70% etanolu. Suspenze byla inkubována po dobu 5 min za neustálého třepání. Po uplynutí inkubační doby byl etanol ze zkumavky odpipetován a následně byl přidán 1 ml 96% etanolu. Suspenze byla protřepávána po dobu 1 min. Po usazení semen na dně zkumavky byl etanol odpipetován. Následovalo promývání sterilní destilovanou vodou. Semena byla promývána dvakrát v 1 ml dH₂O vždy po dobu 5 min. Nakonec byla semena s vodou pomocí špičky se sestřihnutým koncem přepipetována na sterilní filtrační papír umístěný v Petriho misce. Po uschnutí filtračního papíru byla Petriho miska uzavřena parafilmem a skladována v lednici.

3.2.2 Setí semen *Arabidopsis thaliana*

Semena *A. thaliana* byla vysévána na čtvercové Petriho misky s ½ MS médiem v laminárním boxu. Petriho misky byly následně uzavřeny prodyšnou lepicí páskou a uchovány v lednici při 4 °C přes noc. Uchování semen při nízké teplotě se provádí kvůli procesu stratifikace. Poté byly misky přemístěny do fytotronu a kultivovány při teplotě 23 °C a fotoperiodě 16 hod světlo/8 hod tma.

3.2.3. Selekcce mutantních rostlin *A. thaliana mpk3-5* v T2 generaci

Ze čtrnáctidenních semenáčků *A. thaliana* rostoucích na kontrolním ½ MS médiu byl asepticky odstříhnut list a přenesen na selekční ½ MS médium s přídavkem 50 μ M fosfinotricinu. Selekcce probíhala ve fytotronu při výše uvedených podmínkách po dobu sedmi dnů. Výsledky selekcce byly zdokumentovány na fotoaparát.

3.2.4 Extrakce genomové DNA (gDNA)

Do 0,6 ml mikrozkušavky bylo napipetováno 20 μ l dilučního pufru. Z vyselektovaných mutantních rostlin byl odebrán list, přenesen do mikrozkušavky s pufrům a rozdrcen špičkou. Mikrozkušavky byly ponechány na ledu po dobu 1 hod. Extrahovaná gDNA byla následně použita jako templát pro PCR.

3.2.5 Polymerasová řetězová reakce (PCR)

Pro amplifikaci sekvence genu *MPK3* byla připravena reakční směs obsahující 25 μ l 2x Phire Plant PCR pufru s přídavkem nukleotidů (dNTPs), 0,5 μ M forward primeru (FP), 0,5 μ M reverse primeru (RP) a templátu 3 μ l gDNA. Reakční směs byla doplněna na celkový objem 50 μ l deionizovanou vodou pro PCR. Nakonec byl přidán 1 μ l DNA polymerasy Phire II. Sekvence použitých primerů je uvedena v Tab. 1. Podmínky pro PCR byly nastaveny podle Tab. 2.

Tab. 1 Sekvence primerů použitých při PCR

FP	5'-GGC TCT AAT CTC AAC CAC ACG A-3'
RP	5'-CTC AGA GAA GGA AAC ATA CCA AAC G-3'

Tab. 2 Nastavení cyklů PCR reakce

Krok cyklu	Fáze	Teplota	Čas	Počet cyklů
1	Počáteční denaturace	98 °C	5 min	1
2	Denaturace	98 °C	5 s	36
3	Annealing primerů	60 °C	5 s	
4	Elongace	72 °C	20 s	
5	Finální elongance	72 °C	1 min	1

3.2.6. Agarosová elektroforéza

Amplifikace genu *MPK3* byla ověřena elektroforézou v 1% agarosovém gelu. Z celkového objemu PCR reakce bylo odebráno 5 μ l a ke každému vzorku byl přidán 1 μ l 6x DNA Gel Loading Dye. Pro vizualizaci DNA bylo do 75 ml agarosového gelu přidáno 3,75 μ l barviva Midori Green DNA Staining Solution. Elektroforetická vana s gelem byla naplněna 1x TAE pufrem a elektroforéza probíhala po dobu 40 min při konstantním napětí 100 V. Výsledek byl vyhodnocen pomocí dokumentačního zařízení GeldocTM EZ systému za použití softwaru ImageLab (Bio-rad).

3.2.7 Purifikace DNA

Pro přečištění PCR produktu byl použit PCR Purification Kit (250). Do 2 ml mikrozkuvek byl napipetován PB pufr o objemu 5násobku PCR reakce a celý objem PCR reakce. Objem mikrozkuvky byl přepipetován do kolonek a centrifugován po dobu 1 min při 13 000 rpm. Následně byl supernatant odlit a do kolonky bylo přidáno 750 μ l PE pufru. Zkuvky byly opět centrifugovány 1 min při 13 000 rpm. Supernatant byl znovu odlit a zkuvky byly ještě jednou centrifugovány, aby došlo k odstranění zbytků PE pufru z kolonky. Poté byla kolonka přemístěna do 1,5 ml zkuvek. Pro eluci DNA zachycené v kolonce bylo do středu kolonky napipetováno 30 μ l deionizované vody pro PCR a po 1 min byly mikrozkuvky s kolonkami centrifugovány opět 1 min při 13 000 rpm. Na závěr byla měřena koncentrace a čistota DNA spektrofotometricky pomocí přístroje NanoDropTM Lite.

3.2.8 Příprava vzorků na sekvencování

Vzorky pro sekvencování obsahovaly 50 ng přečištěné DNA, 25 pmol primeru FP (Tab. 1) a deionizovanou vodu pro PCR do celkového objemu 10 μ l. Výsledky sekvencování byly vyhodnoceny v programu ApE.

3.2.9 Polymerasová řetězová reakce spojená s reverzní transkripcí (RT-PCR)

Pro izolaci celkové RNA byla použita nadzemní část semenáčků Col-0, *mpk3-1* a *mpk3-5*, linie 1/14 a 1/17. Rostlinný materiál byl homogenizován v tekutém dusíku na jemný prášek. Následně bylo přidáno 800 μ l Trireagent Solution, vzorky byly zvortexovány a inkubovány 5 min při pokojové teplotě. Následovala centrifugace při 12 000x g, 10 min, 4 °C. Poté byly vzorky umístěny na led a supernatant byl přepipetován do čistých mikrozkušavek. Ke každému vzorky bylo přidáno 80 μ l BCP, vzorky byly následně intenzivně protřepávány 15 s, poté zvortexovány a inkubovány 10 min při pokojové teplotě. Po uplynutí inkubační doby byly vzorky centrifugovány při 12 000x g, 15 min, 4 °C. Centrifugací došlo k rozdělení vzorku na vodnou fázi obsahující nukleové kyseliny a fenolovou fázi obsahující proteiny. Vodná fáze byla odebrána do čistých mikrozkušavek a byl k ní přidán isopropanol v množství 70 % objemu vodné fáze. Vzorky byly promíchány a inkubovány 5 min při pokojové teplotě. Následovala centrifugace při 12 000x g, 8 min, 4 °C. Vzniklý pelet RNA byl promyt v 1 ml 75% etanolu po dobu 30 min při pokojové teplotě. Poté byly vzorky stočeny při 7 500x g, 5 min, 4 °C. Supernatant byl odpipetován a pelet byl ponechán uschnout. Pelet RNA byl rozpuštěn ve 30 μ l vody bez obsahu RNas a DNas. Na závěr byla změřena koncentrace a čistota izolované RNA.

DNA přítomná ve vzorku RNA byla degradována pomocí enzymu DNasa I. Reakční směs pro štěpení obsahovala 2 μ l DNasa I pufru, 2 μ l DNasy I, 2 μ g RNA a deionizovanou vodu pro PCR na celkový objem 20 μ l. Inkubace probíhala při 37 °C po dobu 40 min. Dalším krokem byla inaktivace DNasy I přidáním 2 μ l 50 mM EDTA. Po přidání EDTA byly vzorky promíchány, krátce stočeny a inkubovány při 70 °C po dobu 10 min.

Pro přepis RNA do cDNA byla připravena reakční směs obsahující 5 μ l RNA ošetřené DNasou I, 0,5 μ l oligo dT primeru a PCR vody v celkovém objemu 10 μ l. Směs byla inkubována při 70 °C po dobu 10 min. Následně byly do směsi přidány 4 μ l 5x M-MLV pufru, 1 μ l dNTPs (10 mM), 0,4 μ l inhibitoru RNas – Rnazin, 0,4 μ l M-MLV reverzní transkriptasy a PCR voda do konečného objemu 20 μ l. Reverzní transkripce probíhala při 42 °C po dobu 3 hod. Inaktivace reverzní transkriptasy byla provedena zvýšením teploty na 70 °C a následnou inkubací 10 min.

Následně byla provedena PCR reakce s připraveným templátem cDNA pro amplifikaci transkriptu genu *MPK3* a transkriptu referenčního genu pro elongační faktor 1 α (*EF1 α*), který byl použit jako endogenní kontrola. Pro tyto reakce byly připraveny dvě reakční směsi. Reakční směs pro amplifikaci transkriptu *MPK3* obsahovala 0,25 μ l dream Taq polymerasy, 1,5 μ l 10x Dream Taq pufu, 0,3 μ l nukleotidů (10 mM), 0,5 μ M forward primeru (FP), 0,5 μ M reverse primeru (RP), 3 μ l cDNA templátu (4x zředěný) a doplněna vodou na objem 15 μ l. Pro amplifikaci referenčního genu byla použita stejná reakční směs lišící se v použitých primerech. Sekvence použitých primerů jsou uvedeny v Tab. 3. Podmínky pro PCR byly nastaveny podle Tab. 4.

Tab. 3 Sekvence primerů pro RT-PCR

MPK3_F	5'-GGTGGAAACTCACGGAGGAC-3'
MPK3_R	5'-AATACCAGGCATTCACGGGG-3'
EF1 α _F	5'-GATGCCACCACCCCAATA-3'
EF1 α _R	5'-TTGGGTCCTTCTTGCCACG-3'

Tab. 4 Nastavení cyklů RT-PCR

Krok cyklu	Fáze	Teplot a	Čas	Počet cyklů
1	Počáteční denaturace	95 °C	3 min	1
2	Denaturace	95 °C	30 s	40
3	Annealing primerů	50 °C	30 s	
4	Elongace	72 °C	1 min	
5	Finální elongace	72 °C	15 min	1

3.2.10 Izolace proteinů z rostlinného materiálu

Rostliny *A. thaliana* – Col-0, *mpk3-1* a *mpk3-5* (linie 1/14 a 1/17) kultivované *in vitro* po dobu 2 týdnů byly zmrazeny v tekutém dusíku a homogenizovány v 2 ml mikrozkuhavce na jemný prášek. Homogenizovaný rostlinný materiál byl zvážen na analytických vahách. Pro extrakci proteinů z připravených vzorků byl použit extrakční pufr E, do kterého byly těsně před použitím přidány inhibitory proteas a fosfatas. Ke každému vzorku byl napipetován extrakční pufr v poměru 1 μ l pufr E/1 mg materiálu. Vzorky byly promíchány špachtlí a ponechány 1 hod na ledu. Poté byly centrifugovány při 12 000x g, 10 min, 4 °C. Poté byl supernatant obsahující extrahované proteiny přepipetován do čistých mikrozkuhovek a koncentrace proteinů byla měřena spektrofotometricky při vlnové délce 595 nm za použití metody Bradfordové.

3.2.11 Denaturující polyakrylamidová elektroforéza (SDS-PAGE)

Připravené proteinové vzorky byly naředěny na koncentraci 1 mg/ml. Ke každému vzorku byl přidán 4x Laemmli vzorkovací pufr s 5% β -merkaptoetanolem. Proteiny ve vzorcích byly poté denurovány zahřátím na 95 °C po dobu 10 min.

Pro denaturující SDS-PAGE elektroforézu byl použit Gel Mini-PROTEAN® TGX Stain – Free™ Precast Gels. Polyakrylamidový gel byl vložen do stojánku a řádně upevněn. Stojánek s gelem byl vložen do elektroforetické vany. Prostor mezi gely společně s vanou byl vyplněn 1x elektrodovým pufrem. Do první jamky bylo napipetováno 5 μ l proteinového standardu (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards). Do následujících jamek bylo napipetováno 20 μ l (20 μ g) proteinového vzorku. SDS-PAGE elektroforéza probíhala za podmínek 180 V po dobu 40 min.

3.2.12 Western blot

Pro Western blot byla použita PVDF membrána, která byla rehydratována 10 s v metanolu. Po ukončení SDS-PAGE elektroforézy byl gel promyt 1x transferovým pufrem po dobu 10 min, stejně jako PVDF membrána. Pro přenos separovaných proteinů na membránu byla připravena komůrka, která byla vložena do vany a zalita 1x transferovým pufrem. Přenos proteinů na membránu probíhal nejdříve 10 min při 100 V, poté bylo napětí sníženo na 16 V a přenos probíhal přes noc.

Pro overení úspěšnosti přenosu, byla membrána obarvena pomocí barviva Ponceau S. Poté byla obarvená membrána krátce promyta v 1x TBS-T pufru a zdokumentována. Následně byla membrána znovu promývána až do úplného vymytí barviva.

Membrána byla dále blokována v roztoku 5% BSA a 5% sušeného mléka v 1x TBS - T. Blokování probíhalo po dobu 1 hod při pokojové teplotě. Dále byla membrána inkubována s primární protilátkou proti MPK3 (produkovanou v králíkovi) ředěnou 1:5000 v roztoku 4 % BSA v 1x TBS-T po dobu 1 hod při pokojové teplotě. Po uplynutí inkubační doby byla membrána 6x promývána v 1x TBS-T vždy po dobu 10 min. Následovala inkubace se sekundární protilátkou proti králičí primární protilátce (produkovanou v koze) konjugovanou s křenovou peroxidasou (HRP). Sekundární protilátka byla připravena ředěním 1:5000 v roztoku 1% BSA v 1x TBS-T. Inkubace probíhala po dobu 1,5 hod při pokojové teplotě. Poté byla membrána opět promývána 6 x 10 min v 1x TBS-T. Detekce proteinů na membráně byla zprostředkována pomocí reakce křenové peroxidasy s chemiluminiscenčním substrátem (ECL), se kterým byla membrána inkubována 1 min. Chemilumiscenční signál byl detekován pomocí dokumentačního zařízení ChemidocTM MP systém a výsledky byly vyhodnoceny v programu ImageLab.

3.2.13 Aplikace solného stresu na rostliny *Arabidopsis*

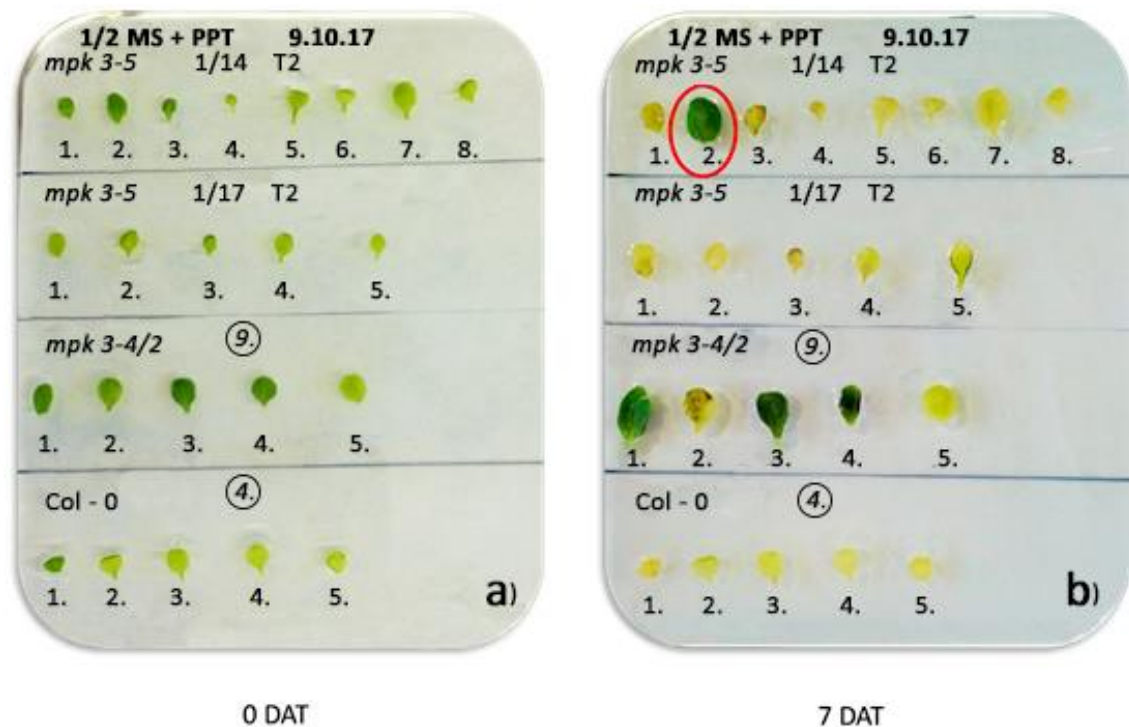
Semena Col-0 a homozygotních mutantů *mpk3-5* v T3 generaci (linie 1/14 a 1/17) byla vyseta na ½ MS médium. 3denní semenáčky byly poté přeneseny na ½ MS médium s přísávkem 150 mM NaCl a jejich kultivace ve fytotronu v horizontální poloze probíhala další dva týdny. Experiment byl proveden ve třech biologických replikách a zdokumentován po 7 a po 14 dnech.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem této práce bylo selektovat homozygotní rostliny *A. thaliana* v T2 generaci. Pro tyto účely byla použita semena dvou linií mutantů *mpk3-5* 1/14 a 1/17, které byly připraveny technologií CRISPR/Cas9 a nachází se u nich mutace v genu *MPK3*, a to konkrétně v 1. exonu genu. Výchozí rostliny byly heterozygotní mutanti v T2 generaci. Mutantní rostliny nesly selekční gen rezistence na fosfotricin (*bar*). Umístěním listů jednotlivých rostlin na médium obsahující tento herbicid tak bylo možné selektovat rostliny s inzerovaným konstruktem pro CRISPR/Cas9 obsahující právě gen *bar*. Vyselektované rostliny byly podrobeny sekvenaci, pomocí které byl zjištěn typ mutace v genu *MPK3*. Celkem byli identifikováni 2 homozygotní, 2 transheterozygotní a 1 heterozygotní mutant, u kterých byla dále zjišťována přítomnost transkriptu *MPK3* a proteinu MPK3. Homozygotní linie mutantů *mpk3-5* v T3 generaci byly dále studovány pro odolnost vůči osmotickému stresu solí, jelikož MPK3 je zapojena v signální dráze reagující právě na tento typ abiotického stresu (Kim *et al.*, 2011). Pro zjištění vlivu absence proteinu MPK3 na růst *A. thaliana* při stresových podmínkách, byly třídenní semenáčky umístěny na médium s přídavkem 150 mM NaCl.

4.1 Selektce mutantních rostlin *A. thaliana mpk3-5*

Selektce transformovaných semen mutantů *mpk3-5* generace T2 probíhala na ½ MS médiu s přídavkem 50 µM fosfotricinu. Pro tento experiment byla vybrána semena dvou heterozygotních linií generace T2 s označením 1/14 a 1/17. Aby stresovým podmínkám nebyla vystavena vždy celá rostlina, byly asi 14denním semenáčkům rostoucím na ½ MS médiu odstříhnuty listy, které byly přeneseny na ½ MS médium s obsahem herbicidu. Jako kontroly sloužily T-DNA inzerční mutant *mpk3-4/2* obsahující také gen rezistence *bar* (Sessions *et al.*, 2002) (pozitivní kontrola) a Col-0 (negativní kontrola). Výsledek selektce byl pozorován a zdokumentován po týdnu (Obr. 9). Rostliny, které přežily na selekčním médiu díky přítomnosti genu rezistence *bar* v genomu, byly podrobeny dalším experimentům.



Obr. 9 – Selektce rostlin *A. thaliana mpk3-5* generace T2 na $\frac{1}{2}$ MS médiu s přidavkem 50 μ M fosfinitricinu. a) Petriho miska v den přenosu listů na selekční médium (0 DAT) a po 7 dnech od přenosu (7 DAT) b). Vyselektovaná rostlina *mpk3-5* linie 1/14 s genem *bar* pro rezistenci na fosfinitricin je označena červeně Jako pozitivní kontrola sloužil T-DNA inzerční mutant *mpk3-4/2* s rezistencí na fosfinitricin a jako negativní kontrola byly použity rostliny Col-0.

4.2 Genotypizace mutantů *mpk3-5* z vybraných linií 1/14 a 1/17

Ze selektovaných rostlin byla izolována gDNA, která sloužila jako templát pro amplifikaci genu pro expresi proteinu MPK3. Na Obr. 10 je znázorněna amplifikovaná část genu *MPK3* o velikosti 406 bp s vyznačeným protospacerem a motivem přilehlým k prospaceru (PAM), před kterým by se měla nacházet požadovaná mutace způsobená programovatelnou nukleasou typu CRISPR/Cas9. Úspěšnost PCR reakce byla následně ověřena pomocí agarosové elektroforézy (Obr. 11) a přečištěné PCR produkty byly poté poslány na sekvencování. Zpracováním výsledků sekvenátoru v programu ApE byli určeni celkem 2 homozygotní (*mpk3-5* 1/14-7 a 1/17-5) a 3 heterozygotní nebo transheterozygotní mutanti (*mpk3-5* 1/14-2, 1/14-5 a 1/17-6). U homozygotů došlo k inzerci vždy jednoho nukleotidu před PAM motivem v sekvenci genu *MPK3*, což by mělo mít za následek posunutí čtecího rámce a vyřazení funkce genu *MPK3* (Obr. 12 a Obr. 14). U heterozygotů nebo transheterozygotů byly mutace rozsáhlejší. V analyzované sekvenci se vyskytovaly zejména záměny nukleotidů,

Porovnáním vzorků s původní sekvencí genu *MPK3* u ekotypu Col-0 byla u mutantu *mpk3-5* 1/17-5 generace T2 určena inserce thyminu (obr. 12). Graf ze sekvenace (Obr. 13) ukazuje, že tato mutace se vyskytuje na obou alelách analyzovaného genu *MPK3*, jedná se tedy o homozygotního mutantu. U mutantu *mpk3-5* 1/14-7 generace T2 byla porovnáním sekvencí kontrolní a selektované rostliny zjištěna inserce guaninu (Obr. 14). Podle grafu sekvenace se tato mutace rovněž vyskytuje na obou alelách (Obr. 15), a proto se opět jedná o homozygotního mutantu. Genová mutace u *mpk3-5* 1/17-6 generace T2 byla mnohem rozsáhlejší. Porovnáním sekvencí byly odhaleny substituce bází původních za báze jiné, také inserce a delece (Obr. 16). Mutant *mpk3-5* 1/14-2 generace T2 se od původní sekvenace *MPK3* genu lišil rovněž v substituci a inserci nukleotidů. Editací genu došlo navíc k rozsáhlé deleci 14 nukleotidů (Obr. 18). V případě mutantů u *mpk3-5* 1/17-6 a *mpk3-5* 1/14-2 lze z grafů ze sekvenace určit, že nedochází k překryvu píků, nelze však s přesností určit, zda se jedná o heterozygota nebo transheterozygota (Obr 17 a Obr. 19).

```

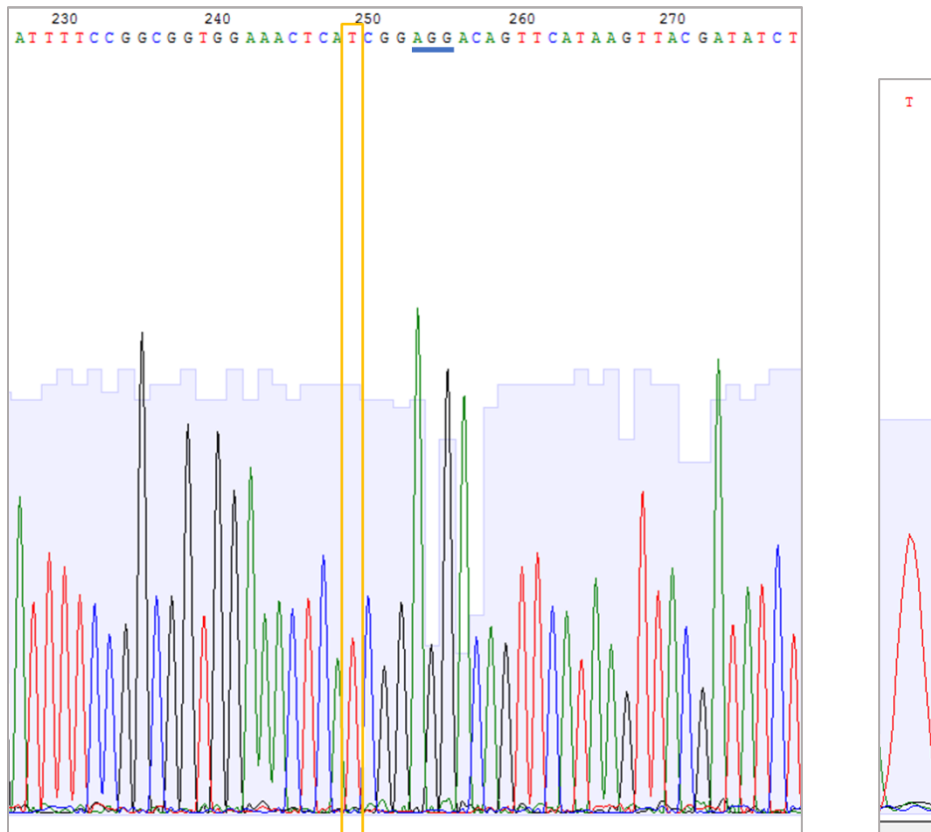
      *      *      *      *      *      *      *      *      *
101>gctcaatcctcaatctcagtcctctctgttgactccgactgttatataaaaccatacaaaatccttcagattcactacttcaaacctcaaagcaaccactg>200
70>GCTCAATCCTCAATCTCAGTCTCTCTGTTGACTCCGACTGTTATATAAAAACCATACAAAATACCTTCAGATTCACTACTTCAAACCTCAAAGCAACCCTG>169

      *      *      *      *      *      *      *      *      *
201>aatctcgactttgatcaattgagagagaaATGAACACCGGCGTGGCCAATACACGGATTTCCGGCGGTGGAAACTCA-CGGAGGACAGTTCATAAGTT>299
170>AATCTCGACTTTGATCAAITGAGAGAGAAATGAACACCGGCGTGGCCAATACACGGATTTCCGGCGGTGGAAACTCACGGAGGACAGTTCATAAGTT>269

      *      *      *      *      *      *      *      *      *
300>ACGATATCTTCGGTAGTTTATTTCGAGATCACATCTAAGTATCGTCTCCGATTATACCAATTGGTCGTGGAGCTTATGGAATCGTTTGgtatgttccctt>399
270>ACGATATCTTCGGTAGTTTATTTCGAGATCACATCTAAGTATCGTCTCCGATTATACCAATTGGTCGTGGAGCTTATGGAATCGTTTGGTATGTTT----->365

```

Obr. 12 Výsledek sekvenování mutantu *mpk3-5* 1/17-5 generace T2. Sekvence mutantu *mpk3-5* 1/17-5 (spodní sekvenace) byla programem ApE porovnána se sekvencí kontrolní rostliny Col-0 (horní sekvenace). V sekvenci mutantu *mpk3-5* 1/17-5 byla před PAM motivem (AGG, označen modře) odhalena inserce thyminu (T).



Obr. 13 Graf sekvenace mutanta *mpk3-5* 1/17-5 generace T2. Z grafu je patrné, že u mutanta *mpk3-5* 1/17-5 se píky v místě mutace (inzerce T, detail) před PAM motivem (AGG, označen modře) překrývají. Znamená to, že tato mutantní rostlina nese na obou alelách stejnou mutaci genu *MPK3*, a proto se jedná o homozygotního mutantu.

```

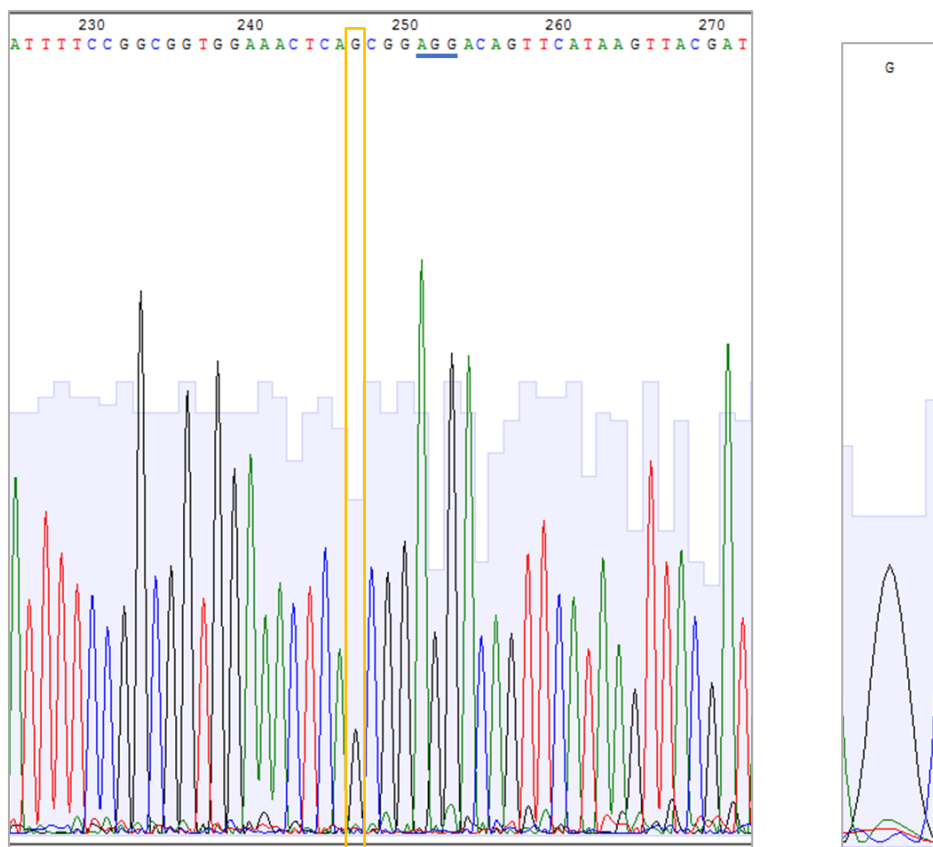
*      *      *      *      *      *      *      *      *      *
100>tgctcaatcctcaatctcagtcctctctgttgactccgactgttatataaaaccatacaaatccttcagattcactacttcaaacctcaaagcaaccact>199
67>TGCTCAATCCTCAATCTCAGTCTCTCTGTTGACTCCGACTGTTATATAAAACCATACAAATACCTTCAGATTCACTACTTCAAACCTCAAAGCAACCCT>166

*      *      *      *      *      *      *      *      *      *
200>gaatctcgactttgatcaattgagagagaaaATGAACACCGGCGGTGGCCAATACACGGATTTCCGCGCGGTGAAACTCA-CGGAGGACAGTTCATAAGT>298
167>GAATCTCGACTTTGATCAATTGAGAGAGAAAATGAACACCGGCGGTGGCCAATACACGGATTTCCGCGCGGTGAAACTCAGCGGAGGACAGTTCATAAGT>266

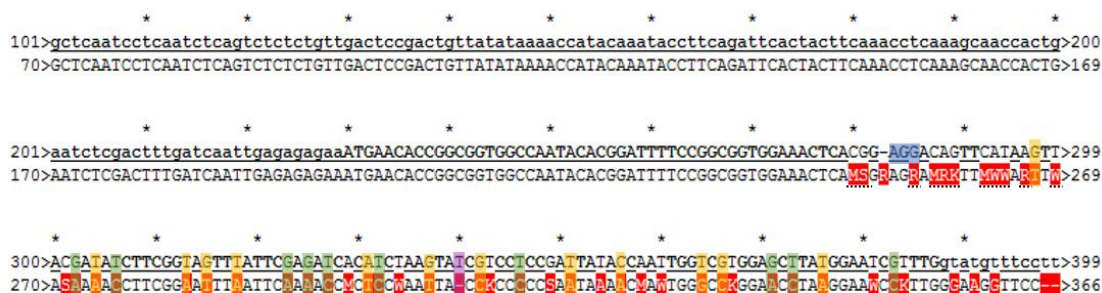
*      *      *      *      *      *      *      *      *      *
299>TACGATATCTTCGGTAGTTTATTTCGAGATCACATCTAAGTATCGTCTCCGATTATACCAATTGGTCGTGGAGCTTATGGAATCGTTTGgtatgttct>398
267>TACGATATCTTCGGTAGTTTATTTCGAGATCACATCTAAGTATCGTCTCCGATTATACCAATTGGTCGTGGAGCTTATGGAATCGTTTGGTATGTTCTT>366

```

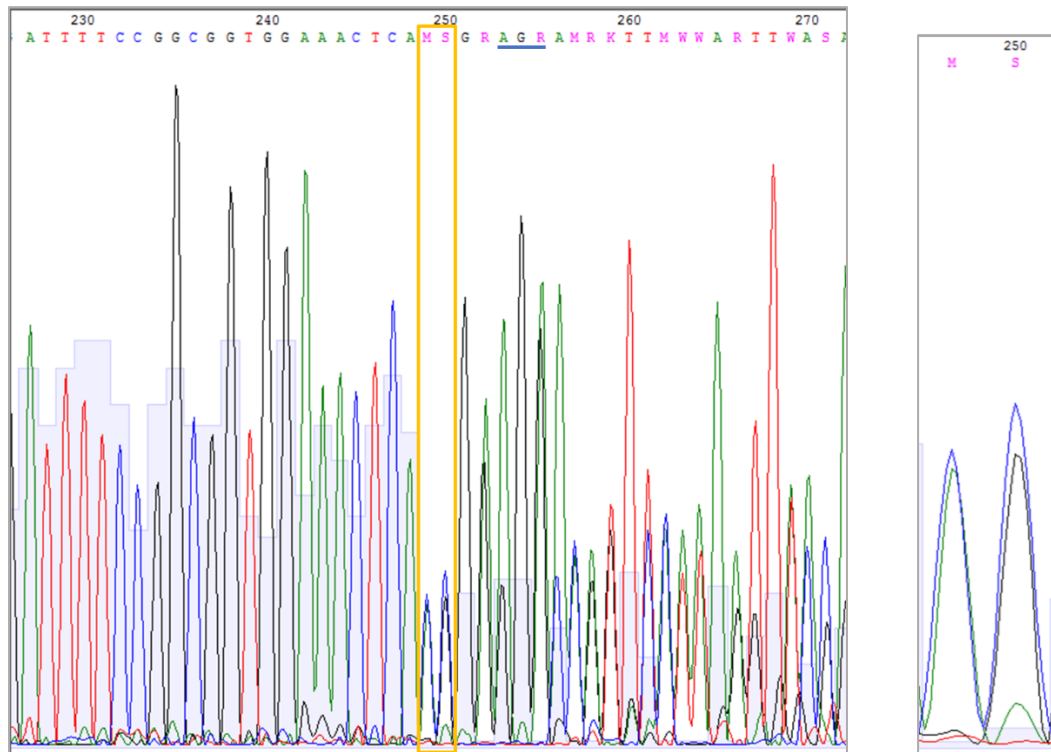
Obr. 14 Výsledek sekvencování mutanta *mpk3-5* 1/14-7 generace T2. Sekvence mutanta *mpk3-5* 1/14-7 (spodní sekvence) byla programem ApE porovnána se sekvencí kontrolní rostliny Col-0 (horní sekvence). V sekvenci mutanta *mpk3-5* 1/14-7 byla před PAM motivem (AGG, označen modře) odhalena inzerce guaninu (G).



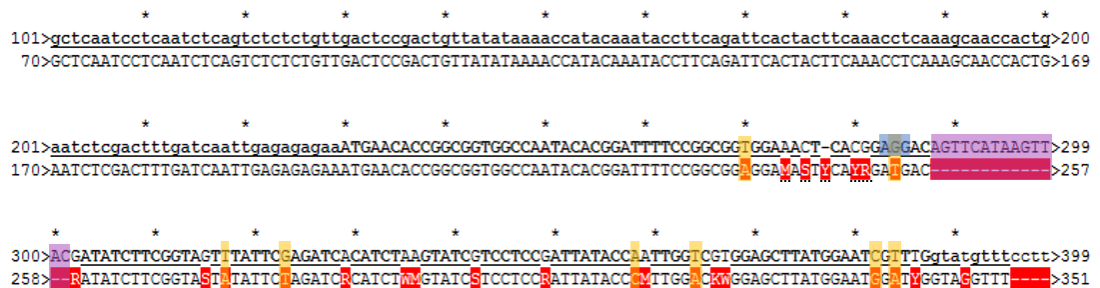
Obr. 15 Graf sekvenace mutanta *mpk3-5* 1/14-7 generace T2. Z grafu je patrné, že u mutanta *mpk3-5* 1/14-7 se píky v místě mutace (inzerce G, detail) před PAM motivem (AGG, označen modře) překrývají. Znamená to, že tato mutantní rostlina nese na obou alelách stejnou mutaci genu *MPK3*, a proto se jedná o homozygotního mutanta.



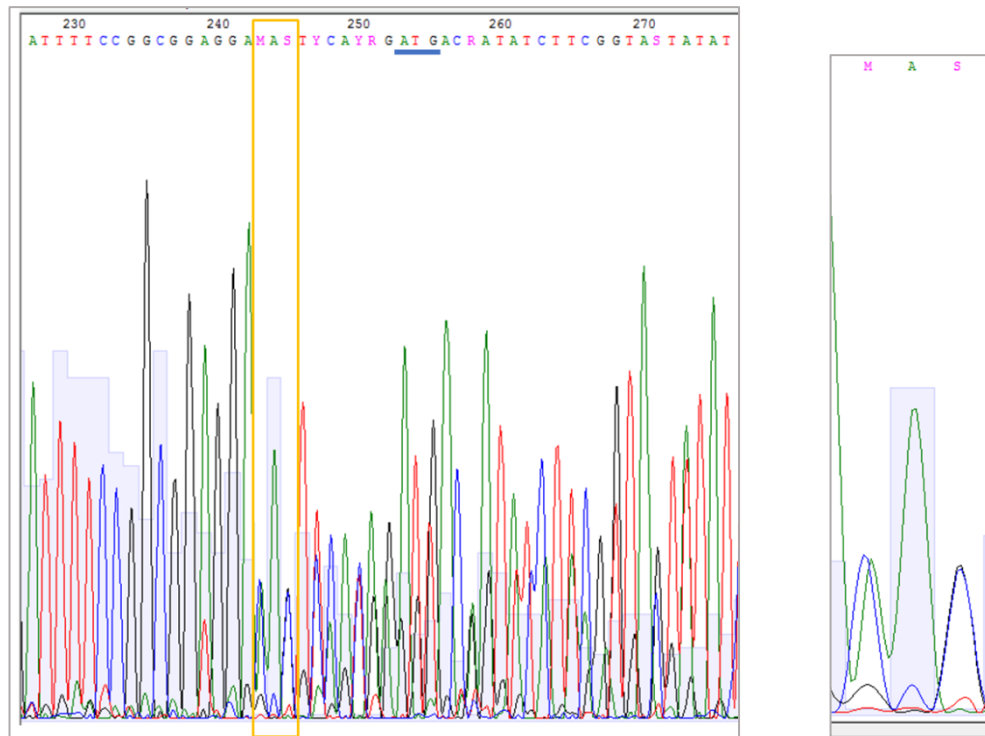
Obr. 16 Výsledek sekvencování mutanta *mpk3-5* 1/17-6 generace T2. Sekvence mutanta *mpk3-5* 1/17-6 (spodní sekvence) byla programem ApE porovnána se sekvencí kontrolní rostliny Col-0 (horní sekvence). V sekvenci mutanta *mpk3-5* 1/17-6 byly zaznamenány určité typy mutací před i za PAM motivem (AGG, označen modře). Jedná se převážně o substituce nukleotidů, jak tranzice, tak i tranzverze (tranzice - označena zeleně, tranzverze – označena oranžově). Některé substituce nukleotidových bází se nachází na obou alelách genu *MPK3*, nejde však o substituci vždy stejné báze, ale na každé alele se v místě takového typu mutace nachází odlišná báze. Tyto bodové mutace jsou označeny písmeny R (A nebo G), S (C nebo G), M (C nebo A), W (T nebo A), K (T nebo G), Y (C nebo T) (označeno černou přerušovanou čarou). V sekvenci mutanta *mpk3-5* 1/17-6 se nachází i inzerce A/G (červeně) a delece jednoho nukleotidu (fialově).



Obr. 17 Graf sekvenace mutanta *mpk3-5* 1/17-6 generace T2. Z grafu je patrné, že u mutanta *mpk3-5* 1/17-6 se píky v místě jednotlivých typů mutací nepřekrývají (detail). Znamená to, že tato mutantní rostlina nese na obou alelách genu *MPK3* jinou sekvenci, a proto se jedná o heterozygotního nebo transheterozygotního mutanta.



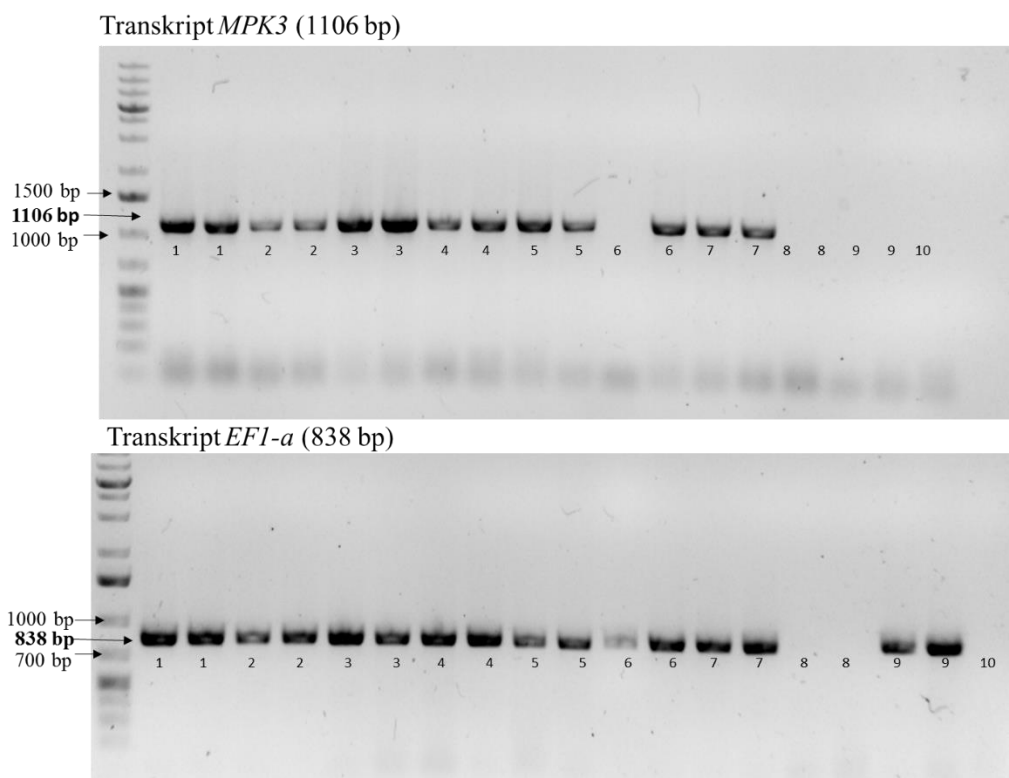
Obr. 18 Výsledek sekvencování mutanta *mpk3-5* 1/14-2 generace T2. Sekvence mutanta *mpk3-5* 1/14-2 (spodní sekvence) byla programem ApE porovnána se sekvencí kontrolní rostliny Col-0 (horní sekvence). V sekvenci mutanta *mpk3-5* 1/14-2 byly zaznamenány určité typy mutací před i za PAM motivem. Jedná se převážně opět o substituce nukleotidů, konkrétně transverze (oranžově) Některé substituce nukleotidových bází se nachází na obou alelách genu *MPK3*, nejde však o substituci vždy stejné báze, ale na každé alele se v místě takového typu mutace nachází odlišná báze. Tyto bodové mutace jsou označeny písmeny R (A nebo G), S (C nebo G), M (C nebo A), W (T nebo A), K (T nebo G), Y (C nebo T) (označeno černou přerušovanou čarou). V sekvenci mutanta *mpk3-5* 1/14-2 byla dále identifikována inserce C/T a delece 14 nukleotidů. (fialově).



Obr. 19 Graf sekvenace mutanta *mpk3-5* 1/14-2 generace T2. Z grafu je patrné, že u mutanta *mpk3-5* 1/14-2 se píky v místě jednotlivých typů mutací nepřekrývají (detail). Znamená to, že tato mutantní rostlina nese na obou alelách genu *MPK3* jinou sekvenci, a proto se jedná o heterozygotního nebo transheterozygotního mutanta.

4.3 Testování přítomnosti transkriptu *MPK3* u mutantů *mpk3-5*

Testování přítomnosti transkriptu *MPK3* u mutantních linií *mpk3-5* v generaci T2 byla provedena pomocí semikvantitativní RT-PCR. Rostlinný materiál z identifikovaných homozygotních (rostliny 1/17-5 a 1/14-7) a heterozygotních nebo transheterozygotních (rostliny 1/14-2, 1/14-5 a 1/17-6) mutantů *mpk3-5* byl použit pro izolaci celkové RNA, která byla následně přepsána do cDNA. Jako pozitivní kontrola byla použita rostlina ekotypu Col-0 a jako negativní kontrola T-DNA inzerční mutant *mpk3-1* s mutací v genu *MPK3*, který transkript nevytváří (Alonso *et al.*, 2003). Přítomnost transkriptu *MPK3* o velikosti 1106 bp byla podle očekání potvrzena u pravděpodobných heterozygotních mutantů *mpk3-5*. Nicméně bylo zjištěno, že transkript *MPK3* je syntetizován také u homozygotních linií mutantů *mpk3-5* (Obr. 20). Ke vzniku transkriptu *MPK3* u homozygotních mutantů *mpk3-5* dochází pravděpodobně z toho důvodu, že mutace je způsobena pouze jednonukleotidovou inzercí a kontrolní mechanismy buňky vyhodnotí tento transkript jako chybný až při samotné translaci zralého transkriptu v protein. Pro porovnání úrovně transkripce byl vybrán referenční gen pro elongační faktor 1- α (*EFL- α*), který patří mezi geny s konstitutivní expresí. Velikost jeho transkriptu je 838 bp (Obr. 20). PCR reakce pro každý vzorek cDNA byla provedena ve dvou opakováních.

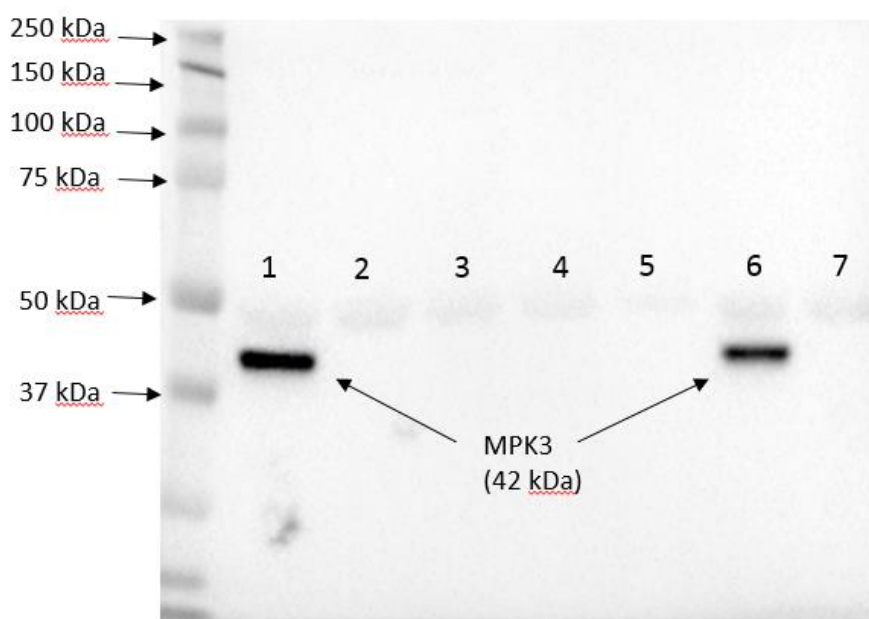


Obr. 20 Semikvantitativní RT-PCR pro testování přítomnosti transkriptu *MPK3* u mutantu *mpk3-5*. Transkript genu *MPK3* o velikosti 1106 bp se tvořil jak u homozygotních mutantů (vzorek č. 3 a 5), tak i u hetero- nebo transheterozygotních mutantů *mpk3-5* (vzorek č. 1, 2 a 4). Jako pozitivní kontrola sloužila Col-0 (vzorek č. 6 a 7) a jako negativní kontrola T-DNA inzerční mutant *mpk3-1* (vzorek č. 8 a 9). Pro porovnání úrovně transkripce byl použit provozní gen pro elongační faktor 1- α (*EFL1-a*), jehož transkript má velikost 838 bp. Označení vzorků: 1 - *mpk3-5* 1/17-6 HT nebo TT; 2 - *mpk3-5* 1/14-2 HT nebo TT; 3 - *mpk3-5* 1/17-5 HM; 4 - *mpk3-5* 1/14-5 HT nebo TT; 5 - *mpk3-5* 1/14-7 HM; 6,7 - Col-0; 8,9 - *mpk3-1*; 10 - H₂O; HM - homozygot, HT - heterozygot, TT - transheterozygot.

4.4 Testování přítomnosti proteinu MPK3 u mutantů *mpk3-5*

Ověření přítomnosti či nepřítomnosti proteinu MPK3 u mutantních linií *mpk3-5* bylo provedeno pomocí metody western blot. Proteinové vzorky byly připraveny opět ze získaných homozygotních (linie 1/17-5 a 1/14-7) a hetero- nebo transheterozygotních (linie 1/14-2, 1/14-5 a 1/17-6) mutantů v generaci T2. Proteinové vzorky byly separovány podle molekulové hmotnosti SDS-PAGE elektroforézou a následně přeneseny na PVDF membránu. Membrána byla inkubována s primární protilátkou proti MPK3 a následně byla použita sekundární protilátka konjugovaná s křenovou peroxidasou. Protein MPK3 o velikosti 42 kDa nebyl dle očekání detekován ani u jednoho z homozygotních mutantů *mpk3-5* (linie 1/17-5 a 1/14-7). Co se týče mutantů, kteří byli pomocí sekvenace určeni buď jako heterozygotní, nebo jako transheterozygotní rostliny, protein MPK3 byl detekován pouze u mutantu *mpk3-5* 1/17-

6, ale ne u mutantů *mpk3-5* 1/14-2 a 1/14-5 (Obr. 21). To znamená, že v případě mutantu *mpk3-5* 1/17-6 se jedná o heterozygotního mutantu s mutací pouze jedné alely genu *MPK3* a v případě mutantů *mpk3-5* 1/14-2 a 1/14-5 se jedná o transheterozygotní mutanty s odlišnou mutací na obou alelách genu *MPK3*, proto zde nedochází k proteosyntéze MPK3. Jako pozitivní kontrola byla opět použita rostlina ekotypu Col-0, u které dochází k tvorbě proteinu MPK3 přirozeně, a jako negativní kontrola byl použit T-DNA inzerční mutant *mpk3-1* (Alonso *et al.*, 2003), u něhož k tvorbě proteinu nedochází.



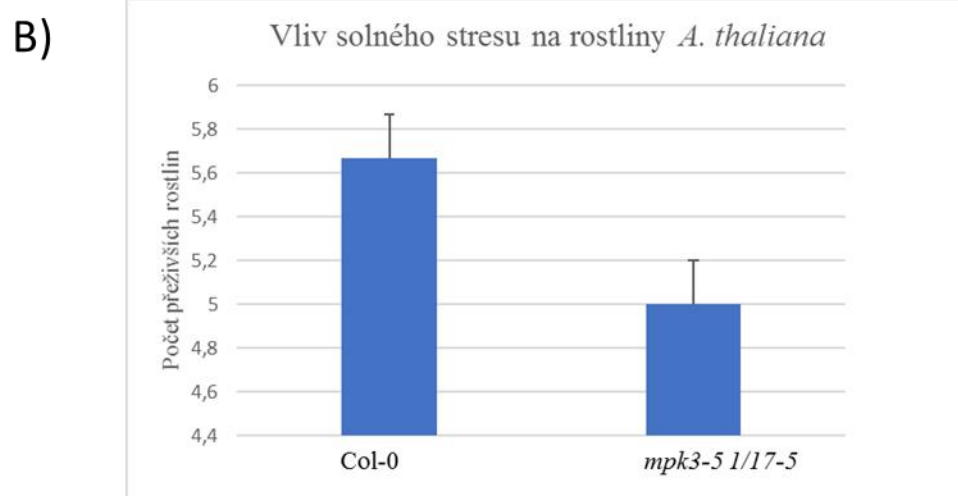
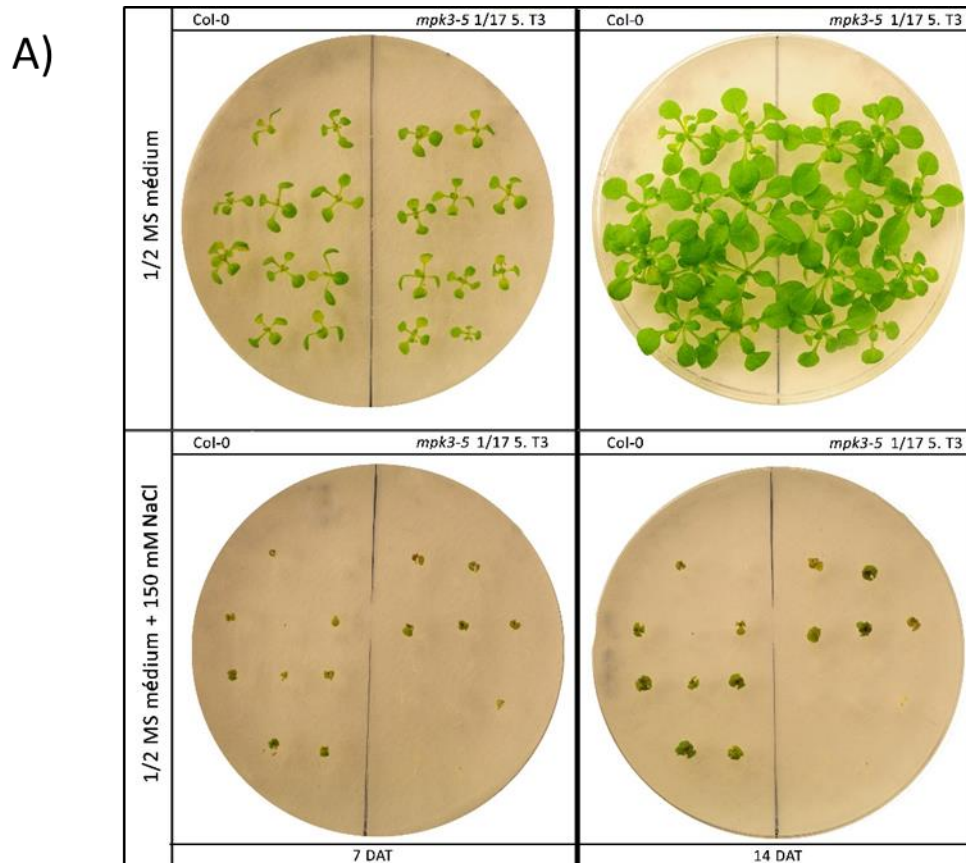
Obr. 21 Western blot pro testování přítomnosti proteinu MPK3 u mutantu *mpk3-5*. Protein MPK3 je přítomen pouze u heterozygotní rostliny *mpk3-5* 1/17-6 (vzorek č. 1). U vzorků č. 2 a 4 nebyl protein MPK3 detekován, proto byly tyto rostliny identifikovány jako transheterozygotní mutanty. U homozygotních mutantů *mpk3-5* (vzorky č. 3 a 5) nebyl protein MPK3 detekován tak, jak se předpokládalo. Rostlina ekotypu Col-0 (vzorek č. 6) sloužila jako pozitivní kontrola a T-DNA inzerční mutant *mpk3-1* (vzorek č. 7) jako negativní kontrola. Označení vzorků: 1 – *mpk3-5* 1/17-6 HT; 2 – *mpk3-5* 1/14-2 TT; 3 – *mpk3-5* 1/17-5 HM; 4 – *mpk3-5* 1/14-5 TT; 5 – *mpk3-5* 1/14-7 HM; 6 – Col-0; 7 – *mpk3-1*; HM – homozygot, HT – heterozygot, TT – transheterozygot.

4.5 Snížená rezistence mutantu *mpk3-5* na solný stres

Jak již bylo řečeno, MPK3 je součástí MAPK kaskády, která hraje důležitou roli při adaptaci rostliny na osmotický stres způsobený zvýšenou koncentrací soli (Droillard *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2011). Z tohoto důvodu nás zajímalo, jak bude mutant *mpk3-5* reagovat na přítomnost chloridu sodného v médiu. Pro zkoumání vlivu solného stresu na růst mutantů *mpk3-5* byli vybráni homozygotní mutanti *mpk3-5* linií 1/14-7 a 1/17-5 v generaci T3, u kterých byla prokázána absence proteinu MPK3. Po třech dnech kultivace na ½ MS médiu byly semenáčky přemístěny na ½ MS médium s přídavkem 150 mM NaCl a jejich kultivace pokračovala další 2 týdny. Pro kontrolu byly použity opět rostliny ekotypu Col-0. Rostliny Col-0 a *mpk3-5* vystavené solnému stresu vykazovaly celkově redukováný růst oproti kontrolním rostlinám rostoucím na ½ MS médiu bez přídavku chloridu sodného (Obr. 22 a Obr 23). Po jednom i po dvou týdnech bylo možné na kultivačním médiu s obsahem 150 mM NaCl pozorovat nižší množství přeživších semenáček obou linií mutantu *mpk3-5* v porovnání s Col-0 (Obr. 22 a 23), což znamená, že rostliny, u kterých není syntetizován protein MPK3, jsou citlivější na solný stres a vykazují vůči němu větší sensitivitu.

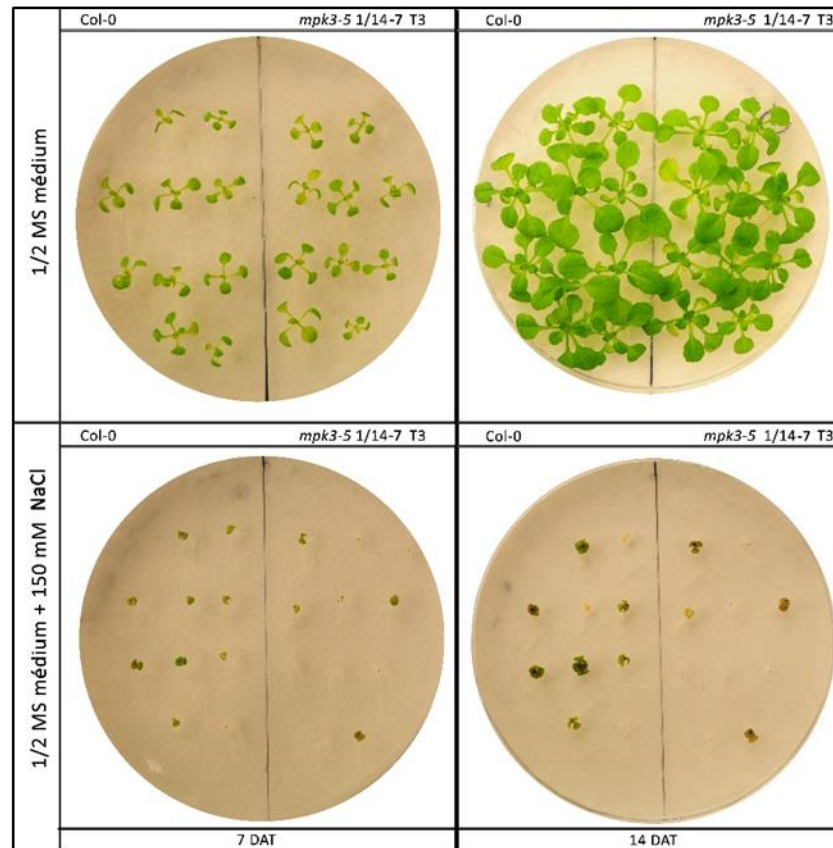
Je známo, že při aktivaci MAPK kaskády v odpovědi na solný stres MPK3 fosforyluje jako konečný substrát protein přenášející lipidy nazývaný AZI1 (Pitzschke *et al.*, 2014). Tato studie také ukazuje zvýšenou sensitivitu mutantu *mpk3-1* (SALK_151594; Alonso *et al.*, 2003) na médiu s přídavkem 250 mM NaCl již po třech dnech kultivace. Dále bylo zjištěno, že nadexprese *AZI1* v mutantovi *mpk3-1* vede ke zmírnění citlivosti mutantu *mpk3-1* k solnému stresu. Nicméně se zdá, že funkční MPK3 je vyžadována pro zajištění plně obranné funkce *AZI1*, neboť mutanti s funkčním *MPK3* genem byli při vystavení stejným stresovým podmínkám mnohem robustnější. Tento jev lze vysvětlit tak, že *AZI1* musí být fosforylován MPK3, aby se stal plně funkčním (Pitzschke *et al.*, 2014).

Výsledky experimentu této bakalářské práce s mutantem *mpk3-5* tak potvrzují diskutovanou studii od Pitzschke *et al.* (2014), která uvádí zvýšenou sensitivitu rostlin *Arabidopsis* při nepřítomnosti proteinu MPK3.

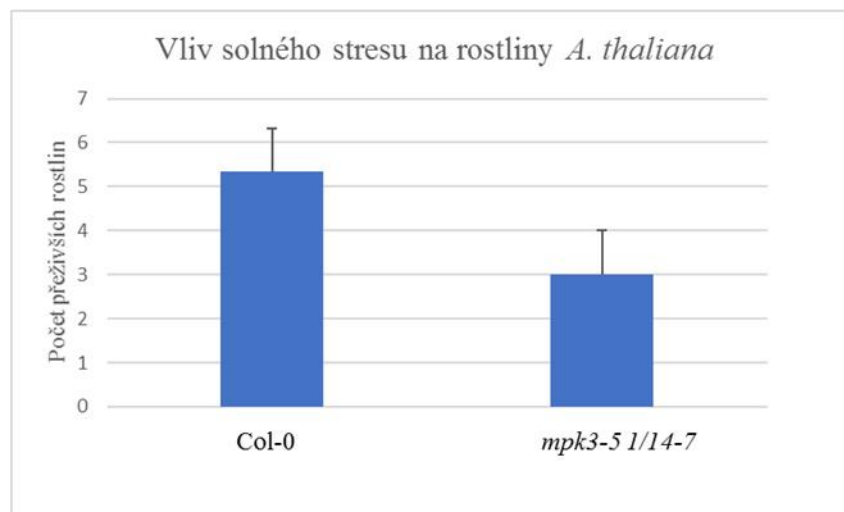


Obr. 22 Aplikace solného stresu na homozygotního mutantu *mpk3-5 1/17-5* generace T3. (A) Mutant *mpk3-5 1/17-5* vykazuje zvýšenou sensitivitu vůči solnému stresu (1/2 MS + 150 mM NaCl) v porovnání s kontrolními rostlinami Col-0. (B) Graf vyjadřující nižší počet přeživších rostlin mutantu *mpk3-5 1/17-5* na 1/2 MS médiu s obsahem 150 mM NaCl v porovnání s kontrolními rostlinami Col-0.

A)



B)



Obr. 23 Aplikace solného stresu na homozygotního mutantu *mpk3-5 1/14-7* generace T3. (A) Mutant *mpk3-5* linie 1/14-7 vykazuje zvýšenou sensitivitu vůči solnému stresu (1/2 MS + 150 mM NaCl) v porovnání s kontrolními rostlinami Col-0. (B) Graf vyjadřující nižší počet přeživších rostlin mutantu *mpk3-5 1/14-7* na 1/2 MS médiu s obsahem 150 mM NaCl v porovnání s kontrolními rostlinami Col-0.

5 ZÁVĚR

Teoretická část této práce byla zaměřena na téma mitogen-aktivované proteinkinasy (MAPKs), které jsou zapojeny ve vývoji rostlin a jejich adaptaci na stres. Podrobně popsána byla především MPK3 a její zapojení při abiotickém stresu, konkrétně při stresu osmotickém. Pozornost byla dále věnována nástrojům pro editaci genomu eukaryotních organismů. Pomocí uměle navržených nukleas lze do DNA vnášet inserce, delece nebo nahrazovat původní sekvence za jiné. Tyto změny jsou prováděny za účelem výzkumu funkce genů a jejich zapojení do procesů v organismu nebo pro zlepšení výnosu a kvality zemědělských plodin. Pozornost byla upřena hlavně na systém CRISPR/Cas9, pomocí kterého byly připraveny linie mutanta *Arabidopsis mpk3-5* s knock-out mutací genu *MPK3* studovaných v této bakalářské práci.

Selekcí dvou linií rostlin *A. thaliana mpk3-5* v T2 generaci a následnou sekvenací byli určeni celkem 2 homozygotní a 3 heterozygotní nebo transheterozygotní mutanti *mpk3-5*. Metodou semikvantitativní RT-PCR byla zjištěna přítomnost transkriptu *MPK3* u všech mutantních linií, i když byla přítomnost očekávána pouze u heterozygotních mutantů. Metodou western blot však bylo zjištěno, že k tvorbě tohoto proteinu u homozygotních rostlin skutečně nedochází. Pomocí této metody pak bylo také možné rozlišit jednoho heterozygotního mutantu, který vytváří protein MPK3, od dvou transheterozygotních mutantů, kteří protein MPK3 nevytváří.

Na základě těchto výsledků se dá předpokládat, že v buňkách sice probíhá transkripce mutovaného genu *MPK3*, ale produkt translace je kontrolními mechanismy buňky následně degradován a nedochází tak k proteosyntéze. Mutace genu *MPK3* v rostlinách *A. thaliana mpk3-5* zprostředkovaná systémem CRISPR/Cas9 tak byla potvrzena.

Pro zjištění vlivu solného stresu na *Arabidopsis* byli vybráni homozygotní linie mutanta *mpk3-5* v T3 generaci. Vystavením rostlin 150 mM NaCl přítomném v kultivačním médiu došlo k celkové redukci růstu rostlin oproti kontrolním podmínkám. Mutanti *mpk3-5* však vykazovali nižší míru přeživších rostlin v porovnání s kontrolními rostlinami Col-0. Z výsledků tohoto experimentu se dá předpokládat, že nepřítomnost MPK3 má vliv na zvýšení citlivosti mutantů *mpk3-5* při hyperosmotickém stresu solí, tudíž MPK3 hraje pravděpodobně pozitivní roli při vystavení rostlin solnému stresu.

6 LITERATURA

- Achard P., Cheng H., De Grauwe L., Decat J., Schoutteten H., Moritz T., Van Der Straeten D., Peng J., Harberd N. P. (2006) Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science* 311: 91–94.
- Alonso M. J., Stepanova A. N., Leisse J. T., Kim J. C., Chen H., Shinn P., Stevenson K. D., Zimmerman J., Barajas P., Cheuk R., Gadrinab C., Heller C., Jeske A., Koesema E., Meyers C. C., Parker H., Prednis L., Ansari Y., Choy N., Deen H., Geralt M., Hazari N., Hom E., Karnes M., Mulholland C., Ndubaku R., Schmidt I., Guzman P., Aguilar-Henonin L., Schmid M., Weigel D., Carter D. E., Marchand T., Risseeuw E., Brogden D., Zeko A., Crosby W. L., Berry C. C., Ecker J. R. (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301: 653–657.
- An G., Watson B. D., Chiang C. C. (1986) Transformation of Tobacco, Tomato, Potato, and *Arabidopsis thaliana* Using a Binary Ti Vector System. *Plant Physiology* 81: 301–305.
- Andersson M., Turesson H., Nicolica A., Fält A. S., Samuelsson M., Hofvander P. (2017). Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts. *Plant Cell Reports* 36: 117–128.
- Antunes M S., Smith J. J., Jantz D., Medford J. I. (2012) Targeted DNA excision in *Arabidopsis* by a re-engineered homing endonuclease. *BMC Biotechnology* 12: 86.
- Asai T., Tena G., Plotnikova J., Willmann M. R., Chiu W. L., Gomez-Gomez L., Boller T., Ausubel F. M., Sheen, J. (2002) MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* 415: 977–983.
- Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., Romero D. A., Horvath P. (2007) CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315: 1709-1712.
- Bergmann D. C., Lukowitz W., Somerville C. R. (2004) Stomatal development and pattern controlled by a MAPKK kinase. *Science* 304: 1494–1497.
- Blomster T., Salojärvi J., Sipari N., Brosché M., Ahlfors R., Keinänen M., Overmyer K., Kangasjärvi J. (2011). Apoplastic Reactive Oxygen Species Transiently Decrease Auxin Signaling and Cause Stress-Induced Morphogenic Response in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 157: 1866–1883.
- Bowler C., Fluhr R. (2000) The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance. *Trends Plant Science* 5: 241-246.
- Boch J., Scholze H., Schornack S., Landgraf A., Hahn S., Kay S., Lahaye T., Nickstadt A., Bonas, U. (2009) Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* 326: 1509–1512.
- Brooks C., Nekrasov V., Lippman Z. B., Van Eck J. (2014). Efficient gene editing in tomato in the first generation using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated9 system. *Plant Physiology* 166: 1292–1297.
- Colcombet J, Hirt H. (2008) *Arabidopsis* MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochemical Journal* 413:217–26.
- Colleaux L., d'Auriol L., Betermier, M., Cottarel, G., Jacquier, A., Galibert, F. and Dujon, B. (1986) Universal code equivalent of a yeast mitochondrial intron reading frame is expressed into *E. coli* as a specific double strand endonuclease. *Cell* 44: 521–533.
- Deinlein U., Stephan A. B., Horie T., Luo W., Xu G., Schroeder J.I. (2014) Plant salt-tolerance mechanisms. *Trends Plant Science* 19: 371–379.
- D'Halluin K., Vanderstraeten C., Van Hulle J., Rosolowska J., Van Den Brande I., Pennewaert A., D'Hont K., Bossut M., Jantz D., Ruitter R., Broadhvest J. (2013). Targeted molecular trait stacking in cotton through targeted double-strand break induction. *Plant Biotechnology Journal* 11: 933–941.
- Droillard M. J., Boudsocq M., Barbier-Brygoo H., Lauriere C. (2004) Involvement of MPK4 in osmotic stress response pathways in cell suspensions and plantlets of *Arabidopsis thaliana*: activation by hypoosmolarity and negative role in hyperosmolarity tolerance. *FEBS Letters* 574: 42–8.

- Feldmann K. A., Marks M. D. (1987) Agrobacterium-mediated transformation of germinating seeds of *Arabidopsis thaliana*: a non-tissue culture approach. *Molecular Genetics and Genomics* 208: 1–9.
- Ferrell J. E. Jr. (2000) What do scaffold proteins really do? *Science's STKE* 2000: pp. pe1.
- Fraire-Velázquez S., Rodríguez-Guerra R., Sánchez-Calderón L. (2011) Abiotic and Biotic Stress Response Crosstalk in Plants-Physiological, Biochemical and Genetic Perspectives. *InTech* pp. 1–26.
- Fujita M., Fijita Y., Noutoshi Y., Takahashi F., Narusaka Y., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (2006) Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: A current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current Opinon in Plant Biology* 9: 436–442.
- Gaj T., Gersbach C. A., Barbas C. F. (2013). ZFN, TALEN and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in Biotechnology*, 31: 397–405.
- Gao H., Smith J., Yang M., Jones S., Djukanovic V., Nicholson M. G., West A., Bidney D., Falco S. C., Jantz D., Lyznik L. A. (2010) Heritable targeted mutagenesis in maize using a designed endonuclease. *Plant Journal* 61: 176–187.
- Golldack, D., Li, C., Mohan, H., Probst, N. (2014) Tolerance to drought and salt stress in plants: unraveling the signaling networks. *Frontiers in Plant Science* 5: 151.
- Gudesblat G. E., Iusem N. D., Morris, P. C. (2007), Guard cell-specific inhibition of *Arabidopsis MPK3* expression causes abnormal stomatal responses to abscisic acid and hydrogen peroxide. *New Phytologist* 173: 713–721.
- Chardin C., Schenk S.T., Hirt H., Colcombet J., Krapp A. (2017) Review: Mitogen-Activated Protein kinases in nutritional signaling in *Arabidopsis*. *Plant Science* 260: 101-108.
- Ichimura K., Mizoguchi T., Irie K., Morris P., Giraudat J., Matsumoto K., Shinozaki K. (1998) Isolation of ATMEKK1 (a MAP kinase kinase kinase)-interacting proteins and analysis of a MAP kinase cascade in *Arabidopsis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 253: 532–543.
- Ichimura K., Shinozaki K., Tena G., Sheen J., Henry Y., Champion A., Kreis M., Zhang S., Hirt H., Wilson C., Heberle-Bos E., Ellis B. E., Morris P. C., Innes R. W., Ecker J. R., Scheel D., Klessig D. F., Machida Y., Mundy J., Ohashi Y., Walker J. C. (2002) Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends in Plant Science* 7: 301-308.
- Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. (1987) Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product, *Journal of Bacteriology* 169: 5429-5433.
- Jacquier A., Dujon B. (1985) An intron-encoded protein is active in a gene conversion process that spreads an intron into a mitochondrial gene. *Cell* 41: 383–394.
- Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer, M. (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337: 816–821.
- Karkute S. G., Singh A. K., Gupta O. P., Singh P. M., Singh, B. (2017). CRISPR/Cas9 Mediated Genome Engineering for Improvement of Horticultural Crops. *Frontiers in Plant Science* 8: 1635.
- Keyse S. M. (2000). Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signaling. *Current Opinion in Cell Biology* 12: 186-192.
- Kim Y.G., Cha, J. and Chandrasegaran, S. (1996) Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 1156–1160.
- Kim S. H., Woo D. H., Kim J. M., Lee S. Y., Chung W. S., Moon Y. H. (2011) *Arabidopsis* MKK4 mediates osmotic-stress response via its regulation of MPK3 activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 412: 150–154.
- Kim J. M., Woo D. H., Kim S. H., Lee S. Y., Park H. Y., Seok H. Y., Chung W. S., Moon Y. H. (2012) *Arabidopsis* MKKK20 is involved in osmotic stress response via regulation of MPK6 activity. *Plant Cell Reports* 31:217–224.
- Klap C., Yeshayahou E., Bolger A. M., Arazi T., Gupta S. K., Shabtai S., Usadel B., Salts Y., Barg R. (2017). Tomato facultative parthenocarpy results from *SIAGAMOUS-LIKE 6* loss of function. *Plant Biotechnology Journal* 15: 634–647.

- Klosgen R. B., Gierl A., Schwarzsommer Z., Saedler H. (1986). Molecular analysis of the waxy locus of *zea-mays*. *Molecular Genetics and Genomics* 203: 237–244.
- Koornneef M., Rolff E., Spruit C. J. P. (1980) Genetic control of light-induced hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Z Pflanzenphysiol* 106: 147–160.
- Koornneef, M., van Eden, J., Hanhart, C.J., Slam, P., Braaksma, F.J. and Feenstra, W.J. (1983) Linkage map of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Heredity* 74: 265-272.
- Kovtun Y., Chiu W. L., Tena G., Sheen J. (2000): Functional analysis of oxidative stressactivated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 14: 2940-2945.
- Krämer U. (2015) Planting molecular functions in an ecological context with *Arabidopsis thaliana*. *eLife* 4: e06100.
- Kumari A., Jewaria P. K., Bergmann D. C., Kakimoto T. (2014). *Arabidopsis* Reduces Growth Under Osmotic Stress by Decreasing SPEECHLESS Protein. *Plant and Cell Physiology*, 55: 2037–2046.
- Laibach F. (1943) *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. als Objekt für genetische und entwicklungsphysiologische Untersuchungen. *Botanical Archive* 44: 439–455.
- Laloi C., Appel K., Danon A. (2004) Reactive oxygen signalling: The latest news. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 323–328.
- Lamb B. M., Mercer A. C., Barbas C. F. (2013) Directed evolution of the TALE N-terminal domain for recognition of all 5' bases, *Nucleic Acids Research* 41: 9779–9785.
- Lawrenson T., Shorinola O., Stacey N., Li C., Ostergaard L., Patron N., Uauy C., Harwood W. (2015). Induction of targeted, heritable mutations in barley and *Brassica oleracea* using RNA-guided Cas9 nuclease. *Genome Biology* 16: 258.
- Lee J. S., Ellis B. E. (2007) *Arabidopsis* MAPK phosphatase 2 (MKP2) positively regulates oxidative stress tolerance and inactivates the MPK3 and MPK6 MAPKs. *The Journal of Biological Chemistry*. 282: 25020–25029.
- Levchenko A., Bruck J., Sternberg P. W. (2000). Scaffold proteins may biphasically affect the levels of mitogen-activated protein kinase signaling and reduce its threshold properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 5818–5823.
- Li T., Huang S., Jiang W. Z., Wright D., Spalding M. H., Weeks D. P., Yang B. (2011). TAL nucleases (TALNs): hybrid proteins composed of TAL effectors and *FokI* DNA-cleavage domain. *Nucleic Acids Research*, 39: 359–372.
- Li T., Liu B., Spalding M. H., Weeks D. P., Yang B. (2012) High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. *Nature Biotechnology* 30: 390–392.
- Liu X. M., Kim K. E., Kim K. C., Nguyen X. C., Han H. J., Jung M. S., Kim H. S., Kim S. H., Park H. Ch., Yun D. J., Chung W. S. (2010) Cadmium activates *Arabidopsis* MPK3 and MPK6 via accumulation of reactive oxygen species. *Phytochemistry* 71: 614–618.
- Lloyd A. M., Barnason A. R., Rogers S. G., Byrne M. C., Fraley R. T., Horsch R. B. (1986) Transformation of *Arabidopsis thaliana* with *Agrobacterium tumefaciens*. *Science* 234: 464–466.
- Lloyd A., Plaisier C. L., Carroll D., Drews G. N. (2005) Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102: 2232–2237.
- MacAlister C. A., Ohashi-Ito K., Bergmann D. C. (2007) Transcription factor control of asymmetric cell divisions that establish the stomatal lineage. *Nature* 445: 537–540.
- Makarova K. S., Wolf Y. I., Alkhnbashi O. S., Costa F., Shah S. A., Saunders S. J., Barrangou R., Brouns S. J. J., Charpentier E., Haft D. H., Horvath P., Moineau S., Mojica F. J. M., Terns R. M., White M. F., Yakunin A. F., Garrett R. A., van der Oost J. (2015) An updated evolutionary classification of CRISPR – Cas systems. *Nature Reviews Microbiology* 13: 722– 736.
- Meinke D. W., Sussex I. M. (1979) Embryo-lethal mutants of *Arabidopsis thaliana*: a model system for genetic analysis of plant embryo development. *Developmental Biology* 72: 50–61.
- Meinke D., Cherry J., Dean C., Rounsley S., Koornneef M. (1998) *Arabidopsis thaliana*: A Model Plant for Genome Analysis. *Science* 282: 662-682.
- Meng X., Zhang S. (2013) MAPK cascades in plant disease resistance signaling. *Annual Review of Phytopathology* 51: 245–266.

- Meyerowitz E. M., Pruitt R. E. (1985) *Arabidopsis thaliana* and plant molecular genetics. *Science* 229: 1214–1218.
- Meyerowitz E. M. and Somerville C. R. (1994) *Arabidopsis*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Miles G. P., Samuel M. A., Ellis B. E. (2009) Suppression of MKK5 reduces ozone induced signal transmission to both MPK3 and MPK6 and confers increased ozone sensitivity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling & Behavior* 4: 687–692.
- Mizoguchi T., Irie K., Hirayama T., Hayashida N., Yamaguchi-Shinozaki K., Matsumoto K., Shinozaki K. (1996). A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold, and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 765–769.
- Moscou M., Bogdanove, A. (2009) A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science* 326: 1501.
- Nadeau J. A., Sack F. D. (2002) Stomatal development in *Arabidopsis*. *Arabidopsis Book* 1: e0066.
- Nakagami H., Pitzschke A., Hirt H. (2005). Emerging MAP kinase pathways in plant stress signalling. *Trends in Plant Science* 10: 339–346.
- Nakanishi H., Obaishi H., Satoh A., Wada M., Mandai K., Satoh K., Nishioka H., Matsuura Y., Mizoguchi A., Takai, Y. (1997). Neurabin: A Novel Neural Tissue-specific Actin Filament-binding Protein Involved in Neurite Formation. *The Journal of Cell Biology* 139: 951–961.
- Nekrasov V., Wang C., Win J., Lanz C., Weigel D., Kamoun S. (2017). Rapid generation of a transgene free powdery mildew resistant tomato by genome deletion. *Science Reports* 7: 48.
- Nemudryi A. A., Valetdinova K. R., Medvedev S. P., Zakian, S. M. (2014). TALEN and CRISPR/Cas Genome Editing Systems: Tools of Discovery. *Acta Naturae* 6: 19–40.
- Nocito F. F., Pirovano L., Cocucci M., Sacchi G. A. (2002) Cadmium-induced sulphate uptake in maize roots. *Plant Physiology* 129, 1872–1879.
- Nyitrai P., Bóka K., Gáspár L., Sárvári É., Lenti K., Keresztes Á. (2003) Characterization of the stimulating effect of low-dose stressors in maize and bean seedlings. *Journal of Plant Physiology* 160: 1175–1183.
- Pearson G., Robinson F., Beers Gibson T., Xu B. E., Karandikar M., Berman K., Cobb M. H. (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine Reviews* 22: 153–183.
- Pedley K. F., Martin G. B. (2005). Role of mitogen-activated protein kinases in plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 541–547.
- Pillitteri L. J., Sloan D. B., Bogenschutz N. L., Torii K. U. (2007) Termination of asymmetric cell division and differentiation of stomata. *Nature* 445: 501–505.
- Pillitteri L. J., Torii K. U. (2012) Mechanisms of stomatal development. *Annual Review of Plant Biology* 63: 591–614.
- Pillitteri L. J., Dong J. (2013) Stomatal development in *Arabidopsis*. *Arabidopsis Book* 11: e0162.
- Pitzschke A., Datta S., Persak H. (2014) Salt Stress in *Arabidopsis*: Lipid Transfer Protein AZI1 and Its Control by Mitogen-Activated Protein Kinase MPK3. *Molecular Plant* 7: 722–738.
- Plotnikov A., Zehorai E., Procaccia S., Seger R. (2011) The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1813: 1619–1633.
- Puchta H., Dujon B., Hohn B. (1993) Homologous recombination in plant cell is enhanced by *in vivo* induction of double-strand breaks into DNA by site-specific endonuclease. *Nucleic Acids Research* 21: 5034–5040.
- Puchta H., Fauser F. (2014) Synthetic nucleases for genome engineering in plants: prospects for a bright future. *Plant Journal* 78: 727–741.
- Raboy V., Peterson K., Jackson C., Marshall J. M., Hu G., Saneoka H., Bregitzer P. (2015). A Substantial Fraction of Barley (*Hordeum vulgare* L.) Low Phytic Acid Mutations Have Little or No Effect on Yield across Diverse Production Environments. *Plants* 4: 225–239.
- Rédei G. P. (1970). *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. A review of the genetics and biology. *Bibliography Genetics* 20: 1–151.F
- Řepková J. (2007) Huseníček rolní a současný výzkum rostlinného genomu. *Živa* 1: 5–7.

- Saxena, M., Mustelin, T. (2000). Extracellular signals and scores of phosphatases: all roads lead to MAP kinase. *Seminars in Immunology* 12: 387-396.
- Sessions A, Burke E, Presting G, Aux G., McElver J., Patton D., Dietrich B., Ho P., Bacwaden J., Ko C., Clarke J. D., Cotton D., Bullis D., Snell J., Miguel T, Hutchison D., Kimmerly B., Mitzel T., Katagiri F., Glazebrook J., Law M., Goff, S. A. (2002) A High-Throughput *Arabidopsis* Reverse Genetics System. *The Plant Cell* 14: 2985-2994.
- Shan Q., Wang Y., Chen K., Liang Z., Li J., Zhang, Y., Liu J., Voytas D. F., Zheng X., Zhang Y., Gao C. (2013). Rapid and Efficient Gene Modification in Rice and Brachypodium Using TALENs. *Molecular Plant*, 6: 1365–1368.
- Sharp, R. E., Davies, J. (1989) Regulation of growth and development of plants growing with a restricted supply of water. *Plants Under Stress* pp.71-94.
- Shaw A. S., Filbert E. L. (2009) Scaffold proteins and immune-cell signalling. *Nature Reviews Immunology* 9: 47–56
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. (2000) Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 217-223.
- Schenk P. M., Kazan K., Manners J. M., Anderson J. P., Simpson R. S., Wilson I. W., Somerville S. C., Maclean D. J. (2003) Systemic gene expression in *Arabidopsis* during an incompatible interaction with *Alternaria brassicicola*. *Plant Physiology* 132: 999–1010.
- Schornack S., Meyer A., Römer P., Jordan T, Lahaye T, J. (2006) Gene-for-gene-mediated recognition of nuclear-targeted AvrBs3-like bacterial effector proteins. *Plant Physiology* 163. 256–272.
- Smith J., Bibikova M., Whitby F.G., Reddy A.R., Chandrasegaran S., Carroll D. (2000) Requirements for double-strand cleavage by chimeric restriction enzymes with zinc finger DNA-recognition domains. *Nucleic Acids Research* 28: 3361–3369.
- Somerville C. R., Ogren W. L. (1979) A phosphoglycolate phosphatase-deficient mutant of *Arabidopsis*. *Nature* 280: 833–836.
- Song G., Jia M., Chen K., Kong K., Khattak B., Xie C. Li A., Mao L. (2016) CRISPR/Cas9: A powerful tool for crop genome editing. *The Crop Journal* 4: 75-82.
- Spoel S. H., Dong X. (2008) Making sense of hormone crosstalk during plant immune response. *Cell Host and Microbe*. 3: 348–351.
- Suarez-Rodriguez M. C., Adams-Phillips L., Liu Y., Wang H., Su S. H., Jester P. J., Zhang S., Bent A. F., Krysan P. J. (2007) MEKK1 is required for flg22-induced MPK4 activation in *Arabidopsis* plants. *Plant Physiology* 143: 661–669.
- Suarez-Rodriguez M. C., Petersen M., Mundy J. (2010) Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* 61: 621–649.
- Sun Y., Thompson M., Lin G., Butler H., Gao Z., Thornburgh S., Yau K., Smith D. A., Shukla V. K. (2007) Inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase from maize: Molecular and biochemical characterization. *Plant Physiology* 144: 1278–1291.
- Stevenson-Paulik J., Bastidas R. J., Chiou S. T., Frye R. A., York J. D. (2005) Generation of phytate-free seeds in *Arabidopsis* through disruption of inositol polyphosphate kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102: 12612–12617.
- Teige M., Scheikl E., Eulgem T., Doczi R., Ichimura K., Shinozaki K., Dangl J. L., Hirt H. (2004) The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in *Arabidopsis*. *Molecular Cell* 15: 141–152
- Tena G., Asai T., Chiu, W. L., Sheen J. (2001) Plant mitogenactivated protein kinase signaling cascades. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 392–400.
- Townsend J. A., Wright D. A., Winfrey R. J., Fu F., Maeder M. L., Joung J. K., Voytas D. F. (2009) High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases. *Nature* 459: 442–445.
- Voytas D. F. (2013) Plant genome engineering with sequence-specific nucleases. *Annual Review of Plant Biology* 64: 327–350.
- Wang X. Q., Ullah H., Jones A. M., Assmann S. M. (2001). G protein regulation of ion channels and abscisic acid signaling in *Arabidopsis* guard cells. *Science* 292: 2070–2072.

- 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*. *The Plant Cell* 19: 63-73.
- Wang Y., Cheng X., Shan Q., Zhang Y., Liu J., Gao C., Qiu J. L. (2014). Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nature Biotechnology* 32: 947–952.
- Wendt T., Holm P. B., Starker C. G., Christian M., Voytas D. F., Brinch-Pedersen H., Holme I. B. (2013) TAL effector nucleases induce mutations at a pre-selected location in the genome of primary barley transformants. *Plant Molecular Biology* 83: 279–285.
- Wiedenheft B., Sternberg S. H., Doudna J. A. (2012) RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature* 482: 331–338.
- Wojcik M., Tukendorf A., (1999) Cd-tolerance of maize, rye and wheat seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum* 21: 99–107.
- Woo J. W., Kim J., Kwon S. I., Corvalan C., Cho S. W., Kim H., Choe S., Kim J. (2015). DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Nature Biotechnology* 33: 1162–1164.
- Wright D. A., Townsend J. A., Winfrey R. J. Jr, Irwin P. A., Rajagopal J., Lonosky P. M., Hall B. D., Jondle M. D., Voytas D. F. (2005) High-frequency homologous recombination in plants mediated by zinc-finger nucleases. *Plant Journal* 44: 693–705.
- Wyman C., Kanaar R. (2006) DNA double-strand break repair: all's well that ends well. *Annual Review of Genetics* 40: 363–383.
- Xing Y., Cao Q. Q., Zhang Q., Qin L., Jia W. S., Zhang J. H. (2013). MKK5 regulates high light-induced gene expression of Cu/Zn superoxide dismutase 1 and 2 in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* 54: 1217–1227.
- Xu J., Zhang S. (2015) Mitogen-activated protein kinase cascades in signaling plant growth and development. *Trends in Plant Science* pp. 56-64."
- Zeeman S. C., Kossmann J., Smith A. M. (2010) Starch: its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants. *Annual Review of Plant Biology* 61: 209–234.
- Zhang S., Klessig D. F. (2001). MAPK cascades in plant defensesignaling. *Trends in Plant Science* 6: 520–527.
- Zhang F., Wen Y., Guo X. (2014) CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. *Human Molecular Genetics* 23: R40–R46.
- Zhu J. K. (2002) Salt and Drought Stress Signal Transduction in Plants. *Annual Review of Plant Biology* 53: 247–273.
- Zhu J. K. (2016) Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. *Cell* 167: 313-324.

7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

- ABA – kyselina abscisová
- ANP1 – *Arabidopsis* NPK1 homolog
- ATP – adenosintrifosfát
- ARGONAUTE7 (*SIAGO7*) – gen z rajčete podílející se na vývoji listů
- bar* – gen rezistence na fosfinitricin
- BCP - 1-bromo-3-chloropropan
- BSA – hovězí sérový albumin
- Col-0 – *A. thaliana* ekotyp Columbia
- CRISPR/Cas - segmenty nahromaděných pravidelně rozmístěných krátkých palindromických repetit a CRISPR asociovaný protein
- crRNA – cílově specifická RNA
- dNTPs – deoxyribonukleotidy
- DTT – dithiotreitol
- DSBs – cílené dvouvláknové zlomy
- ECL – chemiluminiscenční substrát
- EDTA - kyselina ethylendiamintetraoctová
- EFL-α* - elongační faktor 1α
- FokI* – restriční endonukleasa izolovaná z *Flavobacterium okeanoikoites*
- FLS2 – receptor pro flagelin 22
- FP – kódující, forward primer
- GBSS – enzym zodpovědný za syntézu amylosy
- GBSSI* – gen kódující GBSS
- GC – svěrací buňky průduchů
- GUS* – reportérový gen pro β-glukuronidasu
- GT – cílení genů
- HEPES – kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonová
- HNH – nukleasová doména
- HR – homologní rekombinace
- HRP – křenová peroxidasa
- I-CreI – endonukleasa objevena v chloroplastech *Chlamydomonas reinhardtii*
- IPK1* – gen v kukuřici kódující inositol-1,3,4,5,6-pentakisfosfát-2-kinasu
- I-SceI – endonukleasa pocházející z mitochondrií *Saccharomyces cerevisiae*

MAPK – mitogen-aktivovaná proteinkinasa
MAPKK (MAP2K, MKK) – mitogen-aktivovaná proteinkinasa kinasa
MAPKKK (MAP3K, MEKK) – mitogen-aktivovaná proteinkinasa kinasa kinasa
MES – kyselina 2-(N-morfolin) ethansulfonová
MMCs – meristemoidní mateřské buňky
MS – Murashige & Skoog
NHEJ – homologní spojování volných konců
OsSWEET14 – gen z rýže kódující transportér SWEET, který zajišťuje vylučování sacharosy
PAGE – polyakrylamidová gelová elektroforéza
PAM – k protospaceru přilehlý motiv
PCR – polymerasová řetězová reakce
PPT – fosfotricin
PVDF – polyvinylidendifluorid
RLK – receptorová kinasa
ROS – reaktivní formy kyslíku
RP – antikódující, reverse primer
RT – PCR - polymerasová řetězová reakce spojená s reverzní transkripcí
RuvC – nukleasová doména
SAIL – Inzerční knihovna *Arabidopsis*
SALK – Institut biologických studií (Jonas Edward Salk)
SIM1 – gen z rajčete udělující rostlině vnímavost vůči plísňové chorobě *Oidium neolycopersici*
SDS – dodecylsírán sodný
sgRNA – chimérická RNA vzniklá fúzí crRNA a tracrRNA
SIAGL6 – gen z rajčete zapojený ve vývoji plodů
SPCH – traskripční faktor zapojený ve vývoji průduchů
SuRA, *SuRB* – geny acetohydroxykyselinové syntasy v tabáku
TALENs – efektorové nukleasy
TALEs – efektorové proteiny
Tris – 2-amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol
tracrRNA – pomocná trans-aktivační crRNA
YODA – mitogen-aktivovaná proteinkinasa kinasa kinasa
ZFNs – nukleasy zinkových prstů