

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Katedra biochemie



**Studium mitogen aktivovaných proteinkinas YODA
a MPK3 pod nativním promotorem u modelového
organismu *Arabidopsis thaliana***

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Markéta Kořistková
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Ivan Luptovčíak, Ph. D.
Rok:	2020

Prohlašuji, že jsem diplomovou 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

.....

Poděkování

Tato práce byla částečně podpořena granty IGA (projekty č. IGA_PrF_2019_011 a IGA_PrF_2020_025) ze Studentské grantové soutěže na Univerzitě Palackého v Olomouci a Grantovou agenturou České republiky (GAČR) projektem č. 17-24500S.

Ráda bych na tomto místě poděkovala svému školiteli Mgr. Ivanovi Luptovčiakovi, Ph.D. za odborné vedení, ochotu, cenné rady a připomínky, které mi věnoval během zpracovávání této práce. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Anně Kuchařové, Ph.D. za odborné vedení v prvním roce zpracovávání diplomové práce. Také bych ráda poděkovala Mgr. Dominikovi Novákovi, Ph.D. za poskytnutý materiál pro experimentální část práce. Velké díky také patří všem mým kolegům z laboratoře za jejich vstřícnost a příjemnou atmosféru na pracovišti. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům, především rodičům a příteli, za jejich podporu a trpělivost během studia.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Markéta Kořistková
Název práce	Studium mitogen aktivovaných proteinkinasy YODA a MPK3 pod nativním promotorem u modelového organismu <i>Arabidopsis thaliana</i>
Typ práce	diplomová
Pracoviště	Oddělení buněčné biologie, Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, PřF UP
Vedoucí práce	Mgr. Ivan Luptovciak, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020

Abstrakt

Mitogen aktivované proteinkinasy jsou esenciální pro adaptaci organismů na vnější podmínky, ale také se zapojují do vývojových procesů v buňce. MPK3 a YODA jsou důležité pro vývoj stomat, embryogenezi nebo růst rostlin. Samotná MPK3 je nezbytná pro reakci na abiotický stres způsobený vysokou salinitou nebo kyslíkovými radikály. Hlavními cíli této práce bylo molekulární klonování YODA pod nativním promotorem v C-terminální fúzi s GFP nebo RFP a dále komplementace *MPK3* genu v *mpk3* mutantních rostlinách *Arabidopsis thaliana*. Klonováním byly připraveny čtyři konstrukty pro expresi YODA pod nativním promotorem ve fúzi s GFP nebo RFP. Konstrukty byly testovány transientní transformací *Nicotiana benthamiana* a následně byly použity pro stabilní transformaci *A. thaliana*. Fúzní protein YODA-GFP byl detekován ve dvou rostlinách, což bylo poté potvrzeno i mikroskopií. Nepodařilo se selektovat žádné rostliny s YODA-RFP fúzním proteinem. Mutantní linie *mpk3-1* a *mpk3-5* *A. thaliana* s vyřazeným genem *MPK3* byly transformované konstruktem exprimujícím *MPK3* pod nativním promotorem ve fúzi s mCherry na C-konci. Protein MPK3-mCherry byl detekován ve velkém množství rostlin, z kterých byly selektovány homozygotní linie v generaci T3. Mikroskopickou analýzou těchto linií bylo objeveno, že MPK3-mCherry je abundantní především v cytoplasmě a jádře buněk.

Klíčová slova	mitogen aktivované proteinkinasy (MAPK), YODA, MPK3, <i>Arabidopsis thaliana</i> , solný stres, GFP, mCherry
Počet stran	95
Počet příloh	0
Jazyk	český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Bc. Markéta Kořistková
Title	Study of the mitogen-activated protein kinases YODA and MPK3 under native promoter in <i>Arabidopsis thaliana</i>
Type of thesis	diploma
Department	Department of Cell Biology, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Faculty of Science, UP
Supervisor	Mgr. Ivan Luptovčíak, Ph.D.
The year of presentation	2020

Abstract

Mitogen-activated protein kinases are essential for organism adaptation to environmental conditions, but they also take part in developmental processes. MPK3 and YODA are crucial for development of stomata, embryogenesis or plant growth. MPK3 is involved in reaction to abiotic stress caused by high salinity or reactive oxygen species. The main goals of this thesis were molecular cloning of *YODA* with its own promoter with GFP or RFP C-terminal fusion and complementation of *MPK3* gene in *mpk3-1* and *mpk3-5* *Arabidopsis thaliana* mutant plants. Four different constructs for *YODA* with its own promoter and C-terminal fusion with either GFP or RFP were prepared and tested with transient transformation of *Nicotiana benthamiana* and used for stable transformation of *A. thaliana*. Protein YODA-GFP was detected in two plants and the presence of the protein was later confirmed by microscopy. However, no plants with YODA-RFP protein were detected. Mutant lines *mpk3-1* and *mpk3-5* of *A. thaliana* without functional *MPK3* gene were transformed with construct with *MPK3* and its own promoter with mCherry on C-terminus. Presence of *MPK3*-mCherry was confirmed in large number of plants from which T3 generation of homozygous lines were selected and showed localization of *MPK3*-mCherry mainly in cytoplasm and nucleus of the cells.

Keywords	mitogen-activated protein kinases (MAPKs), YODA, MPK3, <i>Arabidopsis thaliana</i> , salt stress, GFP, mCherry
Number of pages	95
Number of appendices	0
Language	czech

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	2
2.1	Mitogen aktivované proteinkinasy	2
2.1.1	Kaskáda mitogen aktivovaných proteinkinasy	2
2.1.1.1	MAPKKKs	4
2.1.1.2	MAPKKs	5
2.1.1.3	MAPKs	6
2.1.2	Scaffold proteiny	7
2.1.3	Fosfatasy	8
2.1.4	Mitogen aktivovaná proteinkinasa kinasa kinasa YODA	9
2.1.4.1	YODA a MPK3 při vývoji stomat	9
2.1.4.2	YODA a MPK3 při embryogenezi a vývoji rostlin	12
2.1.5	Mitogen aktivovaná proteinkinasa 3 (MPK3)	14
2.1.5.1	MPK3 a nízká teplota	14
2.1.5.2	MPK3 a oxidativní stres	15
2.1.5.3	MPK3 a osmotický stres	17
2.1.5.4	MPK3 a těžké kovy	18
2.1.5.5	MPK3 v biotickém stresu	20
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	21
3.1	Materiál	21
3.1.1	Použité přístroje	21
3.1.2	Software pro zpracování výsledků	21
3.1.3	Enzymy a chemikálie	22
3.1.4	Složení médií a roztoků	23
3.1.4.1	Použité kultivační média	23
3.1.4.2	Použité roztoky a gely	24
3.1.5	Použité bakteriální kmeny	26
3.1.6	Použité plasmidy	26
3.1.7	Rostlinný materiál	26
3.2	Metody	27
3.2.1	PCR amplifikace genu YODA s nativním promotorem	27
3.2.2	Agarosová elektroforéza	28
3.2.3	BP reakce a LR reakce Gateway® klonování	28
3.2.4	Příprava chemokompetentních buněk <i>E. coli</i>	28
3.2.5	Transformace <i>E. coli</i> teplotním šokem	29
3.2.6	Transformace <i>A. tumefaciens</i> nízkou teplotou	29
3.2.7	Colony PCR	30
3.2.8	Kultivace pozitivních kolonií a izolace plasmidové DNA	31
3.2.9	Restrikční štěpení	31
3.2.10	Transientní transformace listů <i>N. benthamiana</i>	31
3.2.11	Sterilizace a výsev semen <i>A. thaliana</i>	32
3.2.12	Selekce Crispr/Cas9 <i>mpk3-5</i> mutantů <i>A. thaliana</i>	32
3.2.13	Selekce T-DNA <i>mpk3-1</i> mutantů <i>A. thaliana</i>	33
3.2.14	Stabilní transformace <i>A. thaliana</i> metodou floral dip	34
3.2.15	Selekce transformovaných semen <i>A. thaliana</i>	35
3.2.16	Genotypizace transformovaných rostlin <i>A. thaliana</i>	35
3.2.17	Extrakce proteinů	36
3.2.18	SDS-PAGE elektroforéza	36

3.2.19	Western-blot analýza	37
3.2.20	Selekce homozygotních linií komplementovaných v <i>MPK3</i> genu	38
3.2.21	Mikroskopická analýza transformovaných rostlin	38
3.2.22	Aplikace solného stresu na komplementované rostliny	38
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	39
4.1	Amplifikace genu <i>YODA</i> s nativním promotorem	39
4.2	Kontrolní štěpení vektorů pro Gateway® klonování	40
4.3	BP reakce a selekce entry klonů po BP reakci	42
4.4	LR reakce a selekce pozitivních kolonií po LR reakci	44
4.5	Transientní transformace <i>Nicotiana benthamiana</i>	46
4.6	Selekce mutantních rostlin <i>mpk3</i> pro komplementaci genu <i>MPK3</i>	49
4.7	Selekce transformovaných semen <i>A. thaliana</i>	52
4.8	Genotypizace selektovaných rostlin <i>A. thaliana</i>	56
4.9	Western-blot analýza transformovaných rostlin <i>A. thaliana</i>	60
4.10	Selekce homozygotních linií <i>MPK3</i> -mCherry	65
4.11	Mikroskopická analýza transformovaných linií <i>A. thaliana</i>	67
4.12	Aplikace solného stresu na komplementované rostliny v genu <i>MPK3</i>	77
5	ZÁVĚR	82
6	POUŽITÁ LITERATURA	84
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	93

CÍLE

TEORETICKÁ ČÁST

- 1) Přehled publikací o mitogen aktivovaných proteinkinas v modelovém organismu *Arabidopsis thaliana*
- 2) Přehled signálních drah mitogen aktivovaných proteinkinas se zaměřením na YODA a MPK3 a jejich společných signálních drah při odpovědi na stres a vývoj rostlin.

PRAKTICKÁ ČÁST

- 1) Molekulární klonování konstruktů pro expresi YODA značeného proteinu pod nativním promotorem ve fúzi s GFP nebo RFP na C- konci.
- 2) Komplementace genu *MPK3* v *mpk3* mutantních rostlinách *A. thaliana*.
- 3) Transformace bakterií *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens*, transientní transformace listů *Nicotiana benthamiana* a stabilní transformace *Arabidopsis thaliana* metodu floral-dip.
- 4) Genotypová a biochemická analýza stabilně transformovaných linií *Arabidopsis thaliana* pomocí metody PCR a metody Western-blot analýzy.
- 5) Aplikace solného stresu na komplementované linie v *MPK3* genu.
- 6) Studium lokalizace fúzních proteinů pomocí konfokální mikroskopie.

1 ÚVOD

Pro reakci na nepříznivé podmínky je důležitá rychlá adaptace organismu. Jelikož rostliny před nepříznivými podmínkami nemohou utéct, vyvinuly se u nich komplexní signální dráhy přenosu stimulu z prostředí na buněčnou odpověď. Jedna z takovýchto signálních drah jsou mitogen-aktivované proteinkinasy (MAPKs), které mohou ovlivňovat expresi genů nebo aktivitu různých enzymů (Colcombet a Hirt, 2008). MAPKs se zapojují do velkého množství procesů v buňkách, jako například reakce na abiotické a biotické stresy, regulace vývoje organismu nebo syntézu hormonů (Šamajová *et al.*, 2013; Zhang a Klessig, 2001). Podnět z okolního prostředí je rozeznán pomocí vhodného receptoru, který dále přenáší signál přes fosforylaci jednotlivých komponent MAPK kaskády: mitogen-aktivované proteinkinasy kinasy kinasy (MAP3K), mitogen aktivované proteinkinasy kinasy (MAP2K) a mitogen aktivované protein kinasy (MAPK) (Colcombet a Hirt, 2008). Cílem MAPK kaskády jsou efektorové proteiny, které regulují např. aktivitu enzymů, transkripčních faktorů a expresi genů (Khokhlatchev *et al.*, 1998; Rodriguez *et al.*, 2010). Přenos signálu MAPK kaskádou je regulován pomocí scaffold proteinů a mitogen aktivovaných proteinkinás fosfatas (MKPs) (Rodriguez *et al.*, 2010).

Mitogen aktivovaná proteinkinasa kinasa kinasa YODA je zapojena především do regulace vývoje organismu, a to při vývoji embryí, tvorbě stomat nebo růstu kořenů a okvětních částí (Lukowitz *et al.*, 2004). Mitogen aktivovaná proteinkinasa 3 (MPK3) je nejvíce studovaná MAPK, která hraje důležitou roli při odpovědi organismu na biotické a abiotické stresy způsobené těžkými kovy, nízkou teplotou, akumulací reaktivních forem kyslíku, osmotickým prostředím nebo napadením patogenem (Colcombet a Hirt, 2008). Mitogen aktivovaná proteinkinasa 3 se také zapojuje do společné signalizační dráhy s YODA proteinem. Konkrétně je YODA-MPK3 kaskáda důležitá při regulaci tvorby stomat a embryogenezi (Lampard *et al.*, 2009; Musielak a Bayer, 2014).

Tato diplomová práce je zaměřena na studium mitogen aktivované proteinkinasy kinasy kinasy YODA a mitogen aktivované proteinkinasy 3 (MPK3) v modelovém organismu *Arabidopsis thaliana*.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Mitogen aktivované proteinkinasy

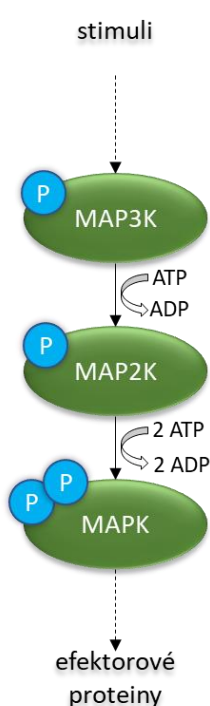
Důležité pro přežití organismu je jeho rychlá a efektivní reakce na nepříznivé podmínky a další podněty z okolí. Jelikož rostliny nemohou těmto vlivům uniknout, vyvinuly se u nich komplexní mechanismy k rozpoznání stimulů z prostředí a k adaptaci na nepříznivé podmínky. Jedním z takovýchto mechanismů jsou mitogen aktivované proteinkinasy (MAPKs), které se nacházejí nejen v rostlinných druzích, ale i v ostatních eukaryotních organismech. Mitogen aktivované proteinkinasy přenáší signál z okolního prostředí do intracelulární odpovědi a jsou především důležité pro reakci organismu na abiotické stresory, jako je vysoká teplota, salinita nebo sucho (Colcombet a Hirt, 2008; Rodriguez *et al.*, 2010), ale i biotické faktory např. napadení organismu patogenem (Asai *et al.*, 2002). Jsou ale také zapojeny do regulace buněčného cyklu (Pearce a Humphrey, 2001), vývoji organismu, diferenciaci a růstu buněk (Inzé a De Veylder, 2006) a také při symbióze (Liu *et al.*, 2014).

První rostlinné MAPKs byly objeveny v roce 1993 u vojtěšky (Duerr *et al.*, 1993) a hrachu (Stafstrom *et al.*, 1993). Později v tomto roce byly studovány MAPKs v *A. thaliana* (Mizoguchi *et al.*, 1993) a tabáku (Wilson *et al.*, 1993), a byla provedena klíčová studie, která prokázala funkci MAPKs při biosyntéze ethylenu (Kieber *et al.*, 1993). Tato studie se stala základem pro identifikaci MAPKs v dalších eukaryotních organismech jako v kvasinkách a savcích (Chang a Karin, 2001; Roux a Blenis, 2004).

2.1.1 Kaskáda mitogen aktivovaných proteinkinás

Kaskáda MAPKs začíná aktivací mitogen aktivovaných proteinkinás kinas kinas (MAPKKKs, MAP3Ks, MEKKs) (Obr. 1A), které dále signál přenášejí fosforylací serinových nebo threoninových residuí na mitogen aktivované proteinkinasy kinasy (MAPKKs, MAP2Ks, MEKs) (Obr. 1A). MAP2Ks poté aktivují mitogen aktivované proteinkinasy (MAPKs) dvojitou fosforylací threoninových a tyrosinových residuí (Obr. 1A). Cílem MAPKs mohou být efektorové proteiny v cytoplasmě nebo jádře jako např. další kinasy, enzymy, transkripční faktory nebo cytoskeletární proteiny (Khokhlatchev *et al.*, 1998; Rodriguez *et al.*, 2010) (Obr. 1A).

Sekvenací genomu *A. thaliana* bylo objeveno 80 MAPKKKs, 10 MAPKKs a 20 MAPKs (Ichimura *et al.*, 2002; Jonak *et al.*, 2002). V MAPK kaskádě dochází k divergenci i konvergenci při přenosu signálu. Každá MAPK může být aktivována různými stimuly, pomocí různých MAP3Ks a MAP2Ks (Lee *et al.*, 2008) a více MAPKs může být aktivováno stejným stimulem. Zároveň jedna MAPK může být součástí různých kaskád (Andreasson a Ellis, 2010). Také je známá redundance v MAPK kaskádě, kdy dochází k aktivaci jednoho substrátu pomocí více MAPK kaskád. Příkladem může být protein MAP65-1, který je zapojený do regulace mikrotubulů a je fosforylován prostřednictvím MPK3, MPK4 i MPK6 (Hoehenwarter *et al.*, 2013).



Obr. 1 Kaskáda mitogen aktivovaných proteinkinás. (A) Kaskáda mitogen aktivovaných proteinkinás začíná fosforylací mitogen aktivované proteinkinasy kinasy kinasy (MAPKKK, MAP3K), která dále přenáší fosforylací signál na mitogen aktivovanou proteinkinasu kinas (MAPKK, MAP2K). MAP2K poté přenáší signál dvojitou fosforylací threoninových a tyrosinových residuí na mitogen aktivovanou proteinkinasu (MAPK). Cílem kaskády mitogen aktivovaných proteinkinás (MAPKs) jsou efektorové proteiny např. transkripční faktory nebo další kinasy (upraveno podle Kořistková, 2018)

2.1.1.1 MAPKKKs

Mitogen aktivované proteinkinasy kinasy kinasy (MAPKKKs, MAP3Ks) jsou serin nebo threonin kinasy. U *A. thaliana* bylo určeno 80 MAP3Ks (Jonak *et al.*, 2002). MAP3Ks jsou aktivovány membránovými receptory nebo v některých případech i pomocí MAP4Ks (mitogen aktivované proteinkinasy kinasy kinasy kinasy) a slouží jako první komponenta přenosu signálu pomocí MAPK kaskády (Champion *et al.*, 2004). MAP3Ks lze rozdělit do tří skupin: MAP3Ks podobné MEKK („MEKK-like“), MAP3K podobné RAF („RAF-like“) nebo MAP3K podobné ZIK („ZIK-like“). Prozatím nebyly objeveny u rostlin žádné MAP3Ks podobné RAF nebo ZIK (Colcombet a Hirt, 2008). Všechny MAP3Ks mají kinasovou doménu a regiony bohaté na glycin, leucin, alanin, serin nebo lysin. Dále pak obsahují vazebné domény pro další komponenty např. ATP/GTP doména nebo WRKY/DNA vazebná doména, a lokalizační signál (Ichimura *et al.*, 2002). Skupina MAP3Ks podobných MEKK obsahuje 20 MAP3Ks, které mohou být dále děleny do 6 podskupin (A1-A6). Pouze podskupiny A1 až A4 byly blíže prostudovány (Danquah *et al.*, 2014).

Podskupina A1 obsahuje MEKK1 až MEKK4. Nejlépe prostudovanou je MEKK1, která je zapojena do přirozené imunity rostlin a odpovědi na solný stres a chlad (Asai *et al.*, 2002; Rodriguez *et al.*, 2010; Teige *et al.*, 2004). Dále bylo objeveno, že MEKK1 negativně reguluje MEKK2, také důležitou MAP3Ks ve spouštění SUMM2 (SUPPRESSOR OF MKK1 MKK2 2) proteinu důležitého pro imunitní odpověď rostliny (Kong *et al.*, 2012). Funkce MEKK3 a MEKK4 není stále objasněná (Danquah *et al.*, 2014).

Podskupina A2 zahrnuje MAPKKK γ , MAPKKK α a YODA. U MAP3K YODA byla zjištěna funkce při tvorbě stomat, vývoji embryí a aktivaci MKK4/MKK5-MPK3/MPK6 kaskády (Bergmann, 2004; Bush a Krysan, 2007; Lukowitz *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007).

Podskupina A3 zahrnuje MAP3Ks ANP1 až ANP3 (*Arabidopsis* NPK1 (Nicotiana protein kinase 1)-related kinase) regulující cytokinezi (Ichimura *et al.*, 2002; Krysan *et al.*, 2002). Kinasa ANP1 je dále zapojena do reakce na oxidativní stres (Kovtun *et al.*, 2000).

Do podskupiny A4 se řadí MAPKKK ϵ 1 a MAPKKK ϵ 2, u kterých byla zjištěna role v buněčném dělení a vývoji pylových zrn (Chaiwongsar *et al.*, 2006; Jouannic *et al.*, 2001).

2.1.1.2 MAPKKs

Mitogen aktivované proteinkinasy kinasy (MAPKKs, MAP2Ks) jsou aktivovány MAP3Ks fosforylací a jsou druhou komponentou MAPK kaskády. U *A. thaliana* bylo objeveno 10 MAP2Ks (Ichimura *et al.*, 2002), které lze rozdělit na čtyři skupiny (A-D) (Hamel *et al.*, 2006).

Skupina A zahrnuje MKK1, MKK2, které přenášejí signál dále na MPK4 (Ichimura *et al.*, 1998) a obě jsou důležité při imunitní reakci rostliny. MKK2 je také zapojena do odpovědi na chlad a salinitu (Mészáros *et al.*, 2006; Teige *et al.*, 2004). Dále zde patří MKK6, která je aktivátorem MPK13 (Melikant *et al.*, 2004).

Kinasy skupiny B u *A. thaliana* se vyznačují doménou s nukleárním transferovým faktorem (NTF doména) (Hamel *et al.*, 2006). Tato NTF doména napomáhá nukleárnímu importu proteinů, což indikuje, že MAP2Ks této skupiny jsou zapojeny do přenosu nákladu mezi cytoplasmou a jádrem (Steggerda a Paschal, 2002). Skupina B zahrnuje MKK3, která má své homology i u rýže, *Selaginella*, *Physcomitrella* a *Chlamydomonas* (Hamel *et al.*, 2006) a zapojuje se do odpovědi na patogeny, signalizační kaskády jasmonové a abscisové kyseliny (Danquah *et al.*, 2015; Dóczi *et al.*, 2007; Takahashi *et al.*, 2007).

Kinasy skupiny C zahrnují MKK4 a MKK5. Tyto MAP2Ks se zapojují především do odpovědi na abiotický stres a odpověď na patogenní elicitory (Cardinale *et al.*, 2002). MKK4 je zapojena do odpovědi na osmotický stres (Kim *et al.*, 2011). MKK5 je důležitá pro toleranci ke stresu ze silného osvětlení (Xing *et al.*, 2013). Obě MAPKs MKK4 i MKK5 ovlivňují opadávání květních orgánů (Cho *et al.*, 2008), regulují vývoj stomat (Khan *et al.*, 2013) a obrannou reakci vůči bakteriálnímu flg22 (Asai *et al.*, 2002).

Poslední skupina D MAP2Ks zahrnuje MKK7 až MKK10 (Qiu *et al.*, 2008). Z této skupiny byly blíže prostudovány MKK7 a MKK9, které jsou důležité pro správný vývoj rostliny a regulaci odpovědi na stresové podmínky. MKK9 se zapojuje do reakce na solný stres (Alzwiyy a Morris, 2007; Xu *et al.*, 2008), biosyntézu a signalizaci ethylenu (Xu *et al.*, 2008; Yoo *et al.*, 2008). MKK7 inhibuje polární transport auxinu, je zapojena do obrany proti patogenům a indukci programované buněčné smrti (Dai *et al.*, 2006; Jia *et al.*, 2016; Popescu *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2007). MKK7 i MKK9 také regulují tvorbu stomatálních buněk (Lampard *et al.*, 2009).

2.1.1.3 MAPKs

Mitogen aktivované proteinkinasy (MAPKs) jsou aktivovány MAP2Ks a jsou tedy třetí komponentou MAPK kaskády. Obsahují TEY (Thr-Glu-Tyr) nebo TDY (Thr-Asp-Tyr) fosforylační doménu, která je nutná pro jejich aktivaci. U *A. thaliana* bylo objeveno 20 MAPKs, které lze dále dělit do čtyř skupin (A-D). Skupiny A, B a C obsahují MAPKs s motivem TEY a MAPKs skupiny D motiv TDY (Ichimura *et al.*, 2002).

Skupina A obsahuje u *A. thaliana* MAPKs MPK3, MPK6 a MPK10 (Asai *et al.*, 2002; Ichimura *et al.*, 2002). Tyto MAPKs jsou důležité ve vývojových procesech, jsou aktivovány při odpovědích na biotické a abiotické stresy a při růstu rostliny (Kiegerl *et al.*, 2000; Seo *et al.*, 2007; Zhang a Klessig, 2001).

Do skupiny B se řadí MAPKs MPK4, MPK11 a MPK12 (Ichimura *et al.*, 2002). Kinasa MPK4 pozitivně reguluje cytokinesi během meiosis a mitosy (Kosetsu *et al.*, 2010), kortikální mikrotubuly a vývoj kořenových vlásků (Beck *et al.*, 2010). Dále je zapojena do regulace exprese obranných genů proti napadení patogenem (Gao *et al.*, 2008), při tvorbě jasmonové kyseliny (Brodersen *et al.*, 2006) a odpovědi na solný stres (Droillard *et al.*, 2004). Všechny tři MAPK MPK4, MPK11 i MPK12 jsou součástí signální dráhy abscisové kyseliny (Jammes *et al.*, 2009; Xin *et al.*, 2005).

Skupina C zahrnuje MPK1, MPK2, MPK7 a MPK14, které jsou aktivovány pomocí MKK3 při napadení patogenem (Dóczi *et al.*, 2007). MPK7 je zapojena do regulace cirkadiálních rytmů rostliny a kaskády aktivované auxinem (Mizoguchi *et al.*, 1994; Schaffer *et al.*, 2001). MPK1 společně s MPK2 jsou zapojené do tvorby salicylové kyseliny při senescenci listů (Zhang *et al.*, 2020) a MPK7 je důležitá při obranné reakci proti patogenům (Dóczi *et al.*, 2007).

Poslední skupina D, jak již bylo řečeno, je oproti předchozím skupinám charakteristická TDY motivem a chybějící C-terminální dokovací doménou (common docking domain; CD doména), která slouží jako nasedací místo pro MAP2Ks, fosfatasy a další substráty (Yoo *et al.*, 2008). Do této skupiny se řadí MPK8, MPK9 a MPK15 až MPK20 (Ichimura *et al.*, 2002). MPK8 reguluje akumulaci reaktivních forem kyslíku v organismu (Takahashi *et al.*, 2011). MPK9 je zapojena do signalizace abscisové kyseliny a je především abundantní v stomatech (Jammes *et al.*, 2009) a u MPK18 byla prokázána role v regulaci kortikálních mikrotubulů (Walia *et al.*, 2009). Přesná funkce dalších MAPK v této skupině je stále nejasná.

2.1.2 Scaffold proteiny

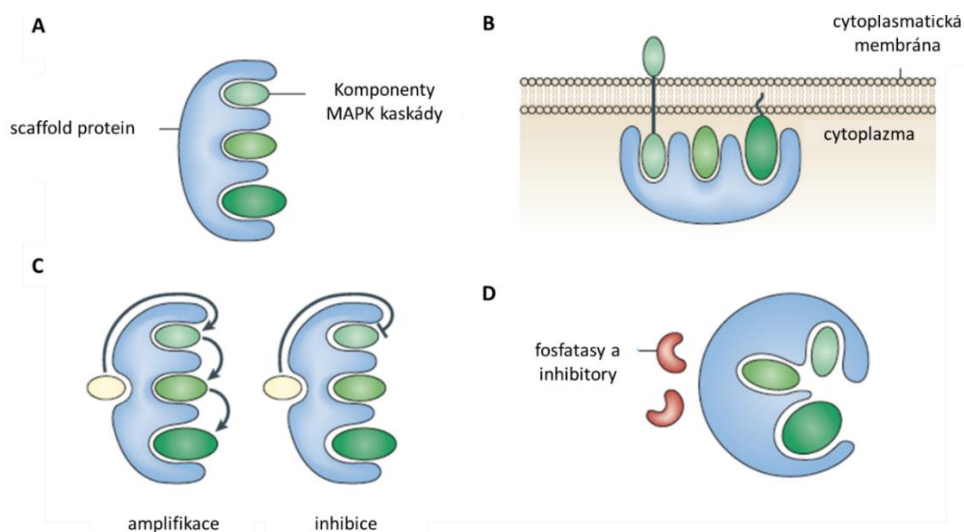
Scaffold proteiny jsou velmi důležité regulátory MAPK kaskády. Mají hlavní čtyři funkce při přenosu signálu MAPK kaskádou: přibližují komponenty kaskády, ovlivňují lokalizaci kaskády v buňce, regulují přenos signálu a chrání komponenty kaskády před deaktivací ostatními molekulami (Shaw a Filbert, 2009) (Obr. 2).

Jak již bylo řečeno výše, hlavní funkcí scaffold proteinů je skládání komponent kaskády k sobě (Obr. 2A). Přiblížením signálních molekul dojde k jejich zkoncentrování a zvýšení specifity fosforylace, což má za následek zefektivnění a urychlení celého přenosu signálu (Burack a Shaw, 2000).

Další důležitou funkcí scaffold proteinů je lokalizace signální kaskády na specifické místo v buňce (Obr. 2B), což může být nezbytné pro výsledný produkt kaskády (Wong a Scott, 2004).

Scaffold proteiny mohou mít i další funkci při přenosu signálu, a to pozitivní nebo negativní regulaci kaskád (Obr. 2C). Pozitivní vliv na přenos signálu může být například zesílení slabého stimulu a zvýšení specifity (Burack a Shaw, 2000). Při navázání všech tří komponent MAPK kaskády může docházet k negativní regulaci přenosu stimulu, a to zabráněním kinase fosforylovat více než jednu komponentu kaskády (Burack a Shaw, 2000).

Poslední funkcí scaffold proteinů může být ochranná bariéra proti ostatním proteinům (Obr. 2D) v buňce jako např. degradačním enzymům nebo fosfatasám, které přenos signálu negativně regulují (Locasale *et al.*, 2007).



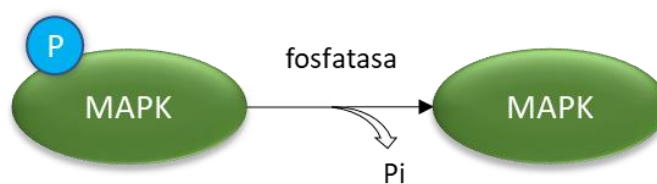
Obr. 2 Funkce „scaffold proteinů“. Scaffold proteiny mají nejméně čtyři funkce: skládání komponent kaskády k sobě (A), lokalizaci komponent a signálních drah na specifické místo v buňce (B), regulace přenosu signálu (C) a ochrana před fosfatasami a inhibitory kaskád (D) (převzato z Shaw a Filbert, 2009).

2.1.3 Fosfatasy

Specifita a aktivita jednotlivých komponent MAPK kaskády může být také regulována pomocí tzv. proteinových fosfat, které fosforylované komponenty MAPK kaskády deaktivují defosforylací (Colcombet a Hirt, 2008) (Obr. 3). Tyto fosfatasy lze rozdělit na dvě hlavní skupiny: protein tyrosin fosfatasy (PTPs) a protein serin-threonin fosfatasy (PSTPs) (Luan, 2003).

V první skupině jsou zařazeny fosfatasy specifické na tyrosin a fosfatasy s duální funkcí regulující intenzitu a dobu přenosu signálu přes MAPK kaskády (Luan, 2003). Například fosfatasa PTP1 deaktivuje MPK4 (Huang *et al.*, 2000). Příkladem fosfatasy s duální funkcí je MKP1, která negativně reguluje MAPKs v odpovědi na UV a zároveň v mutantních rostlinách s vyřazeným genem *MKP1* byla prokázána zvýšená rezistence vůči solnému stresu (Ulm *et al.*, 2002). Dalším příkladem fosfatasy s duální funkcí je MKP2, která deaktivuje MPK3 a MPK6 a zároveň v rostlinách s umlčeným genem *MKP2* byla dokázána hypersensitivní reakce na oxidativní stres (Lee a Ellis, 2007). Další fosfatasou s duální funkcí je PHS1 (Propyzamide hypersensitive 1), která interaguje s MPK18 při stabilizaci mikrotubulů (Walia *et al.*, 2009).

Do druhé skupiny patří PP2C fosfatasa, která na N- konci obsahuje MAPK interakční doménu (kinase interaction motif, KIM) sloužící k rozpoznání a inaktivaci MAPKs (Schweighofer *et al.*, 2004). Dále zde patří AP2C1 fosfatasa, která defosforyluje MPK4 a MPK6 při regulaci hladiny kyseliny jasmonové v buňce (Schweighofer *et al.*, 2007).



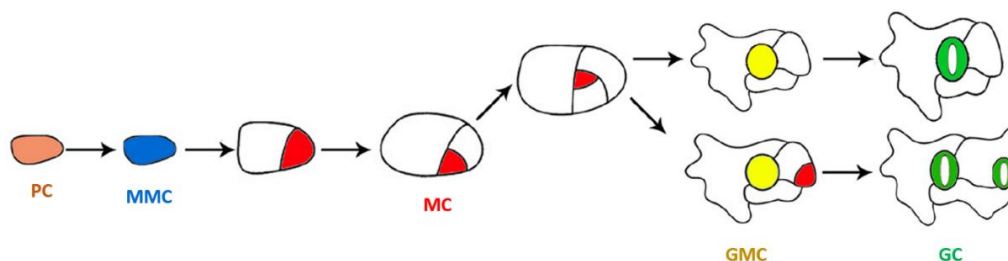
Obr. 3 Funkce mitogen aktivovaných proteinkinás fosfat. Mitogen aktivovaná proteinkinasa fosfatasa (MKP, fosfatasa) deaktivuje komponenty MAPK kaskády defosforylací, čímž zabraňuje přenosu signálu přes MAPK kaskádu (upraveno podle Kořistková, 2018).

2.1.4 Mitogen aktivovaná proteinkinasa kinasa kinasa YODA

Mitogen aktivovaná proteinkinasa kinasa kinasa YODA patří do skupiny MAP3K podobných MEKK a do podskupiny A2 společně s MAPKKK γ a MAPKKK α . YODA je zapojena především do vývojových procesů organismu, jako například tvorba stomat, embryí, květních částí a tvaru laterálních orgánů (Bergmann, 2004; Lukowitz *et al.*, 2004; Shpak *et al.*, 2005; Xu a Zhang, 2015). MAP3Ks YODA byla studována v kaskádách s MKK4/5/7/9 a MPK3/6 při tvorbě stomat, embryogenezi a vývoji rostlin (Bergmann, 2004; Lukowitz *et al.*, 2004; Musielak a Bayer, 2014).

2.1.4.1 YODA a MPK3 při vývoji stomat

U *Arabidopsis thaliana* je tvorba stomat řízený proces několika buněčných dělení a přeměn buněk, během kterého může vznikat pět hlavních typů buněk: prekurzory buněk meristemoidu (MMCs, meristemoid mother cell), meristemoidy, základové buňky stomatální linie (SLGC, stomatal lineage ground cell), prekurzory svěracích buněk (GMC, guard mother cell) a svěrací buňky (GC, guard cell) (Obr. 4). Tvorba stomat je započata přeměnou protodermálních buněk na MMCs, které dále vytváří meristemoidy a stomatální buňky (SLGCs) (Obr. 4). Meristemoidy dávají za vznik dalším meristemoidům nebo SLGCs (Obr.4). Meristemoidy po čase ztrácí schopnost opětovné tvorby nových meristemoidů a přeměňují se na prekurzory svěracích buněk (GMCs), ze kterých vznikají svěrací buňky (GCs) (Obr. 4) (Bergmann a Sack, 2007; Lau a Bergmann, 2012; Nadeau a Sack, 2002a; Pillitteri a Dong, 2013; Pillitteri a Torii, 2012). SLGCs se mohou přeměnit na MMCs buňky a asymetrickým dělením mohou dát vzniknout satelitním meristemoidům nebo se mohou přeměnit na dlaždicovité buňky (Obr. 4) (Bergmann a Sack, 2007; Geisler *et al.*, 2000).



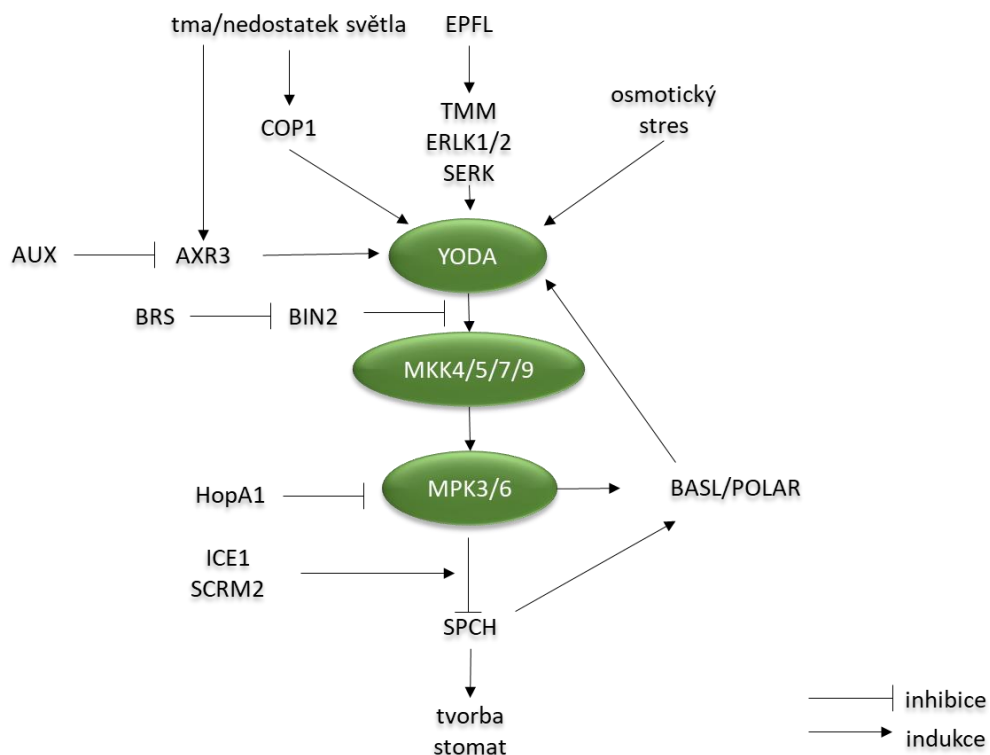
Obr. 4 Diagram znázorňující přeměnu buněk během vývoje stomat v *Arabidopsis*. Protodermální buňka (oranžově) se přeměňuje na prekurzory buněk meristemoidu (MMC, modře), které se asymetricky dělí na meristemoid (červeně) a základové buňky stomatální linie (SLGCs, bíle). Meristemoidy prochází asymetrickým dělením za tvorby SLGCs a dalších meristemoidů. Nakonec jsou buňky meristemoidu diferenciovány na prekurzory svěracích buněk (GMCs, žlutě), které prochází symetrickým dělením za vzniku svěracích buněk (GC, zeleně) (převzato z Chen *et al.*, 2020)

Jednou z determinant buněčného dělení je protein SPEECHLESS (SPCH), který ovlivňuje osud jednotlivých buněk. Gen *SPCH* je tvořen ve všech epidermálních buňkách, ale protein se akumuluje pouze v MMCs a meristemoidech (MacAlister *et al.*, 2007). V mutantní rostlině s vyřazeným genem *SPCH* (*spch-1*) nebylo pozorováno žádné asymetrické dělení. Naopak v mutantních rostlinách s nadexpresí *SPCH* byla pozorována ektopická dělení epidermálních buněk (MacAlister *et al.*, 2007; Pillitteri *et al.*, 2007).

Aktivita proteinu SPCH je regulována fosforylací a degradací. Je známo, že SPCH je nepřímo fosforylován pomocí MPK3 a MPK6 (Lampard *et al.*, 2008). Později bylo dokázáno, že transkripční faktory SCRM ICE1 (INDUCER OF CBF EXPRESSION1) a SCRM2 (SCREAM2) interagují s proteinem SPCH (Kanaoka *et al.*, 2008) a jejich heterodimer funguje jako scaffold pro interakci MAPK kaskády a proteinu SPCH (Putarjuna *et al.*, 2019) (Obr. 5). Do vývoje stomat se zapojuje dráha YODA-MKK4/5/7/9-MPK3/6 (Bergmann, 2004; Lampard *et al.*, 2009; Putarjuna *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2007) (Obr. 5). Tato kaskáda je regulována receptorovým komplexem složeným z „receptor-like“ proteinu TOO MANY MOUTHS (TMM), receptor-like kinasami ERECTA-LIKE1/2 (ERL1/2) a SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR kinas (SERK) (Lee *et al.*, 2012, 2015; Meng *et al.*, 2015; Nadeau a Sack, 2002b; Shpak *et al.*, 2005; Yang a Sack, 1995). Tyto receptory rozeznávají ligandy ze skupiny EPIDERMAL PATTERNING FACTOR-LIKE (EPFL), které potlačují nebo podporují vývoj stomat (Lee *et al.*, 2015, 2012; Meng *et al.*, 2015) (Obr. 5).

Protein SPCH indukuje expresi *BREAKING OF ASYMMETRY IN STOMATAL LINEAGE* (*BASL*) a *POLAR* genů. Oba tyto proteiny se nacházejí v periferiích buňky během asymetrického buněčného dělení (ACD, asymmetric cell division) (Obr. 5). Protein BASL je fosforylován pomocí MPK3/6, což vede ke zvýšení interakce BASL a YODA proteinu a relokaci YODA do kortexu buňky (Dong *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2015, 2016) (Obr. 5). Protein BASL slouží jako scaffold protein, který koncentruje MAPK kaskádu v kortexu buňky a rozděluje je do SLGCs a meristemoidu po asymetrickém buněčném dělení (Zhang *et al.*, 2015) (Obr. 5). Zvýšená signalizace YODA-MPK3/6 v SLGCs vede k fosforylaci a degradaci SPCH, což způsobuje přeměnu SLGCs na dlaždicovité buňky. Snížená signalizace YODA-MPK3/6 na druhou stranu vede ke stabilní expresi *SPCH*, což má za následek další diferenciaci meristemoidu (Zhang *et al.*, 2015).

Aktivita YODA při vývoji stomat je také ovlivněna přítomností hormonů. Brassinosteroidy inhibují tvorbu stomat v epidermálních buňkách listů přes inaktivaci BIN2 (glycogen synthase kinase 3 (GSK3)-like kinase BRINSENSITIVE 2) (Obr. 5). Kinasa BIN2 potlačuje fosforylaci mezi YODA a MPKK4/5, čímž podporuje stabilizaci SPCH (Khan *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2012). Působením auxinů dochází k inhibici AUXIN RESISTANT3 (AXR3), který napomáhá vývoji stomat aktivací YODA kaskády v semenáčcích pěstovaných ve tmě (Balcerowicz *et al.*, 2014; Le *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014) (Obr. 5).



Obr. 5 Regulace tvorby stomat pomocí kaskády YODA. Ligandy EPIDERMAL PATTERNING FACTOR-LIKE (EPFL) jsou rozpoznány pomocí receptorů TOO MANY MOUTHS (TMM), receptor-like kinasami ERECTA-LIKE1/2 (ERLK1/2) a SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR kinasou (SERK). Receptory dále aktivují kaskádu YODA-MKK4/5/7/9-MPK3/6, která přes interakci s transkripčními faktory INDUCER OF CBF EXPRESSION1 (ICE1) a SCREAM2 (SCRM2) inhibuje protein SPEECHLESS (SPCH) důležitý pro tvorbu stomat. Protein SPCH indukuje tvorbu proteinů BREAKING OF ASYMMETRY IN STOMATAL LINEAGE (BASL) a POLAR, které jsou dále fosforylovány pomocí MPK3/6, což vede k aktivaci YODA kaskády. Kaskáda YODA-MPK3/6 je indukována za nedostatku světla proteiny AUXIN RESISTANT3 (AXR3) a CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1 (COP1) a dále při osmotickém stresu a působením brasinosteroidů (BRS). Kaskáda YODA-MPK3 je inhibována glycogen synthase kinase 3 (GSK3)-like kinase BRINSENSITIVE 2 (BIN2), auxiny (AUX) a efektozem HopA1 z *Pseudomonas syringae*.

Dalším regulátorem YODA-MPK3 kaskády při vývoji stomat je protein CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1 (COP1) (Lau a Bergmann, 2012). Při nedostatku světla COP1 pozitivně reguluje YODA kaskádu a degraduje SCRM proteiny, čímž inhibuje tvorbu stomat (Kang *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2017) (Obr. 5).

K regulaci tvorby stomat také dochází při působení abiotických a biotických stresů. Při osmotickém stresu dochází k potlačení SPCH, aktivaci YODA-MPK3/6 kaskády a tím i k inhibici počtu stomat (Kumari *et al.*, 2014) (Obr. 5). Stomata slouží také jako vstupní otvor pro bakterie (J. Zhang *et al.*, 2007; Melotto *et al.*, 2006). Konkrétně bakterie *Pseudomonas syringae* vnikne do hostitelské buňky přes stomata a uvolní efektor HopA1. Nadměrná exprese HopA1 efektoru deaktivuje MPK3/6, což má za následek zvýšenou tvorbu stomat v hostitelské rostlině (Kim *et al.*, 2012) (Obr. 5).

2.1.4.2 YODA a MPK3 při embryogenezi a vývoji rostlin

Vývoj *Arabidopsis thaliana* je striktně regulovaným procesem (Lau *et al.*, 2012). Asymetrické dělení je esenciální pro diferenciaci a dává za vznik různým buněčným typům (Smet a Beeckman, 2011). Tento proces je především důležitý při embryogenezi (Lau *et al.*, 2012), která začíná hned po fertilizaci. Nejdříve dochází k asymetrickému dělení zygoty a vzniká apikální a basální buňka. Apikální buňka se přeměňuje na embryo a basální buňka na suspensor, který slouží jako podpůrná struktura zajišťující přísun živin a hormonů (Kawashima a Goldberg, 2010). Pouze vrchní buňka suspensoru přispívá k samotnému vývoji embrya a tvoří embryonální základ kořene. Již při zygotickém dělení dochází k určení embryonálních a extraembryonálních buněk (Bayer *et al.*, 2017).

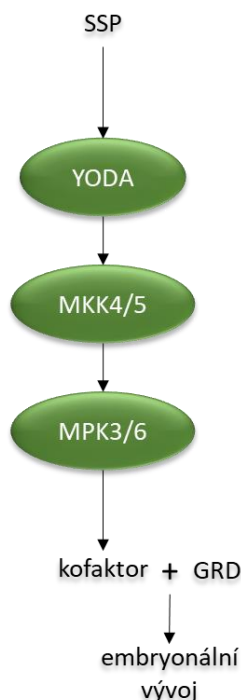
Dělení apikálních buněk u *A. thaliana* je kontrolováno MAPK signální kaskádou YODA-MKK4/5-MPK3/6, která iniciuje elongaci a embryonální polaritu v zygote (Musielak a Bayer, 2014) (Obr. 6). U mutantních rostlin *yda* bylo pozorováno rovnoměrné rozdělení zygoty a nedocházelo k vytvoření suspensoru z prekurzorů basálních buněk (Lukowitz *et al.*, 2004). Podobné defekty byly prokázány v mutantních rostlinách s vyřazenými *MKK4*, *MKK5*, *MPK3* a *MPK6* geny (Wang *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2017). Také bylo prokázáno, že konstitutivní exprese *YODA* v mutantních rostlinách vede k velkému počtu buněk suspensoru a struktur s nerozpoznatelnými embryi (Lukowitz *et al.*, 2004).

Při vývoji embrya je *YODA* kaskáda aktivována membránovou kinasou SHORT SUSPENSOR (SSP) (Bayer *et al.*, 2009) (Obr. 6). Tato pseudokinasa je součástí skupiny BRASSINOSTEROID SIGNALING kinas (BKS), které se zapojují do regulace růstu

a abiotických a biotických odpovědí rostliny (Li *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2013). Transkript *SSP* je tvořen pouze v samčích pohlavních buňkách v pylu a po fertilizaci je v zygotě produkován protein *SSP* (Bayer *et al.*, 2009). Nadexprese *SSP* aktivuje dráhu YODA-MKK4/5-MPK3/6 i v dalších pletivech (Bayer *et al.*, 2009).

Dalším důležitým regulátorem embryonálního vývoje je transkripční faktor GROUNDED (GRD) (Jeong *et al.*, 2011) (Obr. 6). U mutantních rostlin s vyřazeným genem *GRD* (*grd*) byly pozorovány podobné defekty v elongaci zygoty a tvorbě suspensoru jako u *yda* mutantů. Také bylo zjištěno, že při nadexpresi *YDA* nedochází k potlačení *grd* fenotypu, což naznačuje, že GRD je důležitý pro funkci YODA a zároveň, že protein GRD je regulován YODA kaskádou (Jeong *et al.*, 2011). Nicméně nebylo dokázáno, že protein GRD je přímým cílem YODA-MPK3/6 kaskády. Předpokládá se, že MAPK kaskáda YODA-MPK3/6 fosforyluje kofaktor, který poté společně s GRD ovlivňují embryonální vývoj rostlin (Jeong *et al.*, 2011) (Obr. 6).

K různým defektům u *yda* mutantních rostlin dochází i v postembryonálním vývoji. Typickým fenotypovým projevem u *yda* mutantních rostlin je trpasličí vzrůst, krátké a rozvětvené kořeny, malé listy a sterilní květy (Lukowitz *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007).



Obr. 6 Regulace embryonálního vývoje YODA kaskádou. YODA kaskáda je aktivována SHORT SUSPENSOR (SSP) kinasou, která dále aktivuje MAP3K YODA, MAP2K MKK4 a MKK5 a MAPK MPK3 a MPK6. Cílem kaskády YODA-MPK3-6 je kofaktor, který společně s transkripčním faktorem GROUNDED (GRD) reguluje embryonální vývoj.

2.1.5 Mitogen aktivovaná proteinkinasa 3 (MPK3)

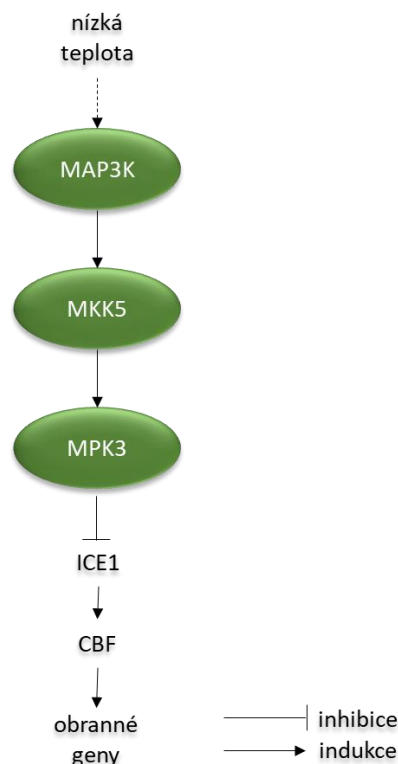
Mitogen aktivovaná proteinkinasa 3 (MPK3) je jedna z nejvíce studovaných MAPK. Jak již bylo zmíněno výše, MPK3 je MAPK patřící do skupiny A společně s MPK6 a MPK10 (Ichimura *et al.*, 2002). MPK3 se zapojuje do velkého množství signálních kaskád v buňce, jako jsou obranné reakce na biotické (Asai *et al.*, 2002) a abiotické stresy (Miles *et al.*, 2005; Yoo *et al.*, 2008), ale také do vývojových procesů v buňce např. u tvorby stomat nebo embrya (Bergmann, 2004; Musielak a Bayer, 2014) a při biosyntéze kamalexinu a ethylenu (Ren *et al.*, 2008; Yoo *et al.*, 2008).

Jak již bylo zmíněno výše, pro přežití musí rostliny reagovat na nepříznivé podmínky z okolí způsobující abiotický nebo biotický stres. Abiotický stres může být v rostlině vyvolán např. chladem, vysokou salinitou, UV zářením, nedostatkem vody nebo působením těžkých kovů a reaktivních forem kyslíku (Jones a Dangl, 2006; Tena *et al.*, 2001). Nejvíce studované MAPK zapojené do těchto stresových odpovědí jsou MAPKs skupiny A MPK3, MPK6 a MAPK ze skupiny B MPK4 (Colcombet a Hirt, 2008). Konkrétně bylo zapojení MPK3 studováno při reakcích rostliny na abiotický stres způsobený chladem (Li *et al.*, 2017), akumulaci reaktivních forem kyslíku (Kovtun *et al.*, 2000), vysokou salinitou prostředí (Droillard *et al.*, 2002) a intoxikací těžkými kovy (Liu *et al.*, 2010). Biotický stres je způsobený cizími organismy např. viry, bakteriemi nebo hmyzem. Role MPK3 byla prokázána při rozpoznání bakteriálního flagellinu flg22 (Asai *et al.*, 2002).

2.1.5.1 MPK3 a nízká teplota

Nízká teplota ovlivňuje metabolismus a transkripci, což má vliv na růst a vývoj, a tím rozšíření rostlin na celé planetě. Vystavením organismu chladu může dojít k adaptaci rostlin (Theocharis *et al.*, 2012), ale při působení extrémní teploty dochází ke změně vlastností některých buněčných struktur jako např. rigidity plasmatické membrány (Sangwan *et al.*, 2002),

Jedním z důležitých faktorů při adaptaci na chladnější podmínky je transkripční faktor ICE1 (Inducer of CBF expresion 1), důležitý pro aktivaci CBF faktorů (C-repeat binding factor) při expresi obranných genů (Thomashow, 1999). Bylo zjištěno, že při nízké teplotě je aktivována kaskáda MKK5-MPK3, která ICE1 protein destabilizuje, a tím negativně ovlivňuje adaptaci rostlin právě k chladnějšímu klimatu (Li *et al.*, 2017) (Obr. 7).



Obr. 7 MPK3 kaskáda při stresu z nízké teploty. Při nízké teplotě je aktivována příslušná MAP3K, která přenáší signál na MKK5 a poté na MPK3. MPK3 inhibuje transkripční faktor ICE1 (Inducer of CBF expression 1), který je důležitý pro aktivaci CBF (C- repeat binding factor) faktorů pro expresi obranných genů.

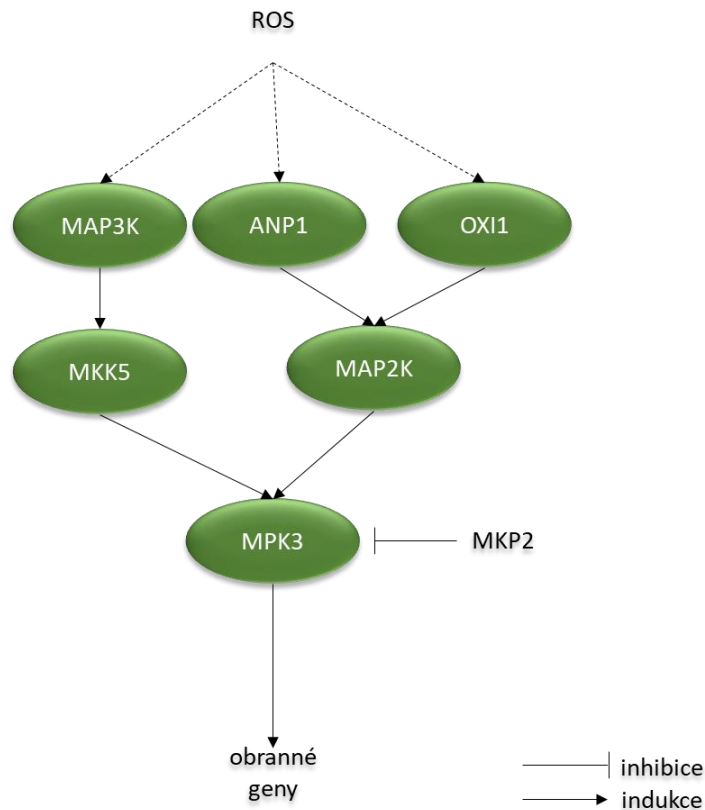
2.1.5.2 MPK3 a oxidativní stres

Reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou produktem aerobního metabolismu organismu (Suzuki *et al.*, 2011). Tvorba ROS v organismu je regulována antioxidantními enzymy jako je např. superoxiddismutasa nebo katalasa (Gill a Tuteja, 2010). Při nadměrné akumulaci ROS v organismu ochrana antioxidantními enzymy nestačí a dochází k oxidativnímu stresu. Nadměrná produkce ROS v organismu je nejčastěji způsobena různými stresory např. intoxikace těžkými kovy a ozónem nebo napadením patogenem (Liu *et al.*, 2010; Miles *et al.*, 2009; O'Brien *et al.*, 2012). Akumulací ROS v organismu je aktivována dráha MKK5-MPK3, která reguluje superoxiddismutasy a spouští expresi obranných genů (Miles *et al.*, 2009; Xing *et al.*, 2013) (Obr. 8).

Dále je při akumulaci ROS aktivována MAP3K ANP1 (*Arabidopsis* NPK1-related protein kinase 1), která fosforyluje MPK3 přes příslušnou MAP2K a výsledkem je regulace exprese obranných genů při stresových podmínkách (Kovtun *et al.*, 2000) (Obr. 8).

Dalšími regulátory MPK3 při oxidativním stresu je gen *OXI1*, který kóduje serin/threonin kinasu, která přes MAP2K fosforyluje MPK3. Nezbytnost *OXI1* genu byla dokázána studiem mutantních rostlin *oxi1*, kde bylo potvrzeno, že *OXI1* je nezbytný pro aktivaci MPK3 při oxidativním stresu (Kovtun *et al.*, 2000) (Obr. 8).

Regulátorem MPK3 při oxidativním stresu je také mitogen aktivovaná proteinkinasa fosfatasa 2 (MKP2). MKP2 defosforylací MPK3 způsobí vyšší odolnost rostliny vůči oxidativnímu stresu (Lee a Ellis, 2007) (Obr. 8).

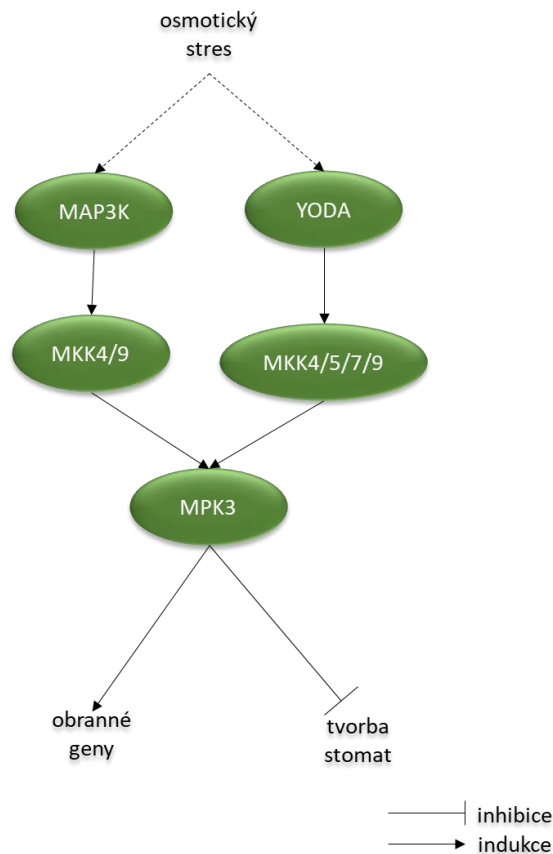


Obr. 8 Kaskáda MPK3 při oxidativním stresu. Při akumulaci ROS jsou přes příslušnou MAP3K aktivovány MKK5 a MPK3, které spouští expresi obranných genů. MPK3 může být také aktivována přes MAP3Ks ANP1 a OXI1, které fosforylují MAP2K, a ta poté MPK3. MPK3 je negativně regulována pomocí MKP (mitogen aktivovaná proteinkinasa fosfatasa), která fosforylovanou MPK3 deaktivuje defosforylací a ukončí přenos signálu (upraveno podle Kořistková, 2018).

2.1.5.3 MPK3 a osmotický stres

Osmotický stres rostlin je způsobený vysokými koncentracemi NaCl v půdě. Příčinou vysoké salinity půdy je nejčastěji vypařování, precipitace nebo zvětrávání hornin (Mahajan a Tuteja, 2005; Yadav *et al.*, 2011). Osmotický stres je způsoben toxicitou Na⁺ iontů. Bylo zjištěno, že většina rostlin nedokáže tolerovat vyšší koncentraci Na⁺ než 50 mM. Obranou organismu před vysokou koncentrací soli je aktivní odstraňování Na⁺ z buněk přes antiporter sensitive 1 (SOS1), který přenáší Na⁺ ionty ven a H⁺ ionty dovnitř buňky, dále pak přes HKT transportéry nebo NHX1 tonoplast transportéry (Munns a Tester, 2008). Vystavením vysoké koncentraci soli spouští v rostlině další procesy jako je např. akumulace oxidu dusnatého (Khan *et al.*, 2012), ROS nebo Ca²⁺ (Laohavisit *et al.*, 2012; Miller *et al.*, 2010).

Při osmotickém stresu jsou aktivovány dráhy MKK4/9-MPK3 (Kim *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2008) (Obr. 9). Bylo zjištěno, že mutantní rostliny *mkk4* jsou citlivější k vyšším koncentracím soli a dochází u nich ke snížené aktivitě MPK3 a vyšší ztrátě vody než v rostlinách kontrolních. Na druhou stranu u rostlin se zvýšenou expresí *MKK4* byla pozorována vyšší tolerance rostlin k solnému stresu, snížená ztráta vody a zvýšená aktivita MPK3 (Kim *et al.*, 2011). U mutantních rostlin s vyřazeným genem pro *MKK9* byla pozorována snášenlivost k solnému stresu na rozdíl od rostlin divokého typu, a to až do koncentrace 150 mM NaCl (Alzwi a Morris, 2007). Také bylo zjištěno, že *mpk3* mutantní rostliny vykazují hypersensitivní reakci na solný stres v porovnání s rostlinami ekotypu Col-0, z čehož vyplývá, že MPK3 je nezbytná pro reakci na osmotický stres (Pitzschke *et al.*, 2014). Také bylo dokázáno, že při osmotickém stresu je aktivována dráha YODA-MKK4/5/7/9-MPK3, která zamezuje tvorbě stomat (Kumari *et al.*, 2014) (Obr. 9) (viz. kapitola 2.1.4.1).



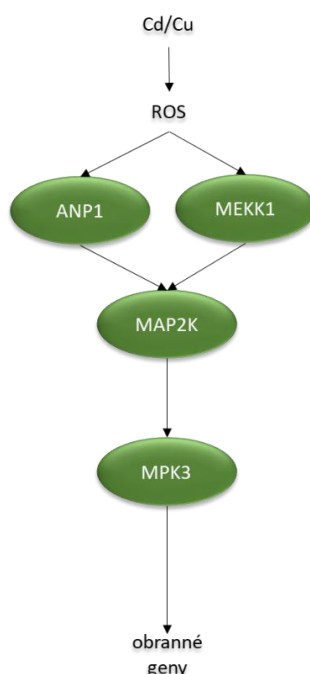
Obr. 9 Kaskáda MPK3 při osmotickém stresu. Při působení osmotického stresu je aktivována dráha MAP3K-MKK4/9-MPK3, která dále spouští expresi obranných genů. Při osmotickém stresu je také spuštěna kaskáda YODA-MPK3, která omezí tvorbu stomat.

2.1.5.4 MPK3 a těžké kovy

Těžké kovy např. měď, zinek, železo, kobalt a nikl jsou důležité pro správný vývoj a růst rostliny, ale stávají se toxickými při vyšších koncentracích. Naopak těžké kovy, které nejsou pro rostlinu esenciální, jako hliník, olovo nebo kadmium, mohou způsobovat různé fyziologické defekty i při nízkých koncentracích (Illés *et al.*, 2006; Shanmugaraj *et al.*, 2013). Při intoxikaci těžkými kovy většinou dochází k akumulaci reaktivních forem kyslíku (ROS) (Smeets 2009) a ovlivnění tvorby Ca^{2+} včetně aktivity různých proteinů např. MAPKs, G-proteinů nebo signálních procesů pomocí fosfolipidů (Jonak *et al.*, 2004; Opendakker *et al.*, 2012). Bylo prokázáno, že u *A. thaliana* dochází ke zvýšené expresi MPK3 a MPK6 při stresu z intoxikace těžkými kovy. Konkrétně byla úloha MPK3 studována při působení kadmíem a mědí, kde bylo zjištěno, že hladina exprese jednotlivých MAPK je vyšší v závislosti na čase působení těžkých kovů (Liu *et al.*, 2010; Opendakker *et al.*, 2012).

Kadmium, jak již bylo řečeno výše, je neesenciální těžký kov, který i při nízkých koncentracích způsobuje fyziologické defekty v rostlině. Především zapříčiňuje zpomalený růst kořenů, chlorózy listů (Nocito *et al.*, 2002; Wójcick a Tukendorf, 1999), pomalé otevírání stomat (Perfus-Barbeoch *et al.*, 2002) nebo vadnutí (Barceló a Poschenrieder, 1990). Kadmium také způsobuje inhibici fotosyntézy a transkripce (Nyitrai *et al.*, 2003) a modifikaci v genové expresi a enzymové aktivitě (Herbette *et al.*, 2006; Sarry *et al.*, 2006). Bylo dokázáno, že při intoxikaci Cd dochází k akumulaci ROS a poté k aktivaci MPK3 a MPK6 (Obr. 10). Také byla pozorována vyšší hladina těchto MAPK u *A. thaliana* v kořenech než v listech (Liu *et al.*, 2010; Opdenakker *et al.*, 2012).

Měď je esenciální pro správný růst a vývoj rostliny, ale při vyšších koncentracích způsobuje stejně jako kadmium morfologické poruchy u rostlin. Role MPK3 při intoxikaci Cu byla studována v *oxi1* mutantních rostlinách (Smeets *et al.*, 2013). OXI1 je součástí mnoha signálních kaskád a je aktivátorem MPK3 a MPK6 při oxidativním stresu (Rentel *et al.*, 2004). Bylo zjištěno, že v kontrolních rostlinách ekotypu Col-0 dochází při intoxikaci Cu ke zvýšené expresi *ANP1*, *MEKK1* a *MPK3* (Obr. 10). V *oxi1* mutantech naopak byla pozorována nízká hladina všech těchto MAPKs, což potvrzuje spojitost mezi oxidativním stresem a stresem způsobeným nadměrnou koncentrací těžkých kovů (Smeets *et al.*, 2013).



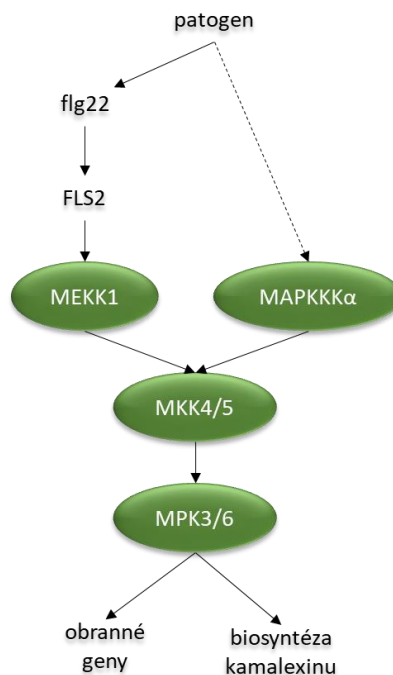
Obr. 10 Kaskáda MPK3 při intoxikaci těžkými kovy. Při intoxikaci těžkými kovy jako kadmium (Cd) a měď (Cu) dochází k akumulaci reaktivních forem kyslíku (ROS) v organismu, což vede k aktivaci MAP3Ks ANP1 a MEKK1, které dále přes příslušnou MAP2K fosforylují MPK3 a aktivovaná MPK3 spouští expresi obranných genů.

2.1.5.5 MPK3 v biotickém stresu

Rostliny musí reagovat na nepříznivé podmínky z okolního prostředí včetně cizích patogenů. Jednou z takových obranných strategií je rozpoznání efektorů patogenu nebo tzv. patogen asociovaných molekulárních vzorců (PAMPs) a rychlá aktivace obranných genů (1-4).

Mitogen aktivovaná proteinkinasa 3 (MPK3) se zapojuje do odpovědi na působení bakteriálního elicitoru flagellinu 22 (flg22) (Obr. 11). Tento elicitor je rozpoznáván receptorem FLAGELLIN SENSING 2 (FLS2), který aktivuje signální dráhu MEKK1-MKK4/5-MPK3/6 (Asai *et al.*, 2002) (Obr. 11).

Jak již bylo zmíněno výše, MPK3 a MPK6 se zapojují do biosyntézy kamalexinu (Ren *et al.*, 2008) (Obr. 11). Kamalexin patří do skupiny fytoalexinů, které působí jako antimikrobiální látky proti patogenům (15,16). MAPK kaskáda MAPKKK α /MEKK1-MKK4/5-MPK3/6 fosforyluje transkripční faktory a následně dochází k transkripci genů PHYTOALEXIN DEFICIENT 2 a 3 (PAD2/3) důležité pro biosyntézu kamalexinu (Ren *et al.*, 2008) (Obr. 11).



Obr. 11 Kaskáda MPK3 při biotickém stresu. Při napadení patogenem je rozpoznán bakteriální elicitor flagellin 22 (flg22) pomocí receptoru FLAGELLIN SENSING 2 (FLS2), který dále aktivuje dráhu MEKK1-MKK4/5-MPK3/6 a expresi obranných genů. Při nerozpoznání flg22 je spuštěna dráha MAPKKK α -MKK4/5-MPK3/6, která spouští biosyntézu kamalexinu.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Použité přístroje

- analytické váhy (XA 110/2X) (RADWAG, Polsko)
- automatické pipety (Eppendorf, Německo)
- centrifugy (ScanSpeed 1730R Refrigerated microcentrifuge) (Beckman Coulter Microfuge® 16, USA)
- dokumentační zařízení Geldoc™ MP (BioRad, USA)
- fytotron (Weiss Gallenkamp, UK)
- horizontální/vertikální agarosová elektroforéza (BioRad)
- inkubační termoblok (Bioer Thermocell Cooling & Heating Block CHB 202)
- konfokální skenovací laserový mikroskop (Zeiss) - LSM 710 Axio Imager 2 Zeiss s objektivem Plan-Apochromat 20x/0,8 M27
- laboratorní digestoř (M 1200) (MERCY, USA)
- magnetická míchačka (MSH-420) (BOECO, Německo)
- mikrocentrifugy (FVL-2400N Combi-Spin, Mini-Centrifuge/Vortex; Benchmark MyFuge™ Mini) (Benchmark Scientific, USA)
- pH metr (PC 2700, Eutech Instruments)
- předvážky (S1502, BEL Engineering, Itálie)
- spektrofotometr pro měření koncentrace DNA, RNA a proteinů (Thermo Scientific NanoDrop™ Lite Spectrophotometer) (Thermo Scientific, USA)
- thermocykler (MyCycler™ Personal Thermal Cycler Bio-Rad) (BioRad)
- zařízení pro přípravu MilliQ vody (Millipore SIMSV0001 Simplicity UV WaterPurification System) (Merk, Německo)

3.1.2 Software pro zpracování výsledků

- ApE – A plasmid editor
- SnapGene
- ImageLab™ (BioRad)
- Zen Blue/Black (Zeiss)

3.1.3 Enzymy a chemikálie

Standardy pro elektroforézu

- GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (ThermoFisher Scientific)
- Precision Plus Protein™ Dual Color Standard (BioRad)

Chemikálie na PCR

- DreamTaq polymerasa, 10x DreamTaq PCR MasterMix pufr (Thermo Scientific, USA)
- iProof™ High-Fidelity DNA Polymerasa, 5x iProof HF pufr, dNTP mix nukleotidů (BioRad, USA)
- betain, DMSO (BioRad, USA)

Použité Kity

- QIAprep Spin Miniprep kit 250 (QIAGEN, Nizozemsko)
- Phire Plant Direct PCR kit (Thermo Fisher Scientific)
- Diffinity Rapid Tip (Sigma-Aldrich)

Antibiotika

- Spectinomycin, Gentamycin, Kanamycin, Fosfomicin (BioRad)

Ostatní chemikálie

agar (Sigma-Aldrich), agarosa (Sigma-Aldrich), hovězí sérový albumin (BSA) (Sigma-Aldrich), dry milk blocker (Sigma-Aldrich), kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) (Sigma-Aldrich), 70 % ethanol, 96 % ethanol, fluorid sodný (Sigma-Aldrich), guma gellan (Sigma-Aldrich), glycerol (Sigma-Aldrich), hydroxid draselný (Sigma-Aldrich), chlorid hořečnatý (Sigma-Aldrich), 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonová kyselina (HEPES) (Duchefa), chlorid sodný (Sigma-Aldrich), isopropanol (Sigma-Aldrich), 4x Laemmli pufr (Bio-Rad), 6x Gel Loading dye (Thermo Fisher Scientific, USA), β-merkapt ethanol (Sigma-Aldrich), methanol (Sigma-Aldrich), Midori green DNA Staining Solution (Genetics, Německo), 2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina (MES) (Sigma-Aldrich), Murashige – Skoog médium bez vitamínů (Duchefa), peroxid vodíku (Sigma-Aldrich), phytoagar (Sigma-Aldrich), Ponceau S, sacharosa (Sigma-Aldrich), tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) (Sigma-Aldrich), Tween 20 (Sigma-Aldrich), YEB *Agrobacterium* grow médium (Duchefa)

3.1.4 Složení médií a roztoků

3.1.4.1 Použité kultivační média

Lysogeny broth (LB) médium tekuté (1 l)

- LB médium (Sigma Aldrich) 25 g

Doplněno milliQ dH₂O na celkový objem 1 l, pH 7,2 upraveno pomocí NaOH (0,1M; 1M), sterilizováno autoklávováním (teplota 121 °C; přetlak 1,2 kg/cm²) po dobu 30 min.

YEB médium tekuté (1 l)

- YEB *Agrobacterium* growth médium (Sigma Aldrich) 16,3 g

Doplněno milliQ dH₂O na celkový objem 1 l, pH 7,2 upraveno pomocí KOH (0,1M; 1M), sterilizováno autoklávováním (teplota 121 °C; přetlak 1,2 kg/cm²) po dobu 30 min.

½ MS (Murashige-Skoog) médium pevné (1 l)

- MS bez vitamínů 2,2 g
- sacharosa 10 g
- MES 1 g
- guma gellan/agar 6 g

Doplněno milliQ dH₂O na celkový objem 1 l, pH 5,8 upraveno pomocí KOH (0,1M; 1M), sterilizováno autoklávováním (teplota 121 °C; přetlak 1,2 kg/cm²) po dobu 30 min.

3.1.4.2 Použité roztoky a gely

50x TAE pufr pro agarosovou elektroforézu (1 l)

- ledová kyselina octová 57,1 ml
- 0,5M EDTA (pH 8,0) 100 ml
- Tris 242 g

1x TAE pufr pro agarosovou elektroforézu (1 l)

- 50x TAE 20 ml
- dH₂O 980 ml

1 % Agarosový gel na gelovou elektroforézu (100 ml)

- agarosa 1 g
- 1x TAE pufru 100 ml

Po rozpuštění agarosy a zchladnutí směsi na cca 50 °C přidáno barvivo Midori green DNA Staining Solution (2 µl/100 ml gelu).

Pufr E pro extrakci proteinů (100 ml)

- HEPES, pH 7,5 (NaOH) 1,19 g
- NaCl 0,43 g
- EGTA 0,038 g
- MgCl₂ 0,0095 g
- NaF 0,004 g
- glycerol 10 %

Před použitím přidány inhibitory proteas a fosfatas (na 1 ml pufru E)

- 1M DTT 1 µl
- Complete™ 20 µl
- PhoStop™ 100 µl

10x elektrodový pufr (1 l)

- Tris 30 g
- Glycin 144 g
- SDS 10 g

1x elektrodový pufr (1 l)

- 10x elektrodový pufr 100 ml
- dH₂O 900 ml

10x transferový pufr (1 l)

- Tris 30 g
- Glycin 144 g

1x transferový pufr (1 l)

- 10x transferový pufr 100 ml
- methanol 100 ml
- dH₂O 800 ml

10x TBS pufr (1 l)

- Tris/HCl pH 7,4 24,2 g
- NaCl 82,8 g

1x TBS – T pufr (1l)

- 10x TBS 100 ml
- Tween 20 1 ml
- dH₂O 900 ml

Ponceau S (100 ml)

- Ponceau S rozpuštěný ve 100 ml 5% kyselině octové 1 mg

Roztoky pro přípravu chemokompetitivních buněk *E. coli***Roztok A**

- 10mM Tris-HCl pH 7,6
- 100mM MgCl₂

Roztok B

- 10mM Tris-HCl pH 7,6
- 100mM CaCl₂

Roztok C

- 10mM Tris-HCl pH 7,6
- 100mM CaCl₂
- 15% glycerol

3.1.5 Použité bakteriální kmeny

- *Escherichia coli* TOP10
- *Escherichia coli* DB3.1
- *Agrobacterium tumefaciens* GW3101

3.1.6 Použité plasmidy

Použité plasmidy pro klonování metodou Gateway® technologie jsou pro přehlednost seřazeny v Tab. 1. Jako kontrola pro PCR reakci byl použit plasmid 35S::cYODA:GFP (Samakovli et al., 2020).

Tab. 1 Tabulka použitých vektorů pro klonování technologií Gateway®.

Vektor	Typ vektoru	Bakteriální/ rostlinná rezistence	Gateway® kazeta	Promotor/ fúzní značka
pDONR207	donor	Gen ^r /-	<i>attP1-ccdB-Cm^r-attP2</i>	no pro/no tag
pGWB404	destinační	Spc ^r /Km ^r	<i>attR1-Cm^r-ccdB-attR2- sGFP-T_{NOS}</i>	no pro/C-sGFP
pGWB450	destinační	Spc ^r /Km ^r	<i>attR1-Cm^r-ccdB-attR2- G3GFP-T_{NOS}</i>	no pro/C-G3GFP
pGWB453	destinační	Spc ^r /Km ^r	<i>attR1-Cm^r-ccdB-attR2- mRFP-T_{NOS}</i>	no pro/C-mRFP
pGWB459	destinační	Spc ^r /Km ^r	<i>attR1-Cm^r-ccdB-attR2- taqRFP-T_{NOS}</i>	no pro/C-tagRFP

Legenda: donor – donorový vektor pro Gateway® klonování; destinační – destinační vektor pro Gateway® klonování; Gen – gentamycin; Spc – spectinomycin; Km – kanamycin; Cm – chloramfenikol; *att* – rekombinační místa pro Gateway® klonování; GFP – zelený fluorescenční protein; RFP – červený fluorescenční protein; no pro – žádný promotor; no tag – žádná fúzní značka

3.1.7 Rostlinný materiál

- *Nicotiana benthamiana* – divoký typ
- *Arabidopsis thaliana*:
 - ekotyp Columbia (Col-0)
 - mutant *mpk3-5*, generace T3, homozygotní linie 1/14_7 (Janálová, 2018; Samakovli et al., 2020)
 - T-DNA *mpk3-1* mutantní linie (Alonso et al., 2003)

3.2 Metody

3.2.1 PCR amplifikace genu *YODA* s nativním promotorem

Pro PCR amplifikující gen *YODA* s nativním promotorem byly navrženy primery dle podmínek výrobce GW technologie s příslušnými rekombinačními místy (Tab. 2). Byla připravena reakční směs obsahující 5x iProof HF pufru o koncentraci 1x, 0,5 μ M primeru 1 nebo 3 a 0,5 μ M primeru 2 nebo 4 (Tab. 2), 200 μ M dNTP mix, 0,02 U/ μ l iProof DNA polymerasy, 1,3 % DMSO, 26 % betainem a 1 μ l/10 μ l reakce templátové DNA. Reakce byla doplněna na výsledný objem 100 μ l deionizovanou vodou pro PCR a reakční směs byla rozdělena do čtyř mikrokumavek. Jako templát byla použita vyzolovaná genomová DNA z *A. thaliana* ekotypu Col-0 o koncentraci 50 ng/ μ l. Podmínky pro PCR byly nastaveny podle Tab. 3.

Tab. 2 Sekvence použitých primerů

Primer	Sekvence
primer 1	5'GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCCTAATATGTGTATAATAC ACGTACC-3'
primer 2	5- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTGGGTCCTCTGTTTGTGATCC - 3'
primer 3	5' - GGTACCGGGTCCTCTGTTTGTGATCC - '3
primer 4	5' - GGGACTAGTATGCCTTGGTGGAGTAAATCAAAGATG - 3'

Legenda: primer 1 a primer 2 – amplifikace genu *YODA* s nativním promotorem; primer 3, 4 – kontrolní PCR amplifikace úseku plasmidu *35S::YODA:GFP*

Tab. 3 Podmínky PCR reakce

Krok	Fáze	Teplota	Čas	Počet opakování
1	iniciační denaturace	98 °C	1'30''	1
2	denaturace	98 °C	10''	30
3	annealing primerů	50 °C	30''	
4	elongace	72 °C	3'10''	
5	finální elongace	72 °C	7'	1

3.2.2 Agarosová elektroforéza

Pro ověření průběhu PCR reakce byla použita agarosová elektroforéza v 1% agarosovém gelu. Ze vzorků po PCR byly odebrány 2 μ l reakční směsi a smíchány se 3 μ l PCR vody a 1 μ l 6x Gel Loading dye. Pro vizualizaci DNA bylo do gelu přidáno barvivo Midori Green DNA Staining Solution (2 μ l/100 ml gelu). Gel byl zalit 1x TAE pufrem v elektroforetické vaně a elektroforéza probíhala při konstantním napětí 90 V. Po 40 min byl gel zdokumentován pomocí zařízení GeldocTM EZ a výsledek vyhodnocen pomocí programu ImageLab. Produkty PCR byly přečištěny pomocí Diffinity Rapid Tip (Sigma-Aldrich) a jejich koncentrace byla změřena na NanoDropu.

3.2.3 BP reakce a LR reakce Gateway® klonování

Pro BP reakci byla připravena reakční směs o celkovém objemu 10 μ l obsahující přečištěný PCR produkt, gen YODA pod nativním promotorem ohraničeným attB místy (900 ng), donorový vektor *pDONR207* (300 ng) a enzym BP Clonasa II (2 μ l). Reakční směs byla následně inkubována při 25 °C přes noc. Následující den byla provedena transformace chemokompetentních *E. coli* TOP10.

Pro LR reakci byla připravena reakční směs o celkovém objemu 10 μ l obsahující entry klon *pDONOR207:pgYODA* (300 ng), destinační vektory (viz Tab. 1) (300 ng) a enzym LR Clonasa II (2 μ l). Reakční směs byla následně inkubována při 25 °C přes noc a následující den byla provedena transformace chemokompetentních *E. coli* TOP10.

3.2.4 Příprava chemokompetentních buněk *E. coli*

Ze zmrazených kompetitivních buněk *E. coli* TOP10 bylo sterilně odpipetováno 30 μ l buněk do 3 ml čistého tekutého LB média bez antibiotik. Suspenze byla kultivována přes noc na třepačce při 140-230 RPM při 37°C. Následující den byla suspenze přelita do 100 ml čistého LB média bez antibiotik a kultivována na třepačce při 140-230 RPM a 37 °C do hodnoty OD₆₀₀ 0,4-0,6. Poté byla suspenze ponechána na ledu 10 min a následně centrifugována při 5000-7000 RPM při 4 °C po dobu 20 minut. Pelet byl resuspendován v roztoku A (1 ml/40 ml suspenze) (viz. str. 26). Suspenze byla ponechána 20-30 minut na ledu a následně centrifugována při 5000-7000 RPM při 4 °C po dobu 20 min.

Pelet byl rozsuspendován v roztoku B (1 ml/40 ml suspenze) (viz. str. 26). Suspenze byla ponechána 30 min na ledu a následně centrifugována při 5000-7000 RPM při 4 °C po dobu 20 min. Pelet byl rozsuspendován v roztoku C (viz. str. 26) a suspenze byla rozpipetována po 100 µl do vychlazených sterilních 2 ml mikrozkuavek, zamrazena v tekutém dusíku a uchována v -80 °C.

3.2.5 Transformace *E. coli* teplotním šokem

Chemokompetentní buňky *E. coli* byly vytaženy z hlubokomrazicího boxu (-80 °C) a ponechány na ledu. Po rozmrznutí byly buňky jemně promíchány poklepem a byl k nim přidán celý objem BP nebo LR reakce (10 µl). Buňky byly ponechány na ledu 30 minut a poté byl proveden teplotní šok ve vodní lázni po dobu 50 s a při teplotě 42 °C. Následně byly buňky ponechány 2 min na ledu. Do každé mikrozkuavky byl přidán 1 ml sterilního LB média a mikrozkuavky byly umístěny na třepačku po dobu 2 hodin (37 °C, 250 RPM). Po kultivaci byla bakteriální suspenze centrifugována 30 s až 1 min, 12000 g a přibližně 1 ml čirého LB média byl odpipetován. Ve zbytku média byly buňky resuspendovány a následně rozetřeny hokejkou ve sterilním boxu na Petriho misky s tuhým LB médiem a obsahem Gentamycinu (BP) nebo Spectinomycinu (LR) o koncentraci 50 µg/ml. Misky byly kultivovány dnem vzhůru v inkubátoru při 37 °C přes noc. Následující den byly misky zalepeny parafilmem a přemístěny do lednice.

3.2.6 Transformace *A. tumefaciens* nízkou teplotou

Chemokompetentní buňky *A. tumefaciens* byly vytaženy z hlubokomrazicího boxu (-80 °C) a ponechány na ledu do rozmrznutí. K buňkám byl přidán 1 µl příslušného plasmidu a směs byla ponechána na ledu po dobu 30 min. Následně byla provedena transformace nízkou teplotou v tekutém dusíku po dobu 50 s. Po transformaci byly buňky ponechány 2 min v pokojové teplotě a poté k nim byl přidán 1 ml čistého LB média. Buňky byly následně kultivovány na třepačce při 200 RPM po dobu 3 hod a při teplotě 28 °C. Poté byly buňky stočeny a byl odpipetován 1 ml čirého média. Ve zbytku média byl rozsuspendován pelet a bakteriální suspenze byla rozetřena hokejkou ve sterilním boxu na Petriho misky s pevným LB médiem s obsahem spectinomycinu o koncentraci 50 µg/ml. Misky byly kultivovány dnem vzhůru v inkubátoru při 28 °C přes 2 noci. Poté byly misky zaparafilmovány a přemístěny do ledničky. Kolonie byly dále testovány a pozitivní kolonie byly kultivovány.

Z pozitivních kolonií byly připraveny glycerolové zásobní roztoky tak, že bylo odebráno 100 μ l kultury, která byla následně rozpuštěna ve 400 μ l 50% glycerolu. Poté byly glycerolové zásobní roztoky zmrazeny v tekutém dusíku a uskladněny v hlubokomrazícím boxu.

3.2.7 Colony PCR

Pro ověření pozitivních kolonií pro buňky *E. coli* po transformaci byla provedena Colony PCR. Jednotlivé kolonie narostlé na Petriho miskách byly rozsuspendovány v 10 μ l PCR dH₂O. Tyto suspenze byly použity jako templát pro PCR reakci. Byla připravena reakční směs obsahující 5 μ M primer 1 a 5 μ M primer 2 (Tab. 5), 1x koncentraci 10x DreamTaq PCR MasterMix pufru, 10 mM dNTPs mix, 0,025 U/1 μ l DreamTaq polymerasy a 1 μ l DNA templátu. Reakce byla doplněna na výsledný objem 10 μ l deionizovanou dH₂O. Podmínky reakce byly nastaveny podle Tab. 6. Průběh reakce byl následně ověřen pomocí agarosové elektroforézy.

Tab. 5 Sekvence primerů pro Colony PCR

Primer	Sekvence
primer 1A	5' - TCGCGTTAACGCTAGCATGGATCTC -3'
primer 2A	5' -GTCATGTGCATGACTTGGTTGAGC- 3'
primer 1B	5- TGTA AAAACGACGGCCAGT - 3'
primer 2B	5' - GACAGA AACTCCGATTTTGTCTG – 3'
Primer 2C	5' - CAGGAAACAGCTATGACCATG - 3'

Legenda: Primery 1A a 2A - Colony PCR pozitivních kolonií *E. coli* po BP reakci; primery 1B a 2B – Colony PCR pozitivních kolonií *E. coli* po LR reakci; primery 1B a 2C – primery pro Colony PCR pozitivní kontrolu.

Tab. 6 Nastavení PCR reakce pro Colony PCR

Krok	Fáze	Teplota	Čas	Počet opakování
1	iniciační denaturace	95 °C	2'	1
2	denaturace	95 °C	30''	35
3	annealing primerů	53 °C	30''	
4	elongace	72 °C	2'30''	
5	finální elongace	72 °C	10'	1

3.2.8 Kultivace pozitivních kolonií a izolace plasmidové DNA

Pozitivní kolonie *E. coli* byly kultivovány přes noc v 3 ml LB média s přidavkem příslušného antibiotika (1:1000) při 37 °C. Následující den bylo 100 µl bakteriální kultury odebráno, ze které byly připraveny glycerolové zásobní roztoky.

Zbytek kultury byl použit na izolaci plasmidové DNA. Plasmidová DNA byla izolována pomocí QIAprep Spin Miniprep kit (250) (QIAGEN) podle přiloženého návodu. Čistý plasmid byl eluován v 35 µl dH₂O a jeho koncentrace byla změřena pomocí NanoDropTM Lite spektrofotometru.

3.2.9 Restrikční štěpení

Pro ověření správnosti rekombinantního plasmidu bylo provedeno restrikční štěpení. Byla připravena reakční směs obsahující 1 µl 10xRestriction Enzyme buffer, 0,5 µl příslušného enzymu a 300-500 ng plasmidu. Reakce byla doplněna na výsledný objem 10 µl deionizovanou dH₂O. Reakční směs byla ponechána ve 37 °C 1h – přes noc a dále byla ověřena pomocí agarosové elektroforézy.

3.2.10 Transientní transformace listů *N. benthamiana*

Požadované kmeny *A. tumefaciens* byly vytaženy z hlubokomrazicího boxu a nechány rozmrazit na ledu. Do 1 ml čistého LB média s přidavkem 150 µM spektinomycinu bylo napipetováno 10 µl bakteriální kultury, která byla poté kultivována přes noc při 28 °C ve tmě a za stálého třepání na třepačce s kruhovým třepáním (200 rpm). Následující den byla proměřena hustota bakteriální suspenze na spektrofotometru při OD₆₀₀ a v případě nutnosti doředěna pomocí LB média na OD₆₀₀ s hodnotou 0,7. Následně byly suspenze centrifugovány 6 min při 3000 g a supernatant byl odstraněn. Pelet byl rozsuspendován v pufru obsahující 10mM MES, 150µM acetosyringon a 10 mM MgCl₂. Vzorky byly inkubovány po dobu 2 hod ve tmě při pokojové teplotě. Pomocí injekční stříkačky bez jehly byly suspenze vtlačovány do spodní strany listu *N. benthamiana*. Po agroinfiltraci byly rostliny *N. benthamiana* zakryty do mikrotenového sáčku a ponechány při 23 °C přes noc ve vlhké komůrce. Po třech dnech byla sledována účinnost agroinfiltrace pomocí konfokálního mikroskopu.

3.2.11 Sterilizace a výsev semen *A. thaliana*

Sterilizace semen *A. thaliana* byla provedena ve sterilních podmínkách flowboxu. Semena byla odsypána do 1,5 ml sterilní mikrozkuřavky. Semena byla kultivována za mírného třepání po dobu 5 min v 1 ml 70% ethanolu. Následně byl 70% ethanol odpipetován a k semenům byl přidán 1 ml 96% ethanolu. Semena byla kultivována v 96% ethanolu po dobu 1 min a následně byl 96% ethanol odpipetován. Nakonec byla semena dvakrát promyta v 1 ml dH₂O vždy po dobu 5 min. Poté byla semena přenesena na filtrační papír do sterilní Petriho misky a po uschnutí byla miska zalepena parafilmem a doskladněna v 4 °C.

Výsev semen byl proveden ve flowboxu. Semena byla vyseta na Petriho misky se sterilním ½ MS médiem a příslušným antibiotikem. Následně byly misky zalepeny prodyšnou lepicí páskou. Misky byly uloženy do lednice přes noc. Následující den byly misky přemístěny do fytotronu a kultivovány ve vertikální poloze při 23 °C v režimu dlouhého dne (16 hod světlo/8 hod tma, intenzita světla 80 μmol/m²/s a vlhkost 70 %).

3.2.12 Selekcce Crispr/Cas9 *mpk3-5* mutantů *A. thaliana*

Z 14denních semenáčků homozygotních mutantních linií Crispr/Cas9 *mpk3-5* byly ve flowboxu odstřiženy stejně velké listy. Listy byly následně přeneseny na Petriho misku s čistým ½ MS médiem s přídavkem fosfinotricinu (50μM). Misky byly zalepeny parafilmem a poté přeneseny do fytotronu a následně kultivovány v horizontální poloze při 23 °C v režimu dlouhého dne (16 hod světlo/8 hod tma, intenzita světla 80 μmol/m²/s a vlhkost 70 %) po dobu 7 dní. Po 7 dnech byl výsledek zdokumentován fotoaparátem.

3.2.13 Selekcce T-DNA *mpk3-1* mutantů *A. thaliana*

Z 10-20denních T-DNA *mpk3-1* mutantních rostlin *A. thaliana* byla extrahována gDNA pomocí Phire Plant Direct PCR kitu. Ze semenáčků byl odštrihnut list, který byl následně rozmělněn pomocí špičky ve 20 µl dilučního pufru v mikrozkuhavce. Poté byly vzorky ponechány minimálně 1,5 hod na ledu a extrahovaná gDNA v dilučním pufru byla použita jako templát pro PCR.

Pro genotypizaci pomocí PCR byly pro každý vzorek připraveny 2 reakční směsi, každá o celkovém objemu 10 µl obsahující extrahovanou gDNA (0,25 µl), 2x Phire Plant PCR pufr s nukleotidy (5 µl), Phire[®] Hot Start DNA polymerasu II (0,2 µl), primer F (0,5 µM) a primer R (0,5 µM). První reakční směs obsahovala oba primery pro *MPK3* gen (LP, RP) a druhá reakční směs obsahovala primer pro T-DNA inzert (LB) a *MPK3* gen (RP) (Tab. 7). Podmínky PCR reakce byly nastaveny podle Tab. 8. Výsledek průběhu PCR reakce byl následně ověřen agarosovou elektroforézou.

Tab. 7 Sekvence primerů pro selekci T-DNA mutantů

Primer	umístění	Sekvence
primer RP	MPK3 gen	5'-CTGCCTTTTCACGGAATATG-3'
primer LP	MPK3 gen	5'-ATTTTTGTCAACAATGGCCTC-3'
Primer LB	T-DNA inzert	5'-ATTTTGCCGATTTTCGGAAC-3'

Tab. 8 Nastavení PCR reakce pro selekci T-DNA mutantů

Krok	Fáze	Teplota	Čas	Počet opakování
1	iniciační denaturace	98 °C	5'	1
2	denaturace	98 °C	5''	40
3	annealing primerů	63 °C	5''	
4	elongace	72 °C	25''	
5	finální elongace	72 °C	1'	1

3.2.14 Stabilní transformace *A. thaliana* metodou floral dip

Z 5 až 6 týdnů starých rostlin *A. thaliana* byly uštíženy první květonosné lodyhy. Týden po ošťihání byly rostliny použity ke stabilní transformaci metodou floral dip (Clough a Bent, 1998; Davis *et al.*, 2009). Požadované kmeny *A. tumefaciens* obsahující příslušné konstrukty (Tab. 9) byly nechány na ledu rozmraznout. Následně bylo 10 μ l bakteriální kultury zaočkováno do 10 ml YEB kultivačního média s přidavkem 150 μ M spectinomycinu a 105 μ M gentamycinu. Bakteriální suspenze byla kultivována 1 až 2 dny do saturovaného stavu za stálého třepání 250 rpm při teplotě 28 °C. Saturovaná kultura byla 50x zředěna čistým YEB kultivačním médiem bez přidání antibiotik a následně kultivována při 28 °C a stálého třepání do hodnoty OD₆₀₀ 0,8 až 1. Bakteriální suspenze byla proměřena na spektrofotometru a naředěna na hodnotu OD₆₀₀ 0,8. K bakteriální kultuře byl přidán Silwet star (150 μ l/500 ml kultury) a kultura byla promíchána skleněnou tyčinkou. Nadzemní části rostlin *A. thaliana* byly 2x po sobě na 10 s ponořeny do bakteriální suspenze, jemně otřeny a zabaleny do mikrotenového sáčku k vytvoření vlhké komůrky. Rostliny byly kultivovány 20 h v temnu a následně přeneseny do fytotronu. Po 14 dnech byla metoda opakována pro zvýšení výtěžku transformace. Rostliny byly ponechány ve fytotronu a semena sesbírána, očištěna a vysušena a dále uskladněna v mikrozskumavkách.

Tab. 9 Použité *Agrobacterium tumefaciens* s příslušnými konstrukty a resistencí na antibiotika

Vektor	Bakteriální resistance/Rezistence v rostlinách
<i>pYODA::gYODA:GFP</i> v pGWB404	spectinomycin, gentamycin/kanamycin
<i>pYODA::gYODA:taqRFP</i> v pGWB453	spectinomycin, gentamycin/kanamycin
<i>pMPK3::gMPK3:mCherry</i> v pB7m34GW	spectinomycin, gentamycin /fosfotricin

3.2.15 Selekce transformovaných semen *A. thaliana*

Sesbíraná semena z transformovaných rostlin *A. thaliana* metodou floral dip byla sterilizována a následně vyseta ve flowboxu na Petriho misky s pevným $\frac{1}{2}$ MS médiem s přidavkem 50 μ M fosfotricinu (PPT) nebo 100 μ M kanamycinu (Km) podle vloženého konstruktů (Tab. 9). K zamezení růstu bakterií *A. tumefaciens* byl do média přidán ticarcillin o výsledné koncentraci 260 μ M. Misky byly sterilně zalepeny parafilmem a kultivovány ve vertikální poloze po dobu 7 dní při 23 °C za podmínek dlouhého dne (16 hod světlo/8 hod tma, intenzita světla 80 μ mol/m²/s a vlhkost 70 %). Výsledek byl zdokumentován na fotoaparát.

3.2.16 Genotypizace transformovaných rostlin *A. thaliana*

Ze stejně starých rostlin *A. thaliana* pěstovaných *ex vitro* byla extrahována gDNA pomocí Phire Plant Direct PCR kitu. Z rostlin byl odříznut stejně velký list, který byl rozmělněn ve 20 μ l dilučního pufru v mikrozkuhavce. Vzorky byly nechány minimálně 1,5 hod na ledu a vyextrahovaná gDNA byla použita jako templát pro PCR.

Pro genotypizaci pomocí PCR byla připravena pro každý vzorek reakční směs obsahující 2 μ l 5x Phire Plant PCR pufru bez nukleotidů, 0,2 μ l dNTPs, 0,2 μ l Phire[®] Hot Start DNA polymerasy II, 0,5 μ M primeru F a 0,5 μ M primeru R (Tab. 10) a 0,25 μ l templátové DNA. Reakční směs byla doplněna na výsledný objem 10 μ l destilovanou vodou. Podmínky reakce byly nastaveny podle Tab. 11. Výsledek PCR reakce byl vyhodnocen agarosovou elektroforézou.

Tab. 10 Sekvence primerů pro genotypování transformovaných rostlin *A. thaliana*

Primery	Sekvence
Primer F pro <i>pYODA::gYODA:GFP</i>	5' - GGTTTCGTA ACTAAACAAGTCTGG -3'
primer R pro <i>pYODA::gYODA:GFP</i>	5' - GGG TGT TCT GCT GGT AGT G - 3'
primer F pro <i>pMPK3::gMPK3:mCherry</i>	5' - GGAAACAGTACTTCTTGTACCAGC -3'
Primer R pro <i>pMPK3::gMPK3:mCherry</i>	5' - CCATGGTCTTCTTCTGCATTACG -3'

Tab. 11 Nastavení PCR reakce pro genotypování transformovaných rostlin *A. thaliana*

Krok	Fáze	Teplota	Čas	Počet opakování
1	iniciační denaturace	98 °C	5'	1
2	denaturace	98 °C	5''	40
3	annealing primerů	a/b °C	5''	
4	elongace	72 °C	x/y''	
5	finální elongace	72 °C	1'	1

Legenda: a – teplota nasedání primerů pro genotypizaci YODA-GFP mutantů 62 °C; b – teplota nasedání primerů pro genotypizaci MPK3-mCherry mutantů 64 °C; x – doba elongace při genotypizaci YODA-GFP mutantů 30 s; y – doba elongace při genotypizaci MPK3-mCherry mutantů 25 s.

3.2.17 Extrakce proteinů

Z pozitivních rostlin z genotypizace byly odštíhnuty listy a následně zmrazeny a homogenizovány v tekutém dusíku na prášek. Ke vzorkům byl přidán extrakční pufr E s inhibitory fosfatas a proteas v poměru 1 µl/1 mg rostlinného materiálu. Vzorky byly ponechány na ledu po dobu 1 hod a následně centrifugovány 10 min při 9000 g a 4 °C. Následně byl supernatant přepipetován do čistých mikrozkušavek. Koncentrace proteinů byla měřena na NanoDropTM Lite spektrofotometru.

3.2.18 SDS-PAGE elektroforéza

K extrahovaným proteinovým vzorkům byl přidán 4x Laemmli pufr obsahující 5% β-merkapt ethanol, poté byly vzorky denaturovány při teplotě 95 °C po dobu 5 min na termobloku. Na SDS-PAGE elektroforézu byl použit 10% polyakrylamidový gel připravený pomocí 10% FastCastTM Acrylamide Solutions kitu. Gel byl připevněn do elektroforetické vany a vana i meziprostor mezi gely byly zalaty 1x elektrodoým pufrem. Do první jamky byl napipetován proteinový standard o objemu 3 µl (Precision Plus ProteinTM Dual Colour Standards) a do dalších vzorky obsahující stejné množství proteinů (20-50 µg proteinů) podle detekovaného proteinu. Elektroforéza v denaturujících podmínkách probíhala 10 min při konstantním napětí 100 V a následně 1 h při konstantním napětí 160 V.

3.2.19 Western-blot analýza

Po SDS-PAGE elektroforéze byly proteiny přeneseny z gelu na PVDF membránu. PVDF membrána byla rehydratována v methanolu po dobu 10 s a poté i s gelem byla inkubována za mírného kývání v 1x transferovém pufru po dobu 10 min. Pro přenos byla připravena komůrka, která byla vložena do elektroforetické vany a zalita 1x transferovým pufrem. Transfer proteinů na membránu probíhal 10 min při konstantním napětí 100 V a následně při konstantním napětí 16 V přes noc. Druhý den bylo napětí nastaveno opět na 100 V na 10 min. Po přenosu byla PVDF membrána s proteiny 10 s barvena v Ponceau S pro ověření transferu proteinů a poté byla odbarvena v 1x TBS-T.

Vymytá membrána byla blokována 1 hod při mírném kývání v roztoku 5% sušeného mléka a 5% BSA v 1x TBS-T. Následně byla membrána krátce promyta v 1x TBS-T a následně inkubována s primární protilátkou (Tab. 12) při pokojové teplotě a mírném kývání. Po inkubaci byla membrána opět promyta v 1x TBS-T (6x10 min). Následovala inkubace membrány se sekundární protilátkou proti primární protilátce konjugovanou s křenovou peroxidasou (Tab. 12) při pokojové teplotě za mírného kývání. Poté byla membrána opět vymyta v 1x TBS-T (6x10 min). Detekce proteinů byla provedena pomocí inkubace membrány v roztoku Clarity™ Westernblot ECL Blotting Substrates po dobu 1 min a následně byl výsledek zaznamenán a vyhodnocen pomocí Chemidoc™ MP zařízení a programu ImageLab.

Tab. 12 Přehled použitých protilátek na westernblot a podmínky inkubace

Protilátka	Typ protilátky	Roztok	Doba inkubace
primární anti-GFP	monoklonální králičí	1% BSA v 1x TBS-T	1 hod
primární anti-MPK3	monoklonální králičí	4% BSA v 1x TBS-T	1 hod
primární anti-mCherry	monoklonální myší	4% BSA v 1x TBS-T	1 hod
sekundární anti-králičí	kozí	1% BSA v 1x TBS-T	1,5 hod
Sekundární anti-myší	kozí	1% BSA v 1x TBS-T	1,5 hod

3.2.20 Selektce homozygotních linií komplementovaných v *MPK3* genu

Semena Col-0 a komplementovaných linií v *MPK3* genu generace T2 a T3 byla vyseta na Petriho misky s ½ MS médiem a obsahem 50 µM fosfinotricinem. Misky byly ponechány dva dny ve 4 °C kvůli procesu stratifikace. Následně byly misky přeneseny do fytotronu a kultivovány na světle po dobu 6 hod při 23 °C (intenzita světla 80 µmol/m²/s a vlhkost 70 %). Poté byly misky uschovány do tmy po dobu 3 dní. Nakonec byly misky přeneseny do fytotronu a kultivovány (16 hod světlo/8 hod tma, intenzita světla 80 µmol/m²/s a vlhkost 70 %) a po 7 dnech byl výsledek selekce zdokumentován.

3.2.21 Mikroskopická analýza transformovaných rostlin

Semena *A. thaliana* z homozygotních rostlin (T3 generace) nebo generace T1 byla naseta na Petriho misky s čistým ½ MS médiem a kultivována ve vertikální poloze při podmínkách dlouhého dne (viz. kapitola 3.2.11). K mikroskopické analýze byly použity 5 a 7denní semenáčky. Semenáčky byly selektovány pomocí mikroskopu ZEISS Axio Zoom.V16 (Zeiss). Vyselektované semenáčky byly přemístěny do kapky tekutého ½ MS média na podložním sklíčku a opatrně zakryty krycím sklíčkem. Preparáty byly pozorovány pomocí konfokálního skenovacího laserového mikroskopu značky Zeiss a vyhodnoceny programem Zen Blue (Zeiss).

3.2.22 Aplikace solného stresu na komplementované rostliny

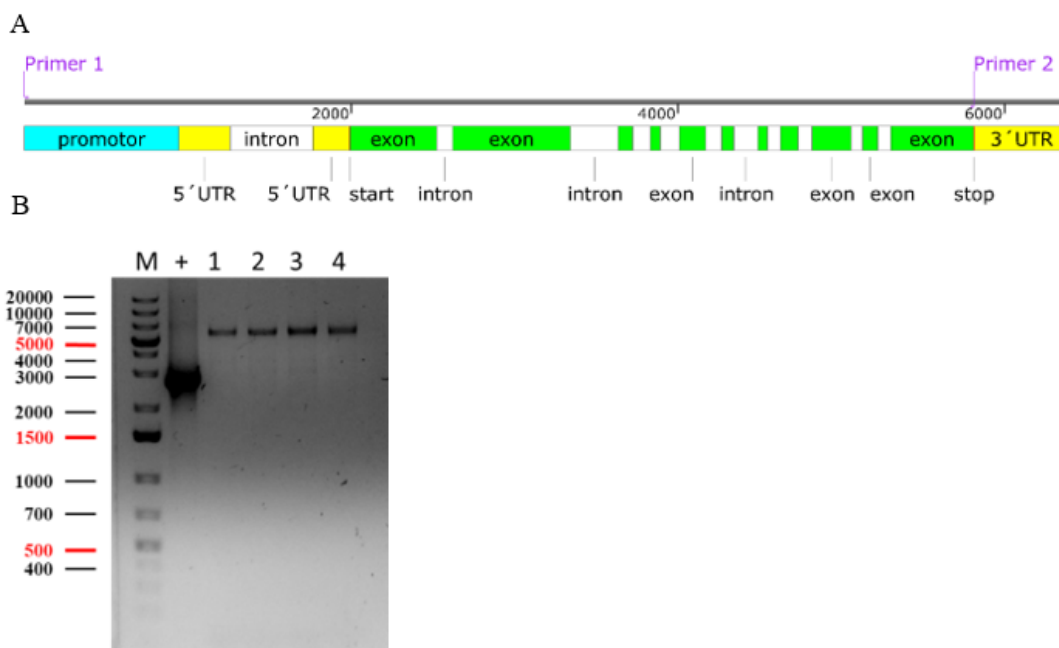
Semena Col-0, *mpk3-1* a homozygotních rostlin generace T3 komplementované v *MPK3* genu byla vyseta na Petriho misky s čistým ½ MS médiem a následně byly misky kultivovány ve fytotronu (viz. kapitola 3.2.11). Třídenní semenáčky byly poté přeneseny na ½ MS médium s obsahem 150mM NaCl a misky byly poté kultivovány o dobu dvou týdnů. Experiment byl proveden ve třech biologických replikách a výsledky byly zdokumentovány po 7 a 14 dnech.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Amplifikace genu *YODA* s nativním promotorem

Gen *YODA* s nativním promotorem byl amplifikován pomocí PCR. Jako templát byla použita gDNA izolována z *A. thaliana* ekotypu Col-0. Jako pozitivní kontrola pro ověření správného průběhu PCR reakce byl použit plasmid nesoucí konstrukt *35S::g:YODA::GFP* (Samakovli *et al.*, 2020). Promotorová oblast genu *YODA* (AT1G63700) byla identifikována pomocí Sequence Viewer, který je volně dostupný na stránkách <http://arabidopsis.org>. Promotorová sekvence byla stanovena 950 párů bází před 5'UTR regionem genu *YODA* (Obr. 12 A)

Pomocí kontrolní PCR reakce v malém objemu byla amplifikovaná sekvence *YODA* promotoru a *YODA* genu o celkové velikosti 5800 bp (Obr. 12 A,B). Průběh PCR reakce byl ověřen pomocí agarosové elektroforesy (Obr. 12 B). Po ověření byla reakce provedena ve velkém objemu (tzv. „scale-up“ reakce) 100 μ l. Produkty „scale-up“ PCR byly následně purifikovány a použity pro BP rekombinantní reakci jednokomponentové Gateway[®] technologie.



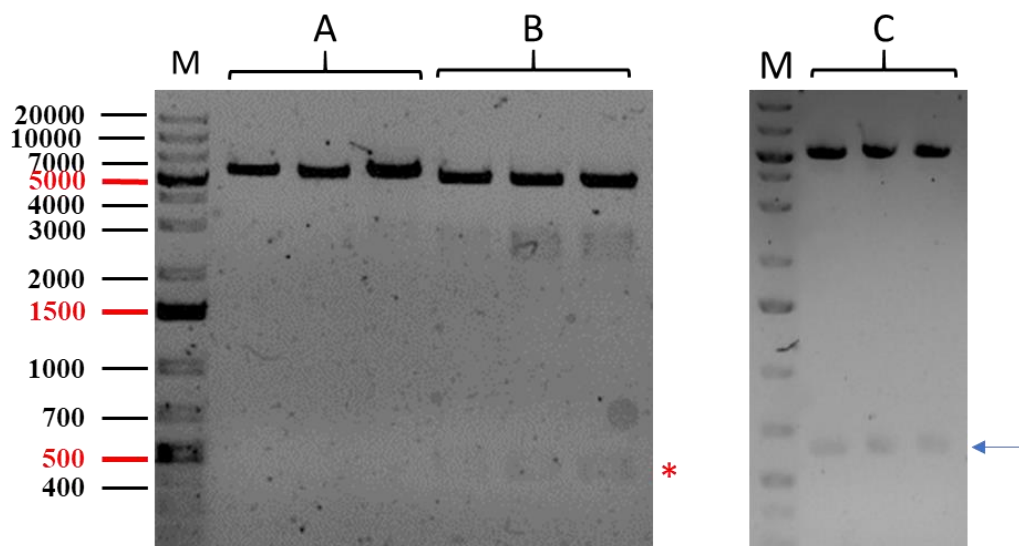
Obr. 12 Amplifikace genu *YODA* s nativním promotorem pomocí PCR. (A) Sekvenční mapa *YODA* genu s vyznačenými exony (zeleně), introny (bíle), UTR sekvencemi (žlutě), start a stop kodonem (červeně), promotorovou částí (modře) a primery ohraničující amplifikovanou část (Primer 1 a 2). Mapa vytvořena pomocí programu SnapGene. (B) Výsledek amplifikace *YODA* s vlastním promotorem. Jako templát DNA byla použita izolovaná gDNA z *A. thaliana*. Předpokládaná velikost produktu PCR reakce byla 5800 bp. Vzorek 1-4 byl určen jako pozitivní, byl přečištěn a použit pro následné Gateway[®] klonování. Jako pozitivní kontrola reakce byl použit plasmid *35S::cYODA::GFP* (+) tvořící produkt o velikosti 2700 bp. (B). Marker – Gen Ruler 1 kb Plus DNA Ladder.

4.2 Kontrolní štěpení vektorů pro Gateway® klonování

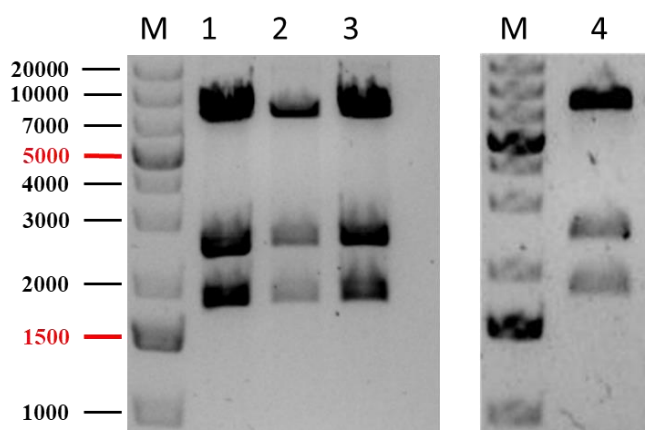
Před vlastní rekombinační reakcí bylo nutné prázdné Gateway® donorové i destinační vektory amplifikovat a prověřit jejich správnost. K amplifikaci prázdných vektorů byly použity buňky *E. coli* DB3.1, jelikož tento kmen je resistentní k *ccdB* genu, který je pro kmen TOP10 letální. Transformované kmeny *E. coli* byly dále selektovány na LB médiu s přidavkem selekčního antibiotika a pozitivní kolonie byly kultivovány do saturovaného stavu. Dále byly z bakteriálních kultur izolovány plasmidy, které byly následně ověřeny pomocí restrikčního štěpení (Obr. 13 a 14). Předpokládané velikosti fragmentů vznikajících po štěpení byly určeny za pomoci programu ApE-A plasmid editor.

Donorový vektor pDONR207 o celkové velikosti 5585 bp byl linearizován pomocí enzymu *EcoRI* (Obr. 13A) za použití dvojitého štěpení enzymy *EcoRI* a *BamHI* (Obr. 13B) byl štěpen na fragmenty 5131 bp a 453 bp a pomocí enzymu *PvuII* (Obr. 13C) byl štěpen na fragmenty o velikosti 4983 bp a 680 bp. Pouze vektory pDONR207 tvořící dané fragmenty byly použity pro rekombinační BP reakci.

Destinační vektory pGWB404, pGWB450, pGWB453 a pGWB459 byly ověřeny pomocí restrikčního štěpení enzymem *EcoRI* (Obr. 14). Všechny destinační vektory byly po působení enzymu *EcoRI* štěpeny na tři fragmenty tak, jak bylo předpokládáno programem ApE – A plasmid editor. Vektor pGWB450 byl štěpen na úseky o velikosti 7365, 2433 a 1763 bp, vektor pGWB404 na úseky dlouhé 7355, 2433 a 1763 bp, vektor pGWB459 na velikost 7365, 2430 a 1763 a vektor pGWB453 na fragmenty o velikosti 7365, 2394 a 1763 bp (Obr. 14). Opět pouze ty destinační vektory, které tvořily fragmenty o předpokládané velikosti, byly použity pro LR rekombinační reakci.



Obr. 13 Kontrolní štěpení donorového vektoru pDONR207. (M) Marker v bp. (A) Linearizace vektoru pDONR207 enzymem *EcoRI* na velikost 5585 bp. (B) Štěpení vektoru pDONR207 na fragmenty o velikosti 5131 bp a 453 bp (hvězdička) enzymy *EcoRI* a *BamHI*. (C) Štěpení vektoru pDONR207 enzymem *PvuII* na úseky o velikosti 4983 bp a 680 bp (šipka). Marker – Gen Ruler1 kb Plus DNA Ladder.

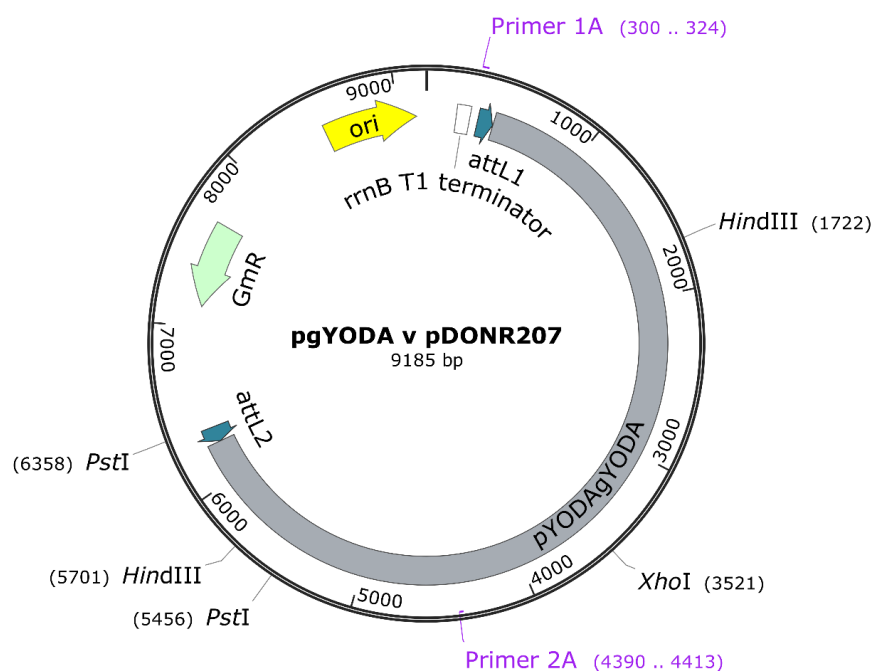


Obr. 14 Kontrolní štěpení destinačních vektorů pGWB450 (1), pGWB404 (2), pGWB459 (3) a pGWB453 (4) enzymem *EcoRI*. Všechny vektory pGWB po štěpení enzymem *EcoRI* tvořily 3 fragmenty: o velikosti 7365 nebo 7355 bp, druhý o délce 2433, 2430 nebo 2394 bp a třetí úsek dlouhý 1763 bp. Velikosti fragmentů vznikajících po štěpení jednotlivých vektorů (v závorkách) byly navrhnuty pomocí programu ApE - A plasmid editor. Marker – Gen Ruler1 kb Plus DNA Ladder.

4.3 BP reakce a selekce entry klonů po BP reakci

Při BP reakci došlo za pomoci BP klonasy k rekombinaci mezi attB místy ohraničujícími PCR produkt a attB sekvencemi nacházejícími se v donorovém vektoru pDONR207 za vzniku entry klonu (Obr. 15). Reakční směs byla dále použita k transformaci *E. coli* TOP10. Transformované kolonie byly následně kultivovány na LB médiu s přidavkem selekčního antibiotika. Pozitivní kolonie byly rozmíchány v dH₂O a tyto bakteriální suspenze byly použity jako templát DNA pro Colony PCR. Průběh PCR reakce byl následně ověřen pomocí agarosové elektroforézy v 1% agarosovém gelu (Obr. 16). Předpokládaná velikost produktu amplifikovaného pomocí PCR byla 4000 bp. Jako pozitivní kontrola PCR reakce byl použit plasmid 35S::*YODA*:*GFP* s amplifikačními primery pro gen *YODA*.

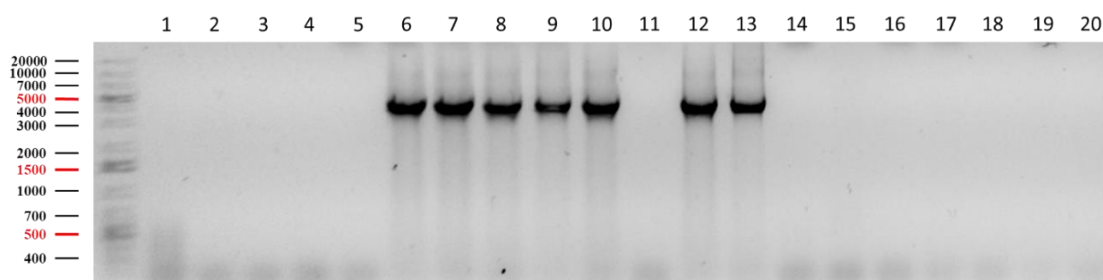
U pozitivních kolonií docházelo k amplifikaci úseku o velikosti 4000 bp tak, jak bylo předpokládáno. U falešně pozitivních kolonií nedocházelo k žádné amplifikaci DNA. Celkem bylo pomocí Colony PCR určeno 7 pozitivních kolonií (Obr. 16), které byly následně kultivovány v tekutém LB médiu s přidavkem selekčních antibiotik do saturevaného stavu.



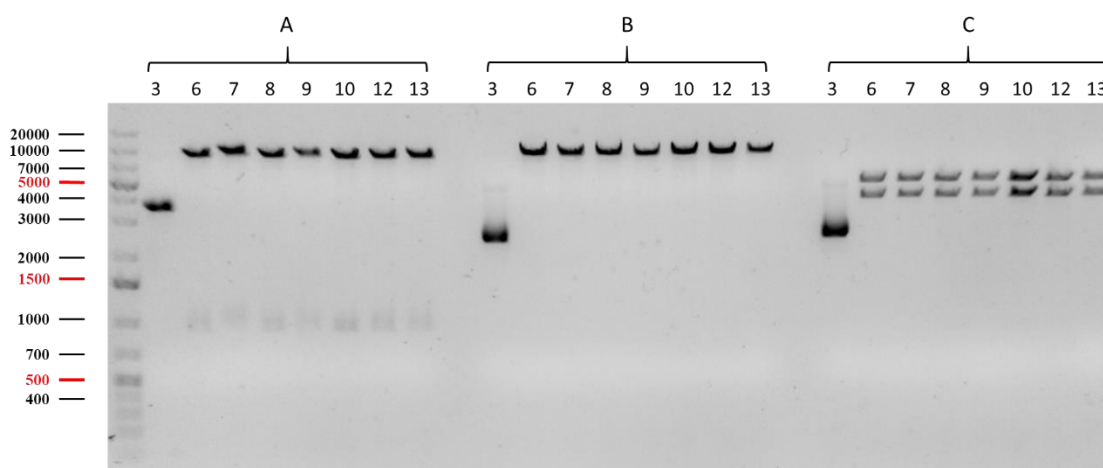
Obr. 15 Mapa entry klonu s pDONR207 s *pYODA*::*gYODA* sekvencí. Klonovací vektor o velikosti 9185 bp obsahuje: sekvenci *pYODA*::*gYODA* s nativním promotorem (*pYODA*), počátek replikace (*ori*), resistance na gentamycin (*GmR*), rekombinační místa pro LR reakci (*attL1*, *attL2*), restrikční místa pro endonukleasy *HindIII*, *XhoI* a *PstI* a vyznačené primery pro Colony PCR. Vytvořeno pomocí programu SnapGene.

Po dosažení saturovaného stavu byly z bakteriálních kultur izolovány plasmidy. Plasmidy byly poté štěpeny pomocí restrikčních enzymů *PstI*, *XhoI* a *HindIII* a výsledek štěpení byl ověřen pomocí agarosové elektroforézy v 1% gelu (Obr. 17). Jako negativní kontrola byl použit plasmid z falešně pozitivní kolonie č. 3. Předpokládané velikosti fragmentů po štěpení byly určeny pomocí programu ApE-A plasmid editor.

Plasmid *pYODA::gYODA* v pDONR207 o celkové velikosti 9185 bp byl pomocí restrikčního enzymu *PstI* (Obr. 17A) štěpen na fragmenty o velikosti 8283 a 902 bp, enzymem *XhoI* (Obr. 17B) byl linearizován na produkt o velikosti 9185 bp a po štěpení enzymem *HindIII* (Obr. 17C) tvořil fragmenty o velikosti 5205 a 3980 bp. Pouze plasmidy, které po štěpení tvořily předpokládané fragmenty, byly použity pro LR rekombinační reakci jednokomponentové Gateway® technologie.



Obr. 16 Testování pozitivních kolonií *E. coli* po BP reakci pomocí PCR. Jako templát DNA byla použita suspenze kolonií v dH₂O (1-20). Očekávaná velikost produktu po BP reakci byla 4000 bp. Pozitivní kolonie 6, 7, 8, 9, 10, 12 a 13 byly následně zpracovány k dalšímu pokusu. Marker – Gen Ruler 1 kb Plus DNA Ladder.

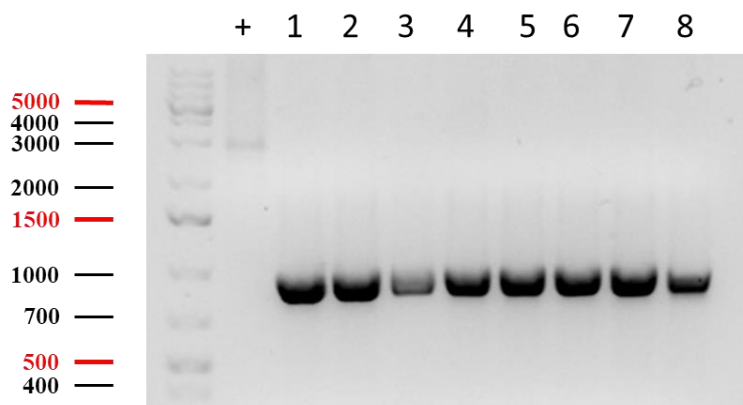


Obr. 17 Výsledek štěpení entry klonu (plasmidu) *pYODA::gYODA* v pDONR207 izolovaných z pozitivních kolonií z Colony PCR. (A) Štěpení plasmidu enzymem *PstI* na velikosti 8283 a 902 bp. (B) Linearizace plasmidu enzymem *XhoI* na velikost 9185 bp. (C) Štěpení plasmidu enzymem *HindIII* na fragmenty velikosti 5205 a 3980 bp. Vzorky 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13 byly určeny jako pozitivní. Vzorek č. 3 byl použit jako negativní kontrola štěpení. Marker – Gen Ruler 1 kb Plus DNA Ladder.

4.4 LR reakce a selekce pozitivních kolonií po LR reakci

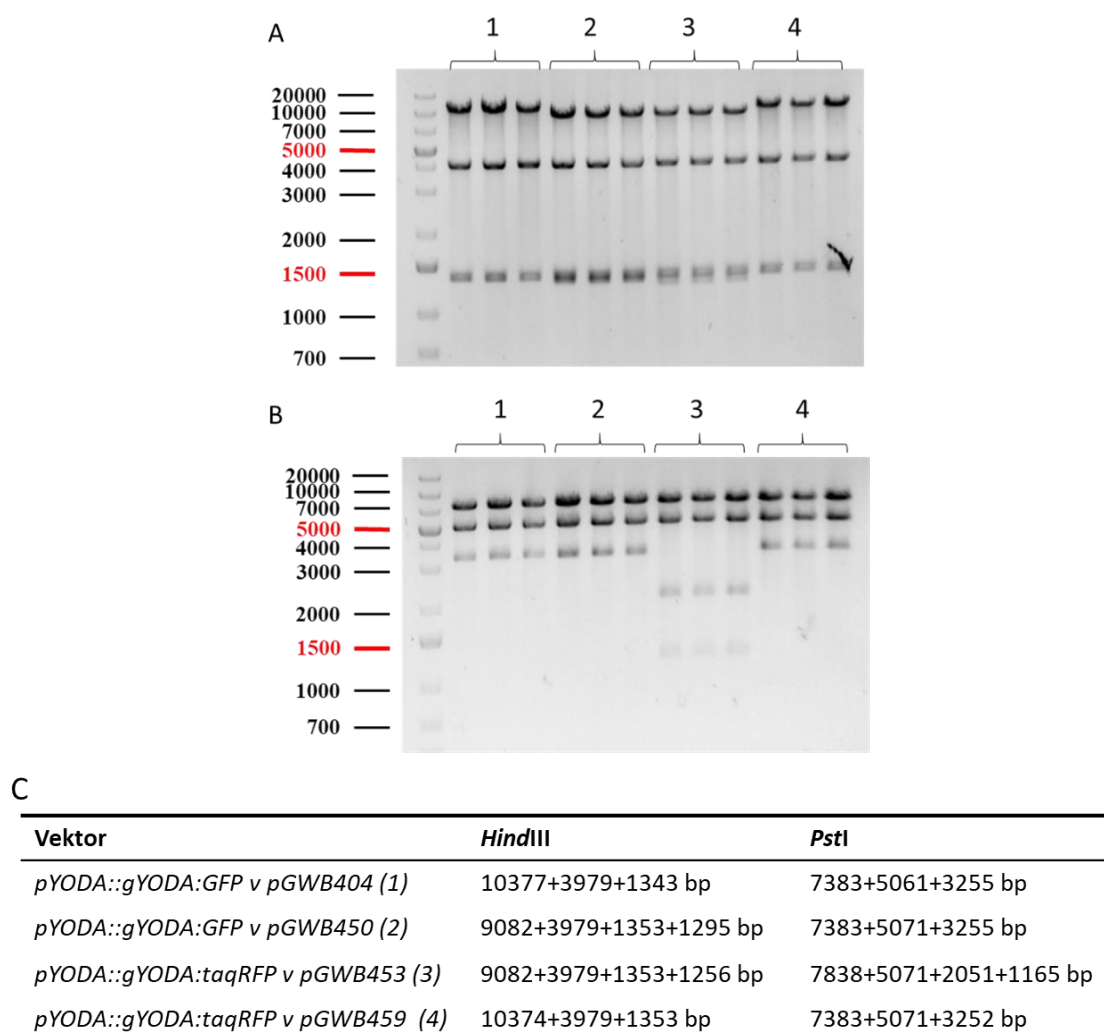
Při LR reakci došlo za pomoci LR clonasy k rekombinaci mezi attL místy nacházejícími se v entry klonu *pYODA::gYODA* v pDONR207 a attR úseky v destinačních vektorech za vzniku expresního vektoru. Reakční směs byla dále použita k transformaci *E. coli* TOP10 teplotním šokem. Testování kolonií *E. coli* transformovaných po LR reakci probíhala opět pomocí Colony PCR. Pozitivní kolonie kultivované na LB médiu s přidavkem selekčního antibiotika byly rozmíchány v dH₂O. Tyto bakteriální suspenze byly poté použity jako templátová DNA pro Colony PCR. Průběh PCR reakce byl následně vyhodnocen pomocí agarosové elektroforézy v 1% agarosovém gelu (Obr. 18). Předpokládaná velikost amplifikovaného úseku pomocí PCR byla 900 bp. Jako pozitivní kontrola PCR reakce byl použit prázdný vektor *pGWB404*.

U pozitivních kolonií docházelo k amplifikaci fragmentu o velikosti 900 bp (Obr. 18) tak, jak bylo předpokládáno. U falešně pozitivních kolonií nedocházelo k žádné amplifikaci DNA. Celkem bylo pomocí Colony PCR určeno 8 pozitivních kolonií (Obr. 18). Tyto kolonie byly dále kultivovány v tekutém LB médiu s přidavkem selekčního antibiotika do saturovaného stavu a následně z nich byl izolován plasmid.



Obr. 18 Selekcce pozitivních kolonií *E. coli* po LR reakci pomocí PCR. Jako templát DNA byla použita suspenze kolonií v dH₂O. Velikost produktu po LR reakci byla 900 bp. Pozitivní kolonie 1-8 byly následně zpracovány pro další experiment. Jako pozitivní kontrola byl použit prázdný vektor *pGWB404* (+). Vzorky: *pYODA::gYODA:GFP* v *pGWB404* (1,2), *pYODA::gYODA:GFP* v *pGWB450* (3,4), *pYODA::gYODA:mRFP* v *pGWB453* (5,6) a *pYODA::gYODA:taqRFP* v *pGWB459*. Marker – Gen Ruler 1 kb Plus DNA Ladder.

Po nakultivování pozitivních kolonií *E. coli* do saturovaného stavu byly z bakteriálních kultur izolovány plasmidy. Plasmidy byly poté štěpeny pomocí restričních enzymů *HindIII* a *PstI* a výsledek štěpení byl ověřen pomocí agarosové elektroforézy v 1% gelu (Obr. 19A a 19B). Velikost fragmentů vznikajících štěpením daných vektorů byla určena pomocí programu Ape-A plasmid editor (Obr. 19C). Pouze plasmidy, které po štěpení tvořily dané fragmenty, byly použity pro transformaci *A. tumefaciens* nízkou teplotou. Následně byly transformované kolonie *A. tumefaciens* kultivovány a selektovány na Petriho miskách s přidaným antibiotikem. Poté byly z kmenů připraveny glycerolové zásobní roztoky a dále byly suspenze použity pro transientní transformaci *N. benthamiana*.



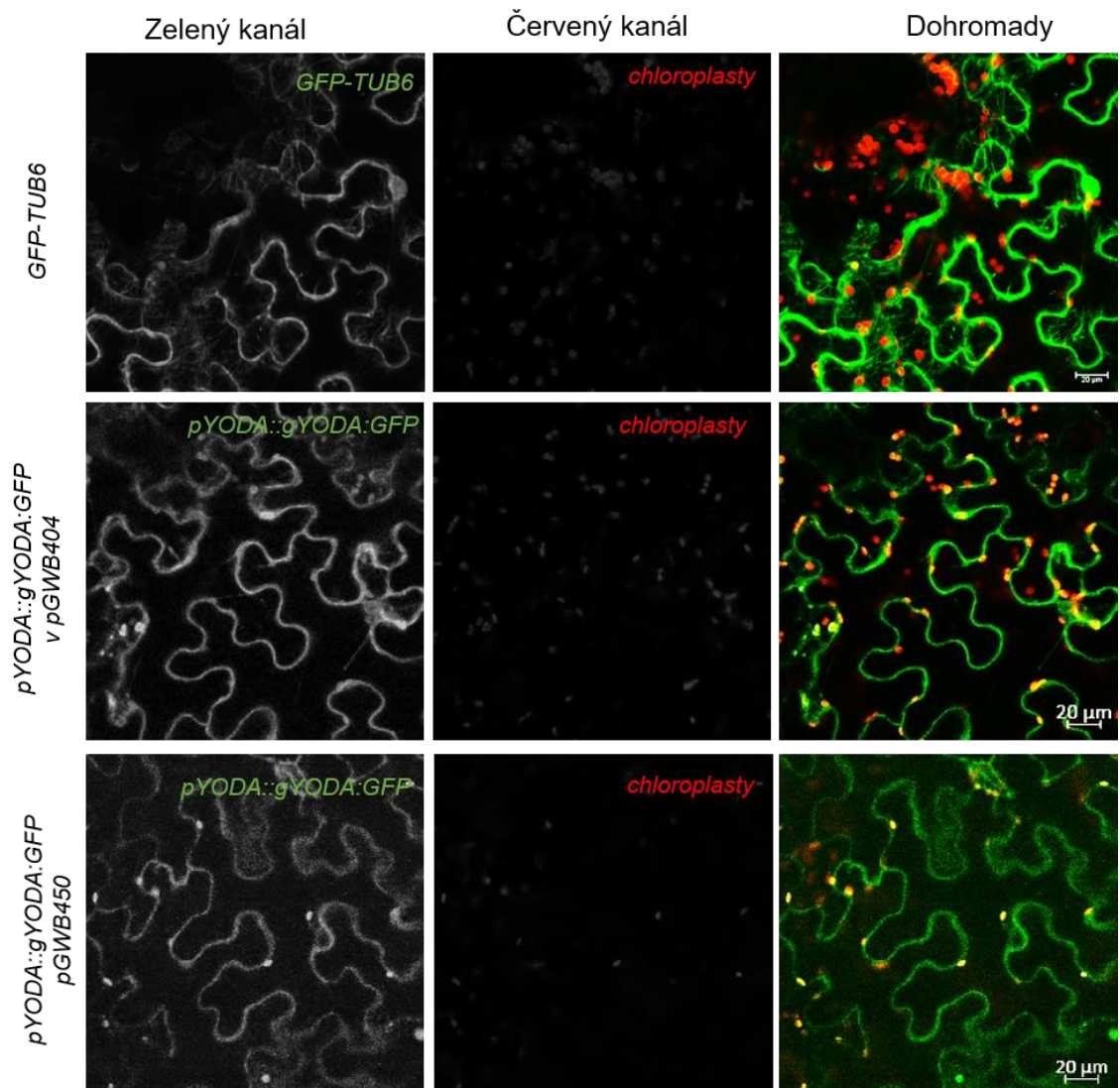
Obr. 19 Výsledek restričního štěpení expresních vektorů s genem *YODA* pod nativním promotorem. Výsledek štěpení expresních vektorů (plasmidů) *pYODA::gYODA v pGWB404*, *pGWB450*, *pGWB453* a *pGWB459* izolovaných z pozitivních kolonií z Colony PCR. (A) Štěpení plasmidů enzymem *HindIII*. (B) Štěpení plasmidů enzymem *PstI*. (C) Tabulka předpokládaných velikostí fragmentů po štěpení expresních vektorů enzymy *HindIII* a *PstI* určených podle programu Ape-A plasmid editor. Plasmidy 1-4 byly dále použity na transientní transformaci *N. benthamiana*. Marker – Gen Ruler1 kb Plus DNA Ladder.

4.5 Transientní transformace *Nicotiana benthamiana*

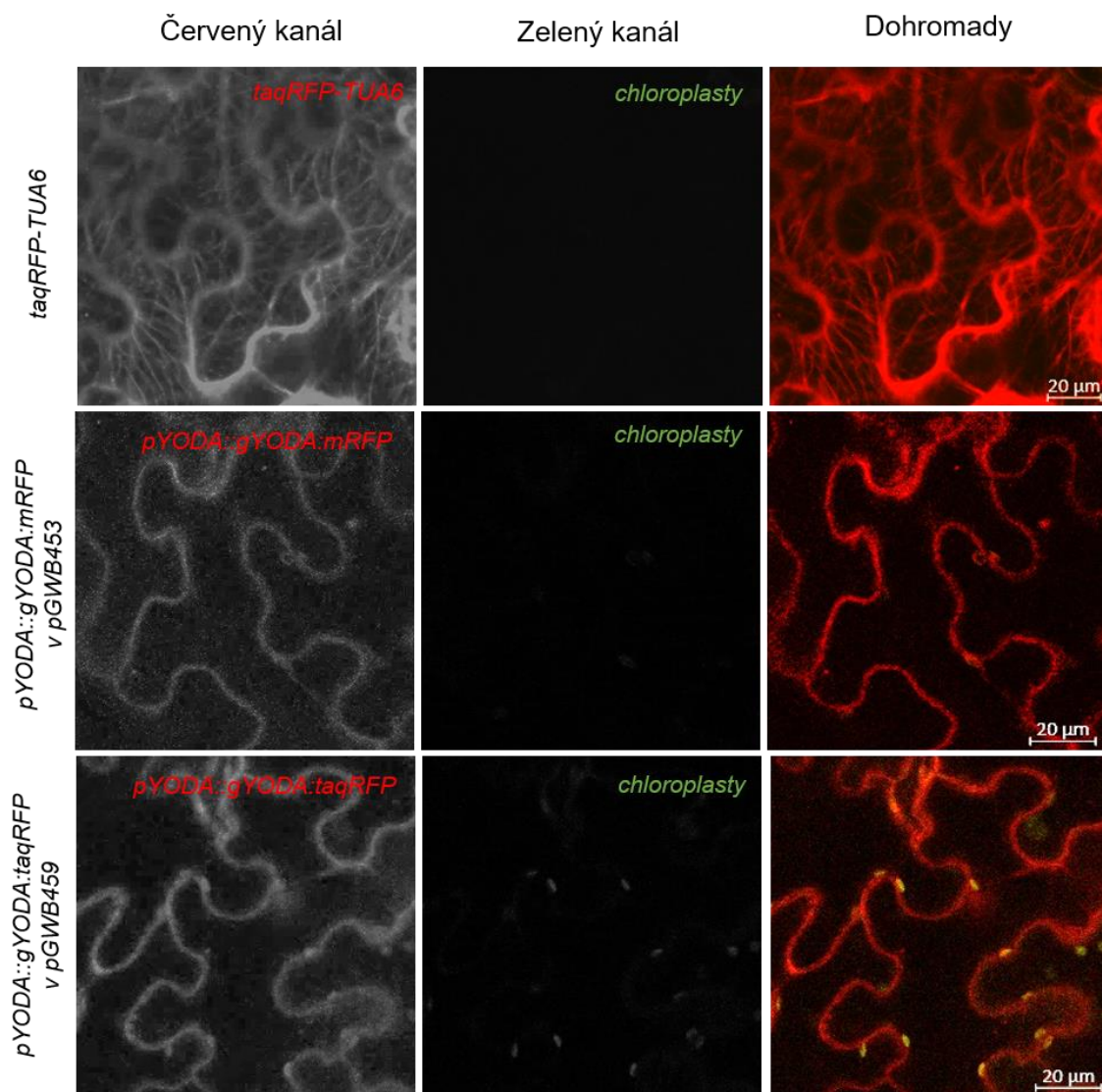
Pro transientní transformaci listů *Nicotiana benthamiana* byly rostliny večer před transformací řádně zalaty. Byly použity kmeny *A. tumefaciens* nesoucí konstrukty *pYODA::gYODA:GFP* (Obr. 20), *pYODA::gYODA:mRFP* a *pYODA:gYODA::taqRFP* (Obr. 21). Připravené bakteriální kultury byly pomocí injekční stříkačky vpraveny do abaxiální strany listů *N. benthamiana* a rostliny byly následně kultivovány ve fytotronu (16 hod světlo/8 hod tma, intenzita světla 80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ a vlhkost 70 %). Po třech dnech byly z listů připraveny preparáty, které byly pozorovány pod konfokálním mikroskopem (Obr. 20 a 21). Jako pozitivní kontrola transientní transformace listů *N. benthamiana* byly použity kmeny *A. tumefaciens* s konstrukty *35S::GFP:TUB6* (Křenek *et al.*, 2015) a *35S::tagRFP-TUA6* (Murata *et al.*, 2013) pro expresi fúzních proteinů GFP-TUB6 (Obr. 20) a taqRFP-TUA6 (Obr. 21). Jako negativní kontrola byly použity listy inokulované čistým kultivačním médiem.

V listech *N. benthamiana* transformovanými konstrukty *pYODA::gYODA:GFP* (Obr. 20) byl sledován signál v zeleném kanálu při excitaci 488 nm a emisi 493-534 nm pro detekci proteinu YODA-GFP a v červeném kanálu při excitaci 561 nm a emisi 566-703 nm pro kontrolu autofluorescence chloroplastů. V listech transformovaných konstrukty *pYODA::gYODA:mRFP* a *pYODA::gYODA:taqRFP* (Obr. 21) byl signál fúzního proteinu YODA-RFP pozorován v červeném kanálu při excitaci 561 nm a emisi 538-632 nm a v zeleném kanálu při excitaci 488 nm a emisi 493-534 nm byla pozorována autofluorescence chlorofylů. Snímky zeleného a červeného kanálu byly spojeny ke kontrole překryvu jednotlivých signálů.

U obou konstruktů byl pozorován signál fúzního proteinu YODA-GFP (Obr. 20) nebo YODA-RFP (Obr. 21) pod nativním promotorem u plasmatické membrány, jak bylo zjištěno již dříve (Zhang *et al.*, 2015). Signál byl také zachycen v cytoplasmě epidermálních buněk. Dále byly tyto konstrukty použity na stabilní transformaci *A. thaliana* metodou floral-dip. V pozitivních kontrolách tvořící značený protein GFP-TUB6 nebo taqRFP-TUA6 byl signál pozorován na cytoskeletu buněk. V negativních kontrolách nebyl detekován žádný signál tak, jak bylo předpokládáno.



Obr. 20 Snímky z konfokálního mikroskopu po transientní transformaci listů *N. benthamiana* (3DAT) s měřítkem 20 μm . Snímky po transientní transformaci konstruktem *pYODA::gYODA:GFP*. Značený protein YODA pod nativním promotorem (zelený kanál). Jako pozitivní kontrola byly použity listy transformované konstruktem *35S::GFP:TUB6*. Jako negativní kontrola byla ověřena autofluorescence chloroplastů (červený kanál).



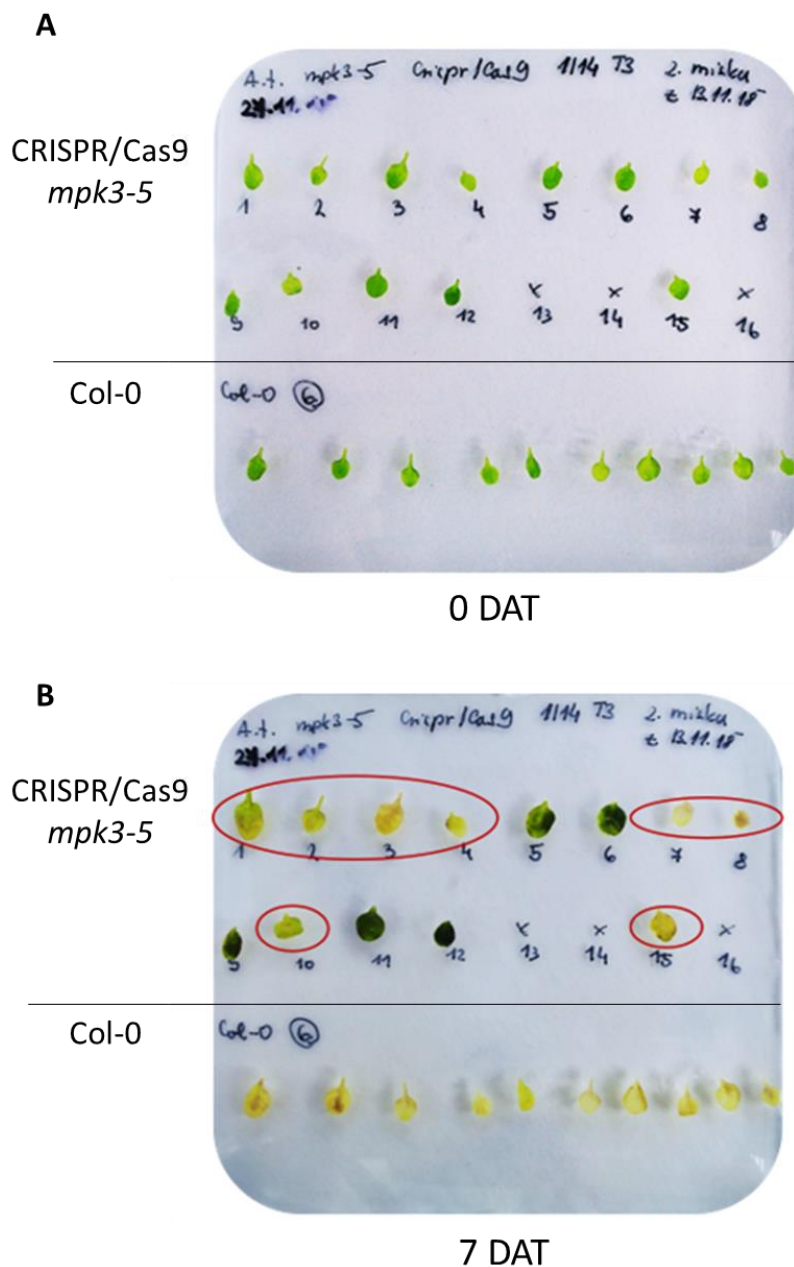
Obr. 21 Snímky z konfokálního mikroskopu po transientní transformaci listů *N. benthamiana* (3DAT) s měřítkem 20 μm . Snímky po transientní transformaci konstruktem *pYODA:gYODA:mRFP* nebo *pYODA:gYODA:taqRFP*. Značený protein YODA pod nativním promotorem (červený kanál). Jako pozitivní kontrola byly použity listy transformované konstruktem *35S::tagRFP:TUA6*. Jako negativní kontrola byla ověřena autofluorescence chloroplastů (zelený kanál).

4.6 Selektce mutantních rostlin *mpk3* pro komplementaci genu *MPK3*

Pro komplementaci *MPK3* genu v rostlinách *mpk3-1* a *mpk3-5* byla selektována semena mutantních linií s vyřazeným genem *MPK3*. Pro komplementaci byly použity rostliny, kde byl gen *MPK3* vyřazen dvěma odlišnými způsoby. V jednom případě se jednalo o homozygotní linie 1/14_7 mutantu *mpk3-5* připravené pomocí technologie CRISPR/Cas9 v naší laboratoři (Janálová, 2018; Samakovli *et al.*, 2020), ve druhém případě se jednalo o T-DNA *mpk3-1* inzerčního mutantu běžně používaného pro studium této kinasy (Alonso *et al.*, 2003).

Pro komplementační esej genu *MPK3* byly selektovány Crispr/Cas9 *mpk3-5* mutantní rostliny s vyštěpenou Crispr/Cas9 kazetou, protože vyselektované Crispr/Cas9 mutantní rostliny *mpk3-5* byly dále komplementované konstruktem obsahující stejný selekční marker jako CRISPR/Cas9 kazeta, gen *bar*. Selektce probíhala pomocí herbicidu fosfintotricinu (Obr. 22), jelikož použitý konstrukt CRISPR/Cas9 obsahuje gen *bar* nesoucí rezistenci k danému herbicidu. Semena homozygotních mutantů *mpk3-5* byla vyseta na Petriho misky s čistým ½ MS médiem. Z 14denních semenáčků byly sterilně odstříženy přibližně stejně velké listy, které byly přeneseny na Petriho misku s ½ MS médiem a s přidavkem 50 µM fosfintotricinu. Jako pozitivní kontrola byla použita semena rostlin ekotypu Col-0 (Obr. 22).

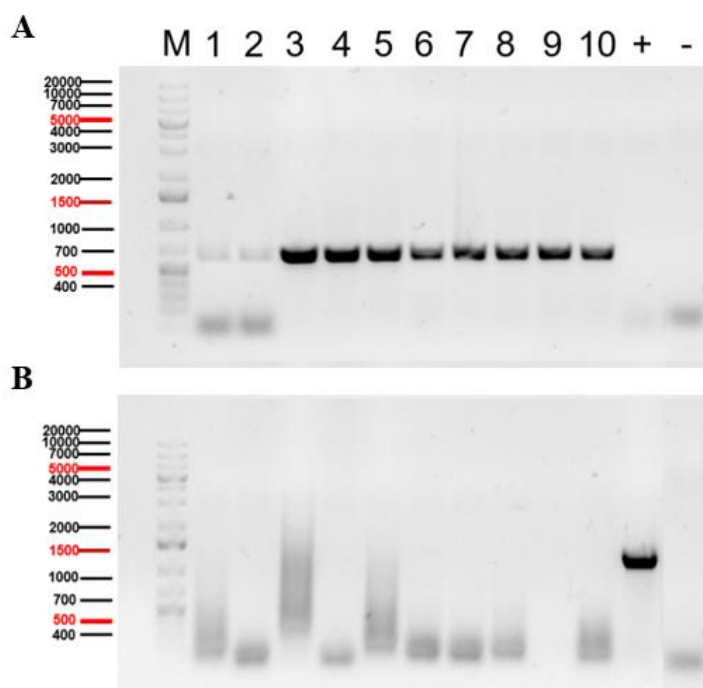
V listech semenáčků *mpk3-5* bez kazety CRISPR/Cas9 docházelo po týdenním působení herbicidu ke žloutnutí z důvodu ztráty chlorofylu v listech, což prokazuje nepřítomnost genu *bar* a tedy kazety CRISPR/Cas9 (Obr. 22). U listů semenáčků, které byly rezistentní na přítomnost fosfintotricinu, zůstaly listy po týdenním působení herbicidu zelené, což prokazuje přítomnost genu pro rezistenci na fosfintotricinu, a tedy dochází k zamezení působení fosfintotricinu a hromadění amoniaku v listech (Obr. 22). Selektované rostliny bez kazety CRISPR/Cas9 *mpk3-5* byly dále použity na transformaci metodou floral dip.



Obr. 22 Selektce mutantních rostlin *mpk3-5* linie 1/14_7 v generaci T3 pro komplementaci v genu *MPK3*. Pro selekci byly odříznuty a sterilně přeneseny stejně velké listy na selekční médium s obsahem fosfinitricinu (50 μ M). Listy byly kultivovány na médiu po dobu 7 dní. (A) Snímek pořízený 0 dní po přenosu listů na selekční médium (0 DAT; 0 days after treatment). (B) Snímek pořízen 7 dní po přenesení listů na selekční médium (7 DAT; 7 days after treatment). Listy mutantních rostlin *mpk3-5* s vyštěpenou CRISPR/Cas9 kazetou, a tedy bez rezistence na PPT jsou vyznačeny červeně. Jako pozitivní kontrola byly použity semenáčky ekotypu Col-0.

Inzerční T-DNA *mpk3-1* mutantní semena pro komplementační esej genu *MPK3* byla selektována pomocí genotypizace metodou PCR. Semena s předpokládanou mutací *mpk3-1* byla vyseta na Petriho misky s čistým ½ MS médiem. Ze 14 až 20denních semenáčků byla extrahována gDNA, která byla použita jako templát pro PCR reakci. Jako negativní kontrola byla použita rostlina ekotypu Col-0. Pro každý vzorek byly připraveny 2 reakční směsi, první pro amplifikaci *MPK3* genu o velikosti 1229 bp a druhá pro amplifikaci T-DNA inzertu o velikosti 600 bp. Amplifikace metodou PCR byla následně ověřena agarosovou elektroforézou (Obr. 23).

Byly selektovány rostliny, u kterých nedocházelo k amplifikaci *MPK3* genu a docházelo k amplifikaci pouze T-DNA inzertu (Obr. 23), což prokazuje, že dané rostliny nemají funkční gen *MPK3*, jelikož je v genu *MPK3* vložen T-DNA inzert. Celkem bylo genotypizací selektováno 10 rostlin *mpk3-1*, které byly dále použity na stabilní transformaci metodou floral dip.

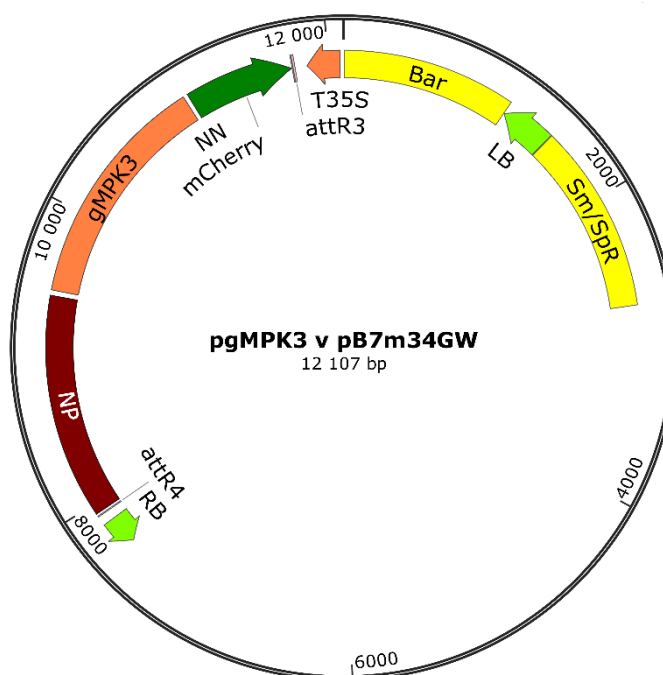


Obr. 23 Ověření výsledku genotypizace T-DNA *mpk3-1* mutantních rostlin pomocí PCR agarosovou elektroforézou v 1% gelu. (A) Výsledek amplifikace T-DNA inzertu pomocí PCR. Amplifikace T-DNA inzertu proběhla v T-DNA *mpk3-1* mutantech (1-10). (B) Výsledek amplifikace *MPK3* genu pomocí PCR. K amplifikace genu *MPK3* byla detekována pouze u pozitivní kontroly rostliny ekotypu Col-0 (+). Jako negativní kontrola pro obě reakce byla použita dH₂O (-). Marker – Gen Ruler1 kb Plus DNA Ladder.

4.7 Selekcce transformovaných semen *A. thaliana*

Ke stabilní transformaci konstruktem *pYODA::gYODA:GFP*, *pYODA::gYODA:RFP* a *pMPK3::gMPK3:mCherry* byly použity rostliny ekotypu Col-0 a mutantní rostliny *mpk3-5* a *mpk3-1*. Kmen *A. tumefaciens* GV3101 s konstruktem *pMPK3::gMPK3:mCherry* ve vektoru pB7m34GW byl připraven a dodán Mgr. Dominikem Novákem, PhD. (Obr. 24)

Semena z transformovaných rostlin konstruktem *pMPK3::gMPK3:mCherry* byla posbírána a vyseta na ½ MS médium s přidavkem 50 µM fosfotricinu (Obr. 25). Po 7 dnech semenáčky, které byly na médiu s přidáním herbicidem výrazně větší a zelené, což prokazuje přítomnost konstruktu *pMPK3::gMPK3:mCherry* s genem rezistence *bar*, byly přesazeny na čisté ½ MS médium a po 2 týdnech do půdy. Pro zamezení kontaminace semenáčků bakterií *A. tumefaciens* bylo do média přidáno 260 µM ticarcillinu. Celkem bylo pomocí selekcce určeno 10 rostlin Col-0, 25 mutantních rostlin *mpk3-5* (Obr. 25) a 27 rostlin *mpk3-1* (Obr. 26) s vloženým konstruktem *pMPK3::gMPK3:mCherry*. Tyto rostliny byly dále použity na genotypizaci.

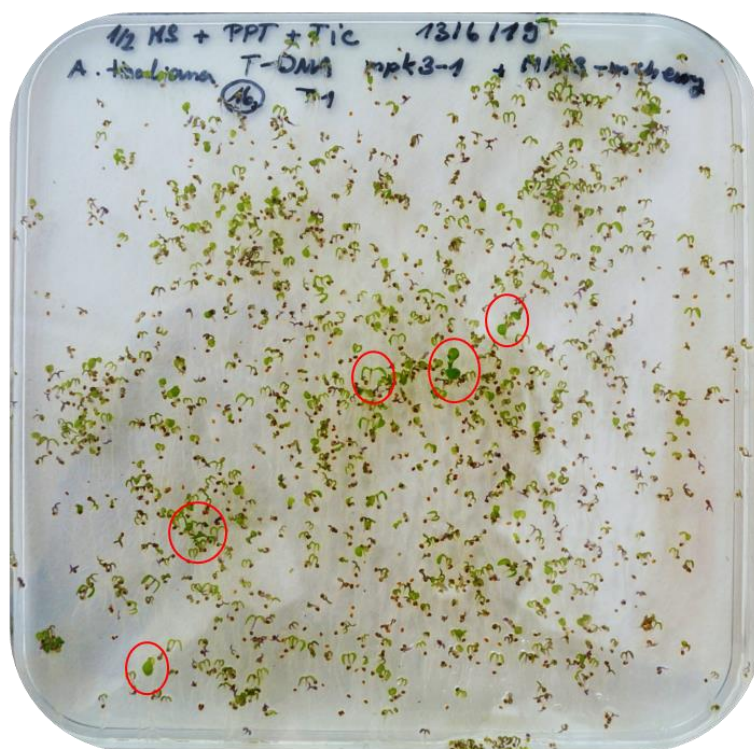


Obr. 24 Mapa konstruktů použitého pro transformaci *mpk3* rostlin *A. thaliana*. Konstrukt pB7m34GW obsahuje nativní promotor genu *MPK3* (NP), gen *MPK3* (*gMPK3*), fluorescenční protein (*mCherry*), ohraničení inzertu (RB, LB), 35S promotor, gen rezistence na fosfotricin (*Bar*) a spektinomycin (*SM/SPR*) a rekombinační místa (*attR3*, *attR4*).

A

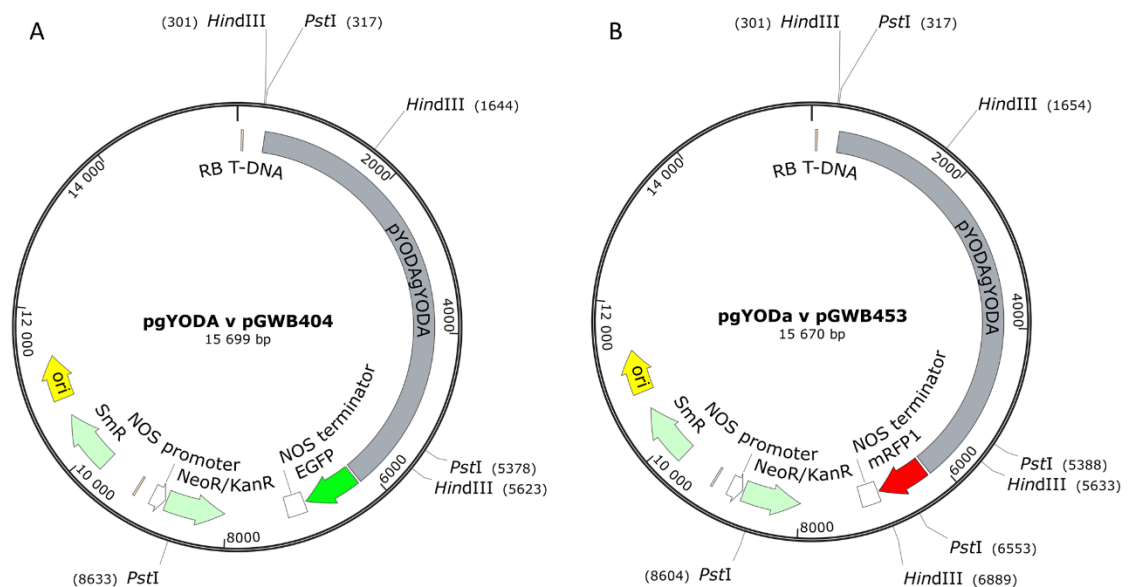


B

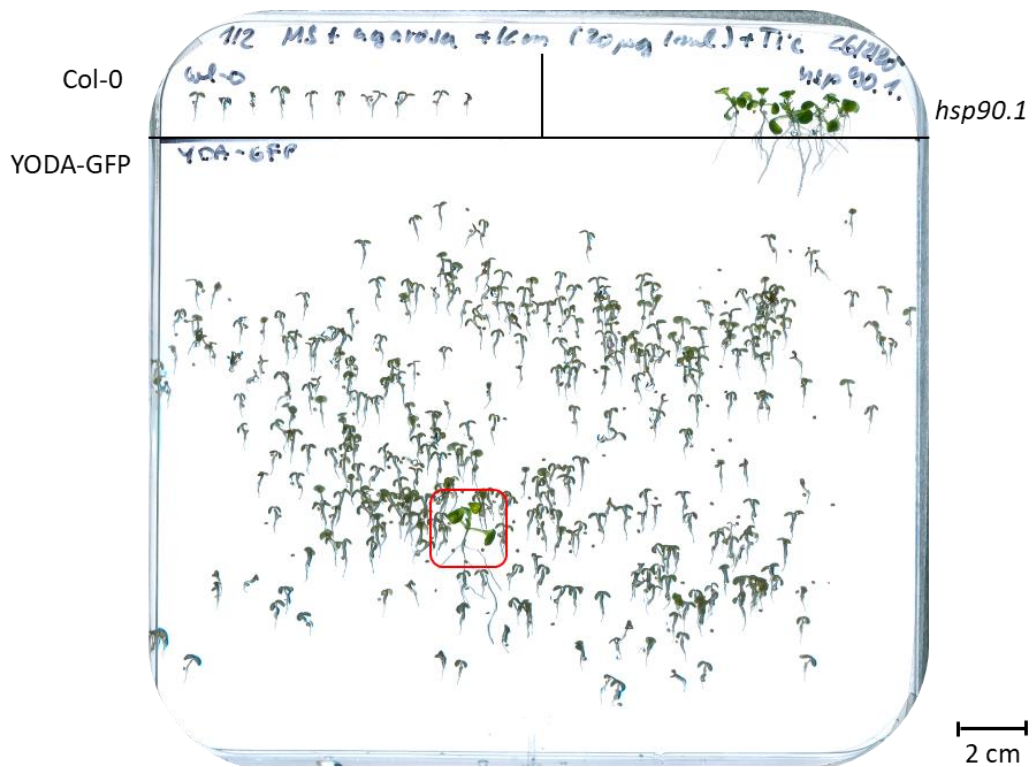


Obr. 25 Výsledek selekce transformovaných rostlin metodou floral-dip. Selektce *mpk3-5* (A) a *mpk3-1* (B) mutantních linií konstruktem *pMPK3::gMPK3:mCherry* kultivovaných 7 dní na ½ MS médiu s obsahem 50 μ M fosfinitricinu.

Semena z transformovaných rostlin konstruktem *pYODA::gYODA:GFP* a *pYODA::gYODA:mRFP* (Obr. 26) byla selektována na ½ MS médiu s přidavkem 100 µM kanamycinu (Obr. 27). Po 7 dnech byly vybrány pozitivní semenáčky, u kterých nedocházelo ke ztrátě chlorofylu v listech, což dokazuje vložený konstrukt *pYODA::gYODA:GFP/RFP* s genem rezistence na kanamycin. Pro zamezení kontaminace semenáčků bakterií *A. tumefaciens* bylo do média přidáno 260 µM ticarcillinu. Vybrané rostliny byly dále přesazeny na čisté ½ MS médium a po 14 dnech do půdy. Pomocí selekce bylo celkem vybráno 6 rostlin ekotypu Col-0 (Obr. 27) s vloženým konstruktem *pYODA::gYODA:eGFP*, ale žádné rostliny s konstruktem *pYODA::gYODA:mRFP*. Vyselektované rostliny byly dále testovány na přítomnost konstruktů.



Obr. 26 Mapy konstruktů použitých pro transformaci rostlin *Arabidopsis thaliana*. (A) Konstrukt *pYODA::gYODA:eGFP* ve vektoru pGWB404. (B) Konstrukt *pYODA::gYODA:mRFP* ve vektoru pGWB453. Konstrukty obsahují počátek replikace (ori), gen *YODA* s nativním promotorem (*pYODAgYODA*), fluorescenční značku (eGFP, mRFP), rezistenci na spektinomycin (*SmR*) a kanamycin (*NeoR/KanR*), ohraničení inzertu (RB T-DNA, LB T-DNA), NOS promotor a terminator a restrikční místa pro nukleasu *PstI* a *HindIII*.



Obr. 27 Selektce transformovaných rostlin konstruktem *pYODA::gYODA:GFP* v pGWB404. Výsledek selektce transformovaných rostlin ekotypu Col-0 s konstruktem *pYODA::gYODA:GFP* kultivovaných na ½ MS s obsahem 100 µM kanamycinu po dobu 7 dní. Jako negativní kontrola byly použity rostliny ekotypu Col-0 a jako pozitivní kontrola rostliny *hsp90.1* s rezistencí na kanamycin. Červeně vyznačeny vyselektované rostliny (A-C).

4.8 Genotypizace selektovaných rostlin *A. thaliana*

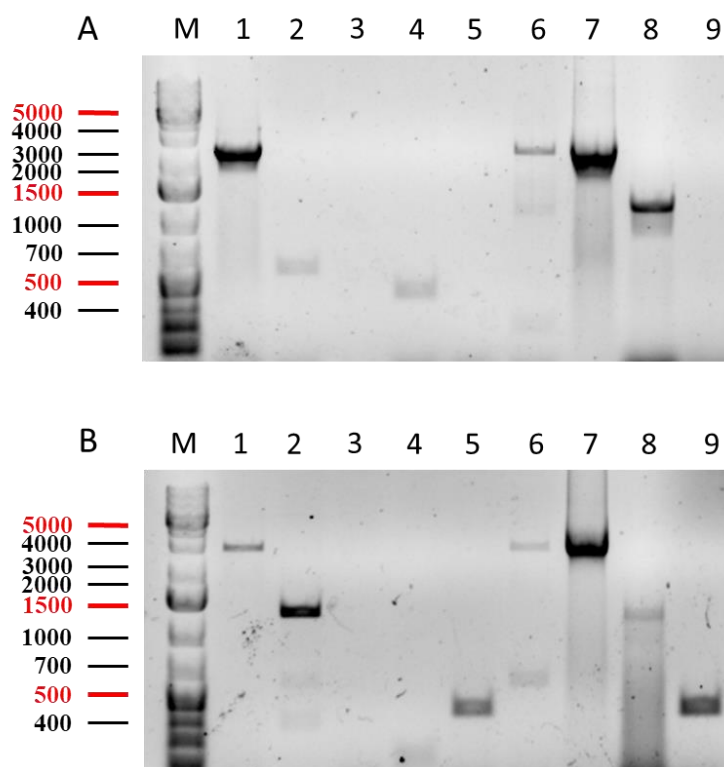
Pro vyřazení falešně pozitivních rostlin ze selekce byla provedena genotypizace pomocí PCR. Ze selektovaných rostlin transformovaných konstrukty *pYODA::gYODA:GFP* (Obr. 28) a *pMPK3::gMPK3:mCherry* (Obr. 29, 30, 31, 32) byla extrahována gDNA, která byla použita jako templát pro PCR reakci. Pro genotypizaci byly použity 2 kombinace primerů pro každý konstrukt. První primer se nacházel v genu *YODA* nebo *MPK3* a druhé primery ve fúzní značce GFP nebo mCherry podle použitého konstrukt.

Na přítomnost konstrukt *pYODA::gYODA:GFP* bylo genotypováno 6 vyselektovaných rostlin na pozadí ekotypu Col-0 (Obr. 28). První kombinace primerů (Obr. 28A) amplifikovala úsek o velikosti 2620 bp a druhá kombinace primerů (Obr. 28B) úsek o velikosti 3057 bp. Jako pozitivní kontrola byl použit konstrukt *pYODA::gYODA:GFP* v *pGWB404* a jako negativní kontrola byla použita rostlina ekotypu Col-0 a čistá dH₂O. Jako kontrola dilučního protokolu byl použit pozitivní vzorek z genotypizace Col-0 s konstruktem *pMPK3::gMPK3:mCherry* (Obr. 28).

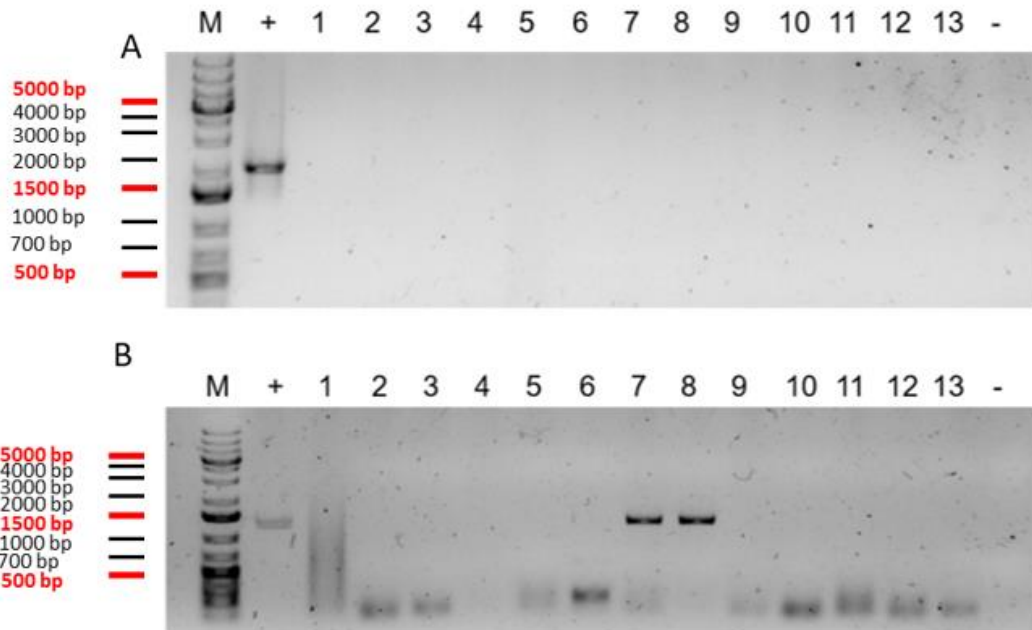
V první kombinaci primerů docházelo k amplifikaci úseku o velikosti 2620 bp (Obr. 28A) pouze u vzorků 1 a 6. V druhé kombinaci primerů docházelo k amplifikaci úseku o velikosti 3057 bp (Obr. 28B) také pouze u vzorků 1 a 6. Rostliny byly určeny jako pozitivní a dále zpracovány. U rostliny č. 1 docházelo k mnohem větší amplifikaci obou úseků pomocí PCR nejspíše proto, že se v rostlině nachází vícenásobná inserce konstrukt *pYODA::gYODA:GFP*, což může být ověřeno v T2 generaci pomocí selekce.

Na přítomnost konstrukt *pMPK3::gMPK3:mCherry* bylo testováno 27 mutantních rostlin *mpk3-1* (Obr. 29 a 30), 22 mutantních rostlin *mpk3-5* (Obr. 31) a 12 rostlin ekotypu Col-0 (Obr. 32) ze selekce. Z daných rostlin byla extrahovaná gDNA, která byla použita jako templát pro PCR reakci. Jako pozitivní kontrola byl použit konstrukt *pMPK3::gMPK3:mCherry* v *pB7m34GW* a jako negativní kontrola rostlina ekotypu Col-0 a čistá dH₂O. První kombinací primerů se amplifikoval úsek o velikosti 2114 bp (Obr. 29A, 30A, 31A a 32A) a druhou kombinací primerů úsek o velikosti 1336 bp (Obr. 29B, 30B, 31B a 32B).

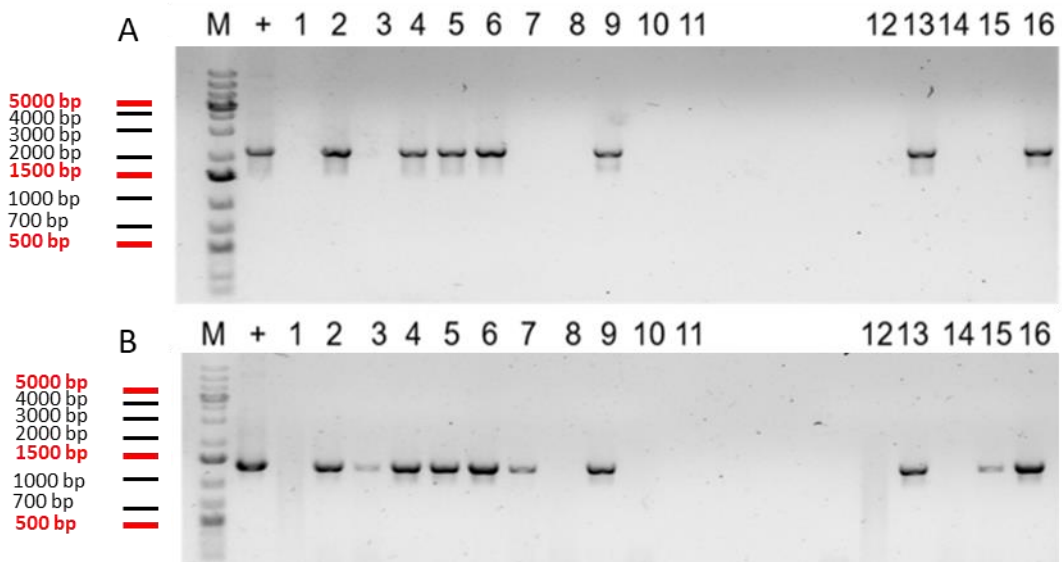
Jako pozitivní bylo celkem určeno 12 rostlin *mpk3-1* (Obr. 29, 30), 16 rostlin *mpk3-5* (Obr. 31) a 1 rostlina ekotypu Col-0 (Obr. 32), u kterých docházelo k amplifikaci daného úseku *pMPK3::gMPK3:mCherry* v první nebo druhé kombinaci primerů, což dokazuje úspěšnou transformaci těchto rostlin. Pozitivní rostliny byly dále použity na Western-blot analýzu.



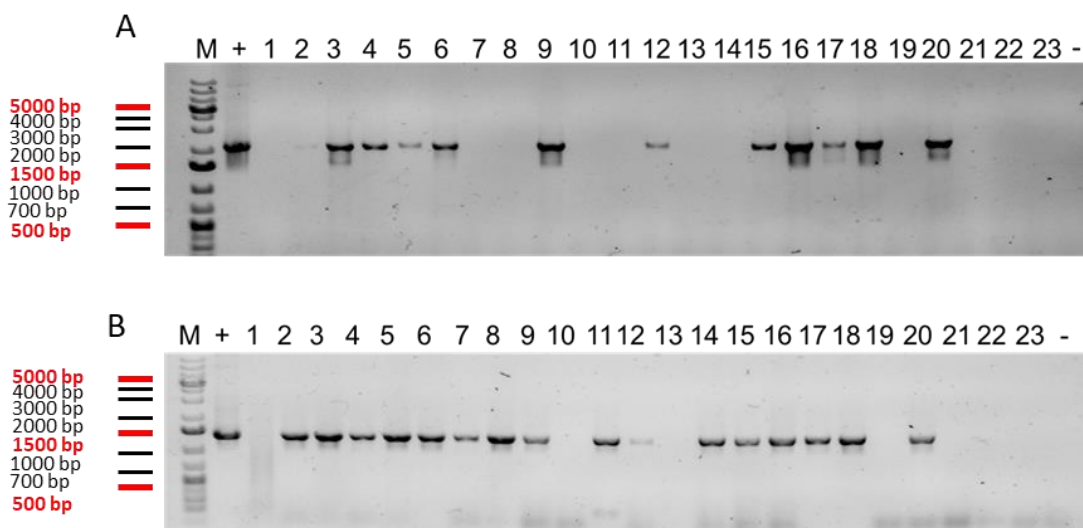
Obr. 28 Výsledek genotypizace transformovaných rostlin ekotypu Col-0 konstruktem *pYODA::gYODA:GFP* (1-6). Jako templát pro PCR reakci byla použita extrahovaná gDNA z listů *A. thaliana*. (A) Genotypizace pomocí 1. kombinace primerů, předpokládaná velikost produktu 2620 bp. (B) Genotypizace pomocí 2. kombinace primerů, předpokládaná velikost produktu 3057 bp. Jako pozitivní kontrola byl použit vektor *pYODA::gYODA:GFP* v *pGWB404* (7). Jako negativní kontrola byla použita rostlina ekotypu Col-0 (9). Jako kontrola dilučního protokolu při extrakci gDNA byla použita pozitivní rostlina ekotypu Col-0 s vloženým konstruktem *pMPK3::gMPK3:mCherry* (8). Marker – Gen Ruler 1 kb Plus DNA Ladder.



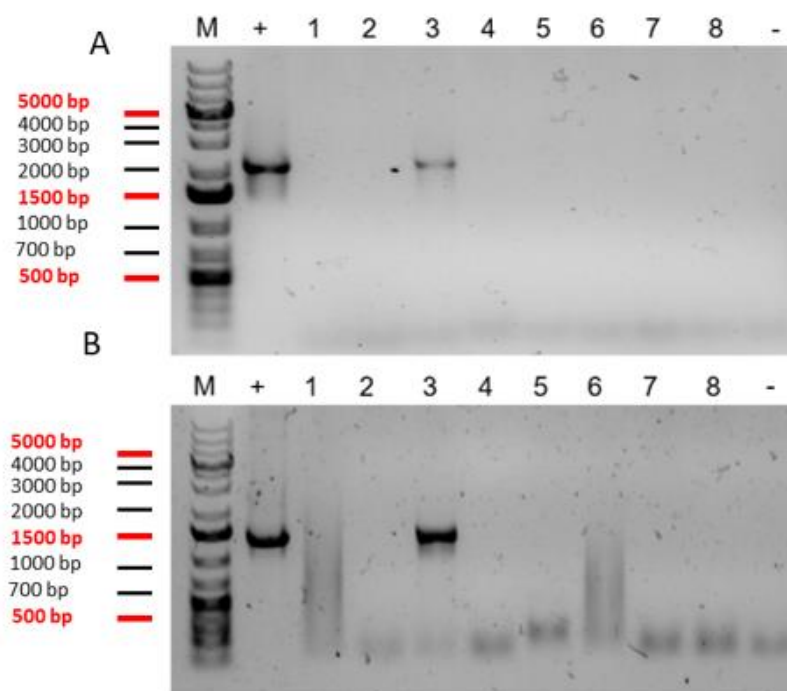
Obr. 29 Výsledek genotypizace transformovaných rostlin *mpk3-1* linie 16 generace T1 konstruktem *pMPK3::gMPK3:mCherry* (2-13). Jako templát pro PCR reakci byla použita extrahovaná gDNA z listů *A. thaliana*. (A) Genotypizace pomocí 1. kombinace primerů. Předpokládaná velikost produktu 2114 bp. (B) Genotypizace pomocí 2. kombinace primerů. Předpokládaná velikost produktu 1336 bp. Jako pozitivní kontrola byl použit vektor *pMPK3::gMPK3:mCherry* v pB7m34GW (+). Jako negativní kontrola byla použita rostlina ekotypu Col-0 (-) a dH₂O místo templátové DNA (1). Marker – Gen Ruler 1 kb Plus DNA Ladder.



Obr. 30 Výsledek genotypizace transformovaných rostlin *mpk3-1* linie 18 generace T1 *pMPK3::gMPK3:mCherry* (2-16). Jako templát pro PCR reakci byla použita extrahovaná gDNA z listů *A. thaliana*. (A) Genotypizace pomocí 1. kombinace primerů. Předpokládaná velikost produktu 2114 bp. (B) Genotypizace pomocí 2. kombinace primerů. Předpokládaná velikost produktu 1336 bp. Jako pozitivní kontrola byl použit vektor *pMPK3::gMPK3:mCherry* v pB7m34GW (+). Jako negativní kontrola byla použita rostlina ekotypu Col-0 (-) a dH₂O místo templátové DNA (1). Marker – Gen Ruler 1 kb Plus DNA Ladder.



Obr. 31 Výsledek genotypizace transformovaných rostlin *mpk3-5* linie 14/1_7 generace T1 konstruktem *pMPK3::gMPK3:mCherry* (2-23). Jako templát pro PCR reakci byla použita extrahovaná gDNA z listů *A. thaliana*. (A) Genotypizace pomocí 1. kombinace primerů. Předpokládaná velikost produktu 2114 bp. (B) Genotypizace pomocí 2. kombinace primerů. Předpokládaná velikost produktu 1336 bp. Jako pozitivní kontrola byl použit vektor *pMPK3::gMPK3:mCherry* v pB7m34GW (+). Jako negativní kontrola byla použita rostlina ekotypu Col-0 (-) a dH₂O místo templátové DNA (1). Marker – Gen Ruler 1 kb Plus DNA Ladder.



Obr. 32 Výsledek genotypizace selektovaných rostlin Col-0 s konstruktem *pMPK3::gMPK3:mCherry* generace T1 (1-8). Jako templát pro PCR reakci byla použita extrahovaná gDNA z listů *A. thaliana*. (A) Genotypizace pomocí 1. kombinace primerů. Předpokládaná velikost produktu 2114 bp. (B) Genotypizace pomocí 2. kombinace primerů. Předpokládaná velikost produktu 1336 bp. Jako pozitivní kontrola byl použit vektor *pMPK3::gMPK3:mCherry* v pB7m34GW (+). Jako negativní kontrola byla použita rostlina ekotypu Col-0 (-). Marker – Gen Ruler 1 kb Plus DNA Ladder.

4.9 Western-blot analýza transformovaných rostlin *A. thaliana*

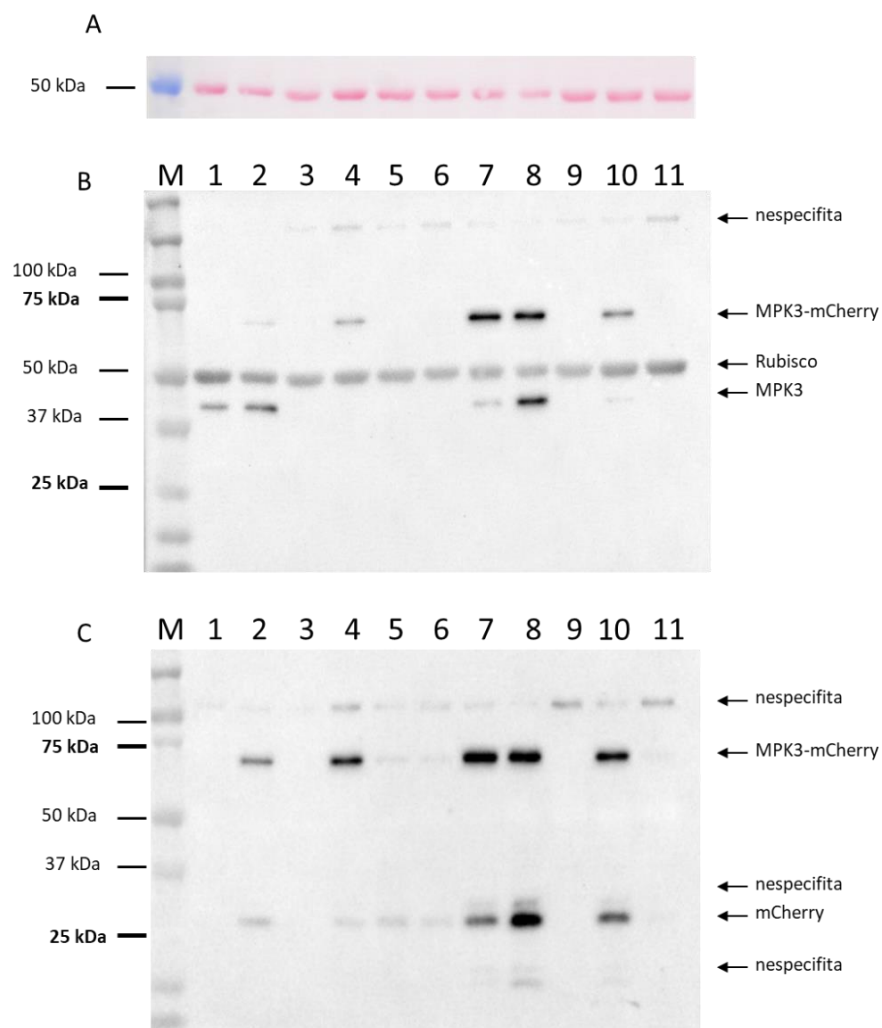
Z listů pozitivních rostlin po genotypizaci pěstovaných *ex vitro* byly extrahovány proteiny. Proteiny byly separovány podle molekulové hmotnosti pomocí SDS-PAGE elektroforézy a následně byly proteiny přeneseny na PVDF membránu. Pro ověření přenosu proteinů byla membrána barvena barvivem Ponceau S (Obr. 33A a 34A). Proteiny byly následně detekovány pomocí primární protilátky proti MPK3 proteinu a poté pomocí sekundární protilátky proti primární protilátce značené křenovou peroxidasou. Výsledná chemiluminiscence byla zaznamenána přístrojem ChemiDoc™. Jako negativní kontroly byly použity rostliny *mpk3-5* a *mpk3-1*. Jako pozitivní kontrola byla použita rostlina ekotypu Col-0.

Bylo dokázáno, že u transformovaných rostlin *mpk3-5* (Obr. 33) a *mpk3-1* (Obr. 34) s vloženým konstruktem *pMPK3::gMPK3:mCherry* byl detekován fúzní protein MPK3-mCherry o velikosti 70 kDa, což prokazuje tvorbu fúzního MPK3 proteinu v daných rostlinách. U některých rostlin *mpk3-1* a *mpk3-5* transformovaných konstruktem *pMPK3::gMPK3:mCherry* byl detekován jak nativní, tak fúzní protein MPK3, což může být způsobeno štěpením fúzního proteinu MPK3-mCherry. Z tohoto důvodu může docházet i k tvorbě nativního MPK3 proteinu v daných rostlinách. U rostliny ekotypu Col-0 transformované konstruktem *pMPK3::gMPK3:mCherry* (Obr. 33 a 34) byl detekován fúzní protein MPK3-mCherry o velikosti 70 kDa i nativní protein MPK3 o velikosti 43 kDa tak, jak se předpokládalo podle genotypizace. U pozitivní kontroly rostliny ekotypu Col-0 byl detekován nativní protein MPK3 a u negativních kontrol *mpk3-1* a *mpk3-5* nebyl detekován žádný protein.

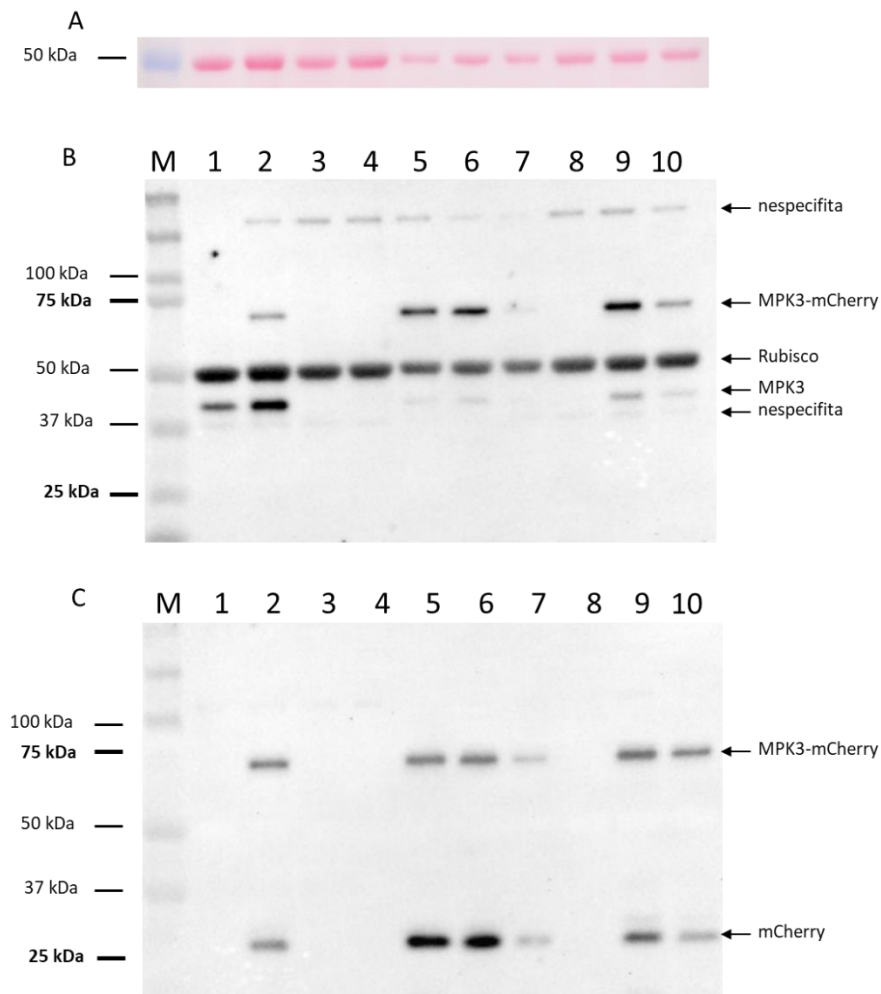
Pomocí western-blot analýzy byly určeny celkem 4 rostliny *mpk3-1* (Obr. 33) a 4 rostliny *mpk3-5* (Obr. 34), u kterých byl detekován protein MPK3-mCherry, což dokazuje, že tyto rostliny byly úspěšně transformovány. Dále byla určena 1 rostlina ekotypu Col-0 tvořící protein MPK3-mCherry (Obr. 33 a 34). Komplementované rostliny *mpk3-1* a *mpk3-5* byly následně použity pro selekci homozygotních linií v generaci T3 komplementovaných konstruktem *pMPK3::gMPK3:mCherry*.

Je známo, že fúzní proteiny odvozené od dsRed jsou náchylné na štěpení při přípravě vzorků na western blot analýzu (<http://evrogen.com>). Z tohoto důvodu byly membrány inkubovány s anti-mCherry protilátkou (Obr. 33C a 34C), kde se potvrdilo, že fúzní protein MPK3-mCherry je štěpen na MPK3 (43 kDa) a mCherry (27 kDa). Pro potvrzení, zda ke štěpení fúzního proteinu MPK3-mCherry dochází přípravou vzorků,

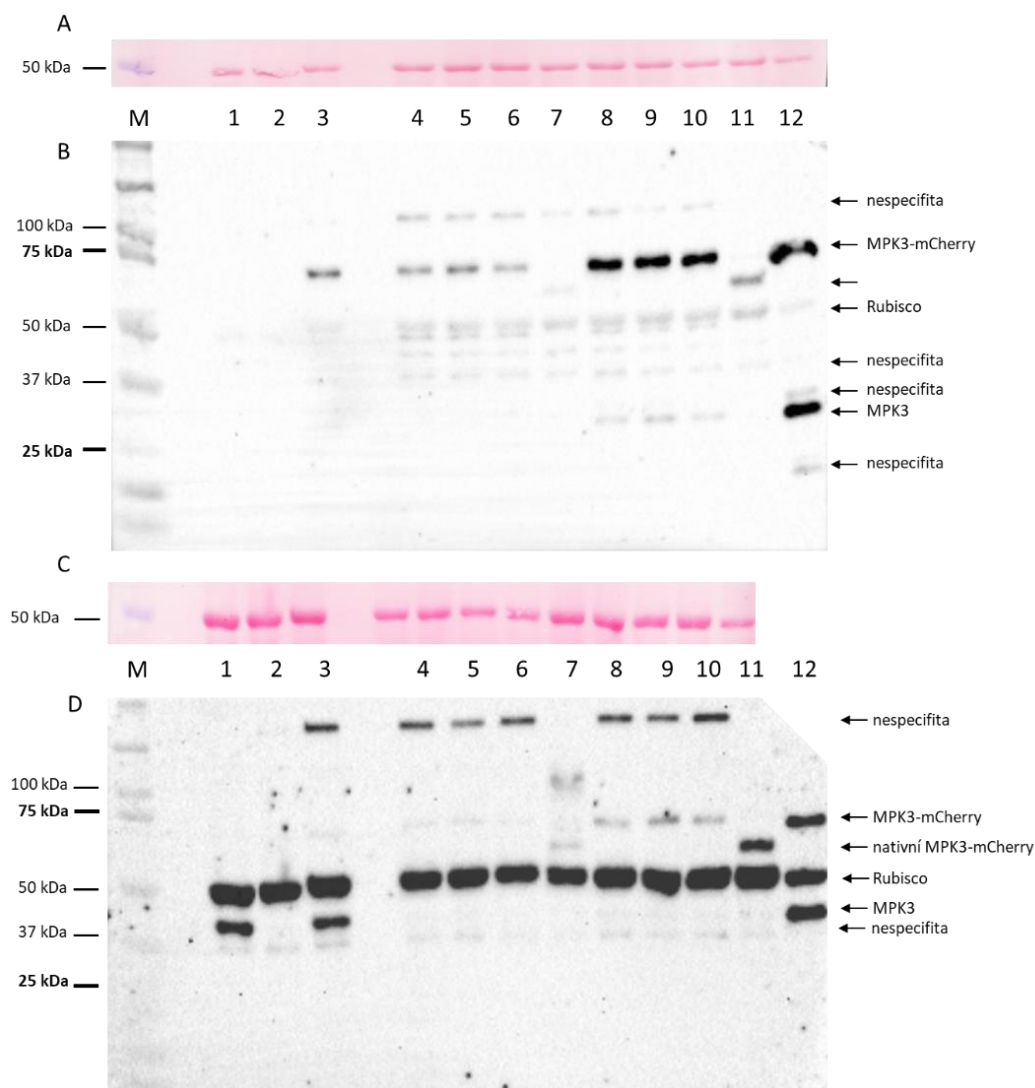
nebo už v rostlinách, byla Western-blot analýza zopakována s rostlinami T2 generace (Obr. 35). Pro přípravu vzorků na SDS-PAGE elektroforézu byla použita různá teplota denaturace (95, 70, 60 a 0 °C) a pro detekci fúzního proteinu MPK3-mCherry byly použity primární protilátky proti mCherry (Obr. 35A, B) a MPK3 (Obr. 35C, D). U linie 9/7 nebylo detekováno volné mCherry ani MPK3 a u linie 11/2 bylo pozorováno mírné štěpení proteinu MPK3-mCherry v obou případech (Obr. 35, 36). U nezahřátých vzorků byl detekován pouze nativní nedenaturovaný protein MPK3-mCherry. Z výsledků je patrné, že míra štěpení není ovlivněna různou teplotou denaturace (70-95 °C) a zároveň, že ke štěpení proteinu MPK3-mCherry nedochází v rostlině, ale zahřátím vzorku pro denuraci na SDS-PAGE analýzu.



Obr. 33 Výsledek Western-blot analýzy transformovaných rostlin konstruktem *pMPK3::gMPK3:mCherry* na pozadí *mpk3-5* (2, 4-11). (A) Ověření přenosu proteinů na PVDF membránu obarvením v Ponceau S. (B, C) Detekce proteinu MPK3-mCherry o velikosti 70 kDa pomocí primární protilátky proti MPK3 (B) nebo mCherry (C) a sekundární protilátky konjugované s křenovou peroxidasou. Protein MPK3-mCherry byl detekován u vzorku č. 2, 4, 5, 6, 7, 8 a 10. Pouze nativní protein MPK3 se vyskytoval u kontroly, kde byla použita rostlina ekotypu Col-0 (1). Do všech jamek bylo naneseno 20 µg proteinů.



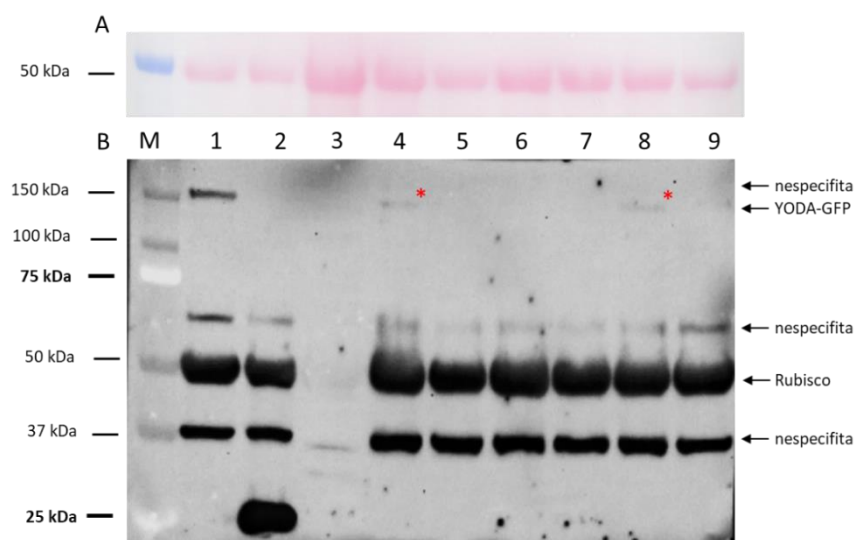
Obr. 34 Výsledek Western-blot analýzy transformovaných rostlin konstruktem *pMPK3::gMPK3:mCherry* na pozadí *mpk3-1* (2, 4-10). (A) Ověření přenosu proteinů na PVDF membránu obarvením v Ponceau S. (B,C) Detekce proteinu MPK3-mCherry o velikosti 70 kDa pomocí primární protilátky proti MPK3 (B) nebo mCherry (C) a sekundární protilátky konjugované s křenovou peroxidasou. Protein MPK3-mCherry byl detekován u vzorku č. 2, 5, 6, 9, 10, 11. Pouze nativní protein MPK3 se vyskytoval u kontroly, kde byla použita rostlina ekotypu Col-0 (1). Do jamek č. 1-10 bylo naneseno 20 μ g proteinů.



Obr. 35 Western-blot analýza komplementovaných linií generace T2. (A, C) Ověření přenosu proteinů na membránu barvením v Ponceau S. (B) Detekce fúzního proteinu MPK3-mCherry primární protilátkou proti mCherry a sekundární protilátkou proti primární protilátce konjugované s křenovou peroxidásou. (C) Detekce fúzního proteinu MPK3-mCherry primární protilátkou proti MPK3 a sekundární protilátkou proti primární protilátce konjugované s křenovou peroxidásou. Vzorky byly denaturovány při 95 °C (1, 2, 3, 4, 8, 12), 70 °C (5, 9), 60 °C (6, 10) a při 0 °C (7, 11). Vzorky: Col-0 (1), *mpk3-5* (2), Col-0+MPK3-mCherry (3), *mpk3-5*+MPK3-mCherry 9/7 T2 (4-7), *mpk3-5*+MPK3-mCherry 11/2 T2 (8-11), a *mpk3-5*+MPK3-mCherry 11 T1 (12). Do jamek bylo naneseno 20 µg proteinů.

Western-blot analýze byly podrobeny i pozitivní rostliny na konstrukt *pYODA::gYODA:GFP*. Ze stejně starých rostlin pěstovaných v půdě byly odebrány listy na extrakci proteinů. Proteiny byly rozděleny pomocí SDS-PAGE elektroforézy a následně byly přeneseny na PVDF membránu. Poté byla membrána barvena v Ponceau S. Proteiny byly detekovány primární protilátkou proti GFP a sekundární protilátkou proti primární protilátce konjugované s křenovou peroxidasou. Výsledek Western-blot analýzy byl zaznamenán přístrojem ChemiDoc™ a vyhodnocen programem ImageLab (Biorad). Jako pozitivní kontrola byla použita rostlina *A. thaliana* exprimující volné GFP a jako negativní kontrola rostlina *N. benthamiana* tvořící YODA-YFP a rostlina ekotypu Col-0.

U pozitivních rostlin z genotypizace byl detekován protein o velikosti 130 kDa (Obr. 36). Ačkoli je tento protein (130 kDa) větší než předpokládaná velikost fúzního proteinu YODA-GFP (123 kDa), byl tento výsledek považován za pozitivní, jelikož u ostatních rostlin v této pozici nebyl detekován žádný protein. Protože je YODA zapojena především do vývojových procesů v rostlině jako např. při embryogenezi a tvorbě stomat (Lukowitz *et al.*, 2004; Nadeau a Sack, 2002a), při Western-blot analýze provedené z 6týdenních rostlin byla detekovaná velmi nízká abundance YODA-GFP fúzního proteinu (Obr. 36). Z pozitivních rostlin byly později sesbírány semena.



Obr. 36 Výsledek western-blot analýzy transformovaných rostlin konstruktem *pYODA::gYODA:GFP*. (A) Ověření přenosu proteinů na PVDF membránu obarvením v Ponceau S. (B) Detekce proteinu YODA-GFP o velikosti 120 kDa (hvězdička) pomocí primární protilátky proti GFP a sekundární protilátky konjugované s křenovou peroxidasou. Protein YODA-GFP byl detekován ve vzorcích 4,8 (označeno hvězdičkou). Jako negativní kontrola byla použita rostlina ekotypu Col-0 (1) a vzorek připravený z *N. benthamiana* transformovaný YODA-YFP (3). Jako pozitivní kontrola byla použita rostlina *A. thaliana* exprimující volné GFP (2).

4.10 Selektce homozygotních linií MPK3-mCherry

Pro selektci homozygotních rostlin generace T3 byla použita semena T2 generace z *mpk3-1* a *mpk3-5* mutantních rostlin komplementovaných konstruktem *pMPK3::gMPK3:mCherry*. Pro selektci homozygotních rostlin byl použit protokol dle Harrison *et al.*, 2006.

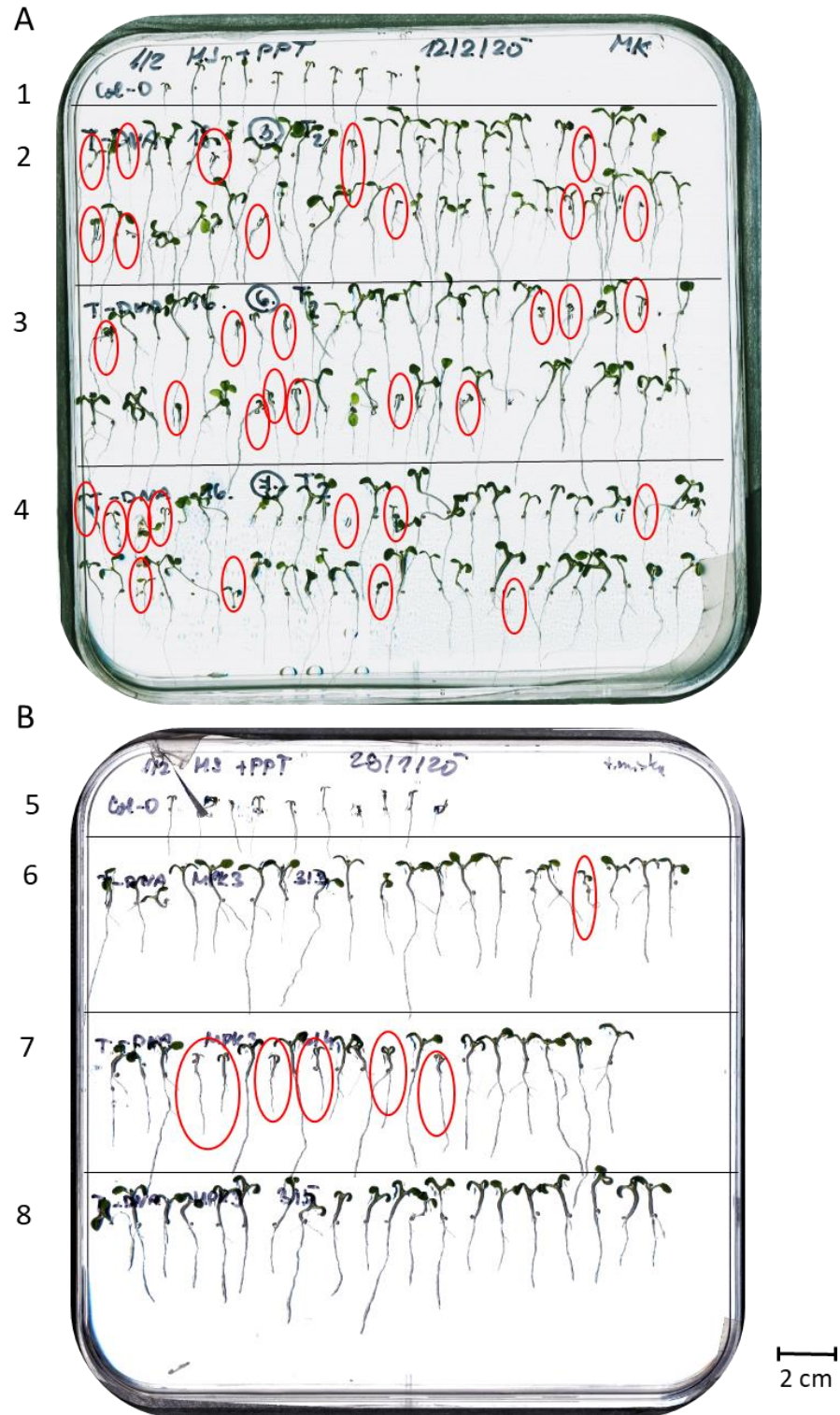
Z každé T2 linie bylo vysázeno 50 semen na ½ MS médium s obsahem 50 µM fosfinitricinu (viz. kapitola 3.2.20). Po 7 dnech selektce byly vybrány heterozygotní linie, u kterých přežívalo 75 % semenáčků (Obr. 37). Jako negativní kontrola byla použita semena divokého typu (Col-0) (Obr. 37A).

Z linií generace T2 se štěpným poměrem 3:1 bylo přesazeno 10 přeživších rostlin, ze kterých byla posbírána semena generace T3. Z každé linie bylo vyseto 20 semen na selekční ½ MS médium s obsahem 50 µM fosfinitricinu a byla provedena rychlá selektce (Harrison *et al.*, 2006) (Obr. 37B). Po 7 dnech byly vybrány pouze ty linie generace T3, u kterých přežívalo 100 % semenáčků.

Při použití rychlé selektce byly u rostlin resistantních na fosfinitricin pozorovány prodloužené hypokotyly a zelené kotyledony oproti kontrolním rostlinám a rostlinám bez konstruktu *pMPK3::gMPK3:mCherry*, což potvrzují již dříve získaná data u rychlé selektce na antibiotikum kanamycin a herbicid fosfinitricin (Harrison *et al.*, 2006) (Obr. 37).

Štěpný poměr 3 přeživší ku 1 mrtvé u linií v generaci T2 (Obr. 37A) dokazuje, že při transformaci *Agrobacteriem* došlo pouze k jedné inzerci *pMPK3::gMPK3:mCherry* do genomu. Na druhou stranu u rostlin se štěpným poměrem 15:1 se nachází právě dva inzerty *pMPK3::gMPK3:mCherry*, a tedy pro selektci homozygotních linií v T3 generaci nebyly dále zpracovány. Linie s nejasným výsledkem selektce (např. 1:1) nebyly použity pro další pokusy.

Selektcí linií generace T3 se 100 % přeživšími semenáčky (Obr. 37B) byly získány homozygotní linie s právě jedním inzertem *pMPK3::gMPK3:mCherry*. Linie se štěpným poměrem 3:1 byly určeny jako heterozygotní pro *pMPK3::gMPK3:mCherry*. Selektcí bylo získáno 15 homozygotních linií na pozadí *mpk3-1* a 4 homozygotní linie na pozadí *mpk3-5* komplementovaných konstruktem *pMPK3::gMPK3:mCherry* generace T3. Tyto linie byly dále použity pro experiment se solným stresem a mikroskopickou analýzu.

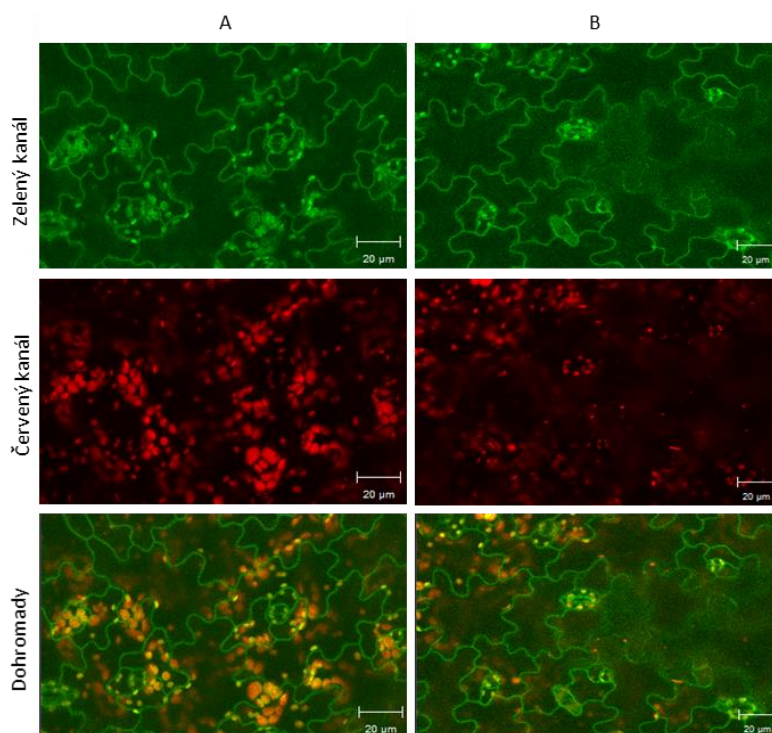


Obr. 37 Selekcce homozygotních linií generace T3 v MPK3-mCherry. (A) Selekcce linií v T2 generaci se štěpným poměrem 3:1. (B) Selekcce homozygotních linií generace T3 se 100 % přeživšími semenáčky. Červeně zakroužkovány mrtvé semenáčky. Vzoroky: Col-0 (1,5), linie 3, 6 a 7 T-DNA MPK3-mCherry generace T2 (2,3,4), linie T-DNA MPK3-mCherry 3-3/4/5 generace T3.

4.11 Mikroskopická analýza transformovaných linií *A. thaliana*

Pro mikroskopickou analýzu YODA-GFP fúzního proteinu byly použity listy z 20denních rostlin pozitivních z genotypizace na přítomnost *pYODA::gYODA:GFP* generace T1. Listy byly přeneseny do kapky vody. Preparáty byly následně pozorovány pomocí konfokálního laserového skenovacího mikroskopu (CLSM) (Zeiss) a výsledky byly vyhodnoceny programem Zen black (Zeiss).

V listech *A. thaliana* transformovaných konstrukty *pYODA::gYODA:GFP* byl sledován signál v zeleném kanálu při excitaci 488 nm a emisi 493-534 nm pro detekci proteinu YODA-GFP. Jako kontrola byl použit červený kanál pro detekci autofluorescence chloroplastů při excitaci 561 nm a emisi 566-703 nm. Snímky obou kanálů byly spojeny pro kontrolu překryvu jednotlivých signálů. Signál fúzního proteinu YODA-GFP (Obr. 38) pod nativním promotorem, stejně jako u výsledků z transientní transformace (viz. kapitola 4.5), byl signál zachycen v kortexu epidermálních buněk, což potvrzuje dřívější studii z roku 2015 (Zhang *et al.*, 2015). Signál fúzního proteinu YODA-GFP byl také pozorován v cytoplasmě epidermálních buněk (Obr. 38) tak, jak se předpokládalo (Samakovli *et al.*, 2020).



Obr. 38 Mikroskopická analýza listů z 20denních rostlin *A. thaliana* generace T1 transformovaných konstruktem *pYODA::gYODA:GFP*. Snímky z konfokálního mikroskopu s měřítkem 20 µm. Pozitivní rostliny 1 (A) a 6 (B) z genotypizace. Značený protein YODA-GFP pod nativním promotorem (zelený kanál), autofluorescence chloroplastů (červený kanál) a sloučený obrázek. (Mikroskop LSM 710 Axio Imager 2 Zeiss; objektiv Plan-Apochromat 20x/0,8 M27)

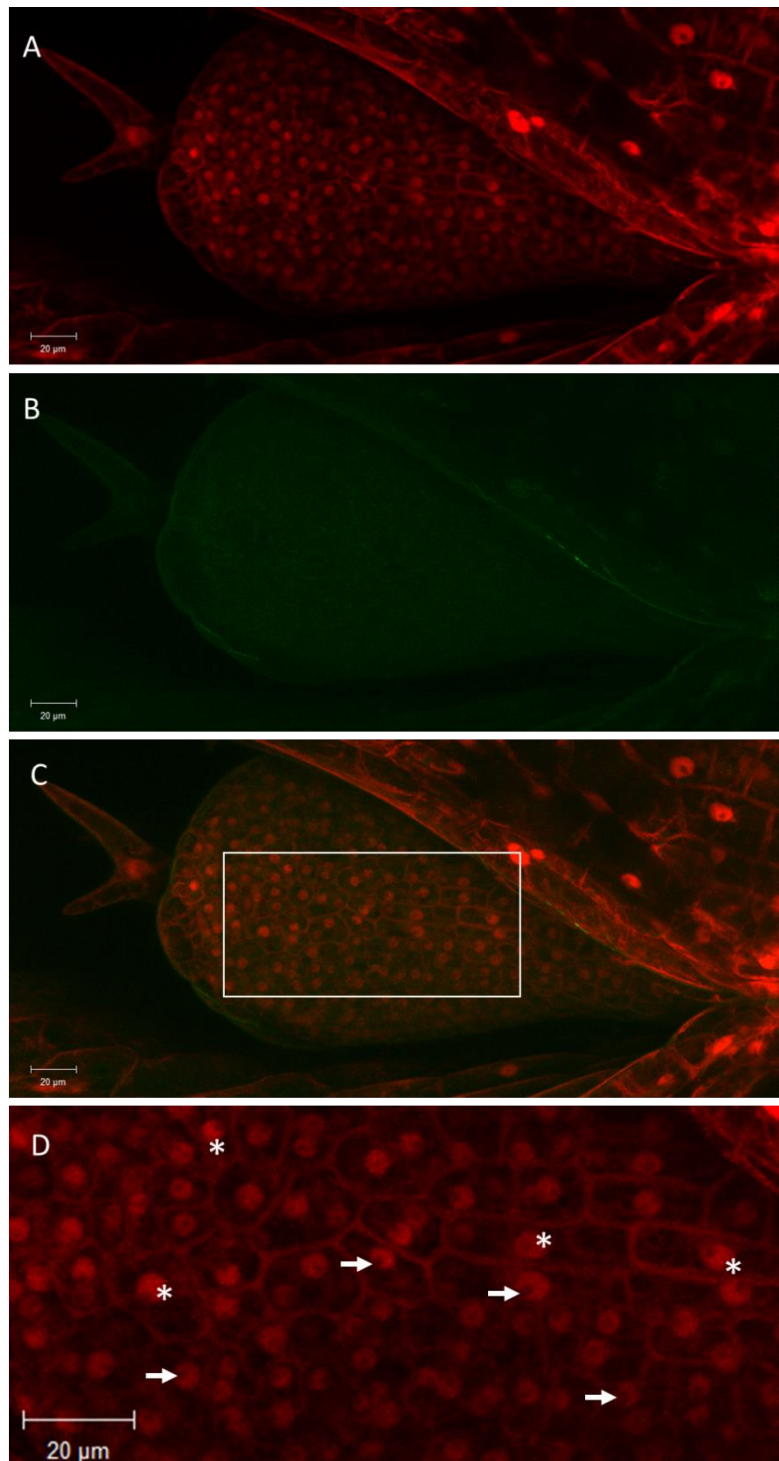
Pro mikroskopickou analýzu MPK3-mCherry fúzního proteinu byly použity 5denní semenáčky *mpk3-5* komplementovaných linií a 7denní semenáčky *mpk3-1* komplementovaných linií MPK3-mCherry generace T3. Semenáčky byly selektovány pomocí mikroskopu ZOOM (Zeiss) a poté byly přeneseny do kapky sterilního tekutého ½ MS média a pozorovány pomocí konfokálního laserového skenovacího mikroskopu (CLSM) (Zeiss). Výsledky byly vyhodnoceny programem Zen black (Zeiss).

U semenáčků *A. thaliana* komplementovaných konstruktem *pMPK3::gMPK3:mCherry* byl sledován signál v červeném kanálu při excitaci 561 nm a emisi 581-635 nm pro detekci proteinu MPK3-mCherry. Jako kontrola byl použit zelený kanál pro detekci autofluorescence při excitaci 488 nm a emisi 493-581 nm. Snímky obou kanálů byly spojeny pro kontrolu překryvu jednotlivých signálů.

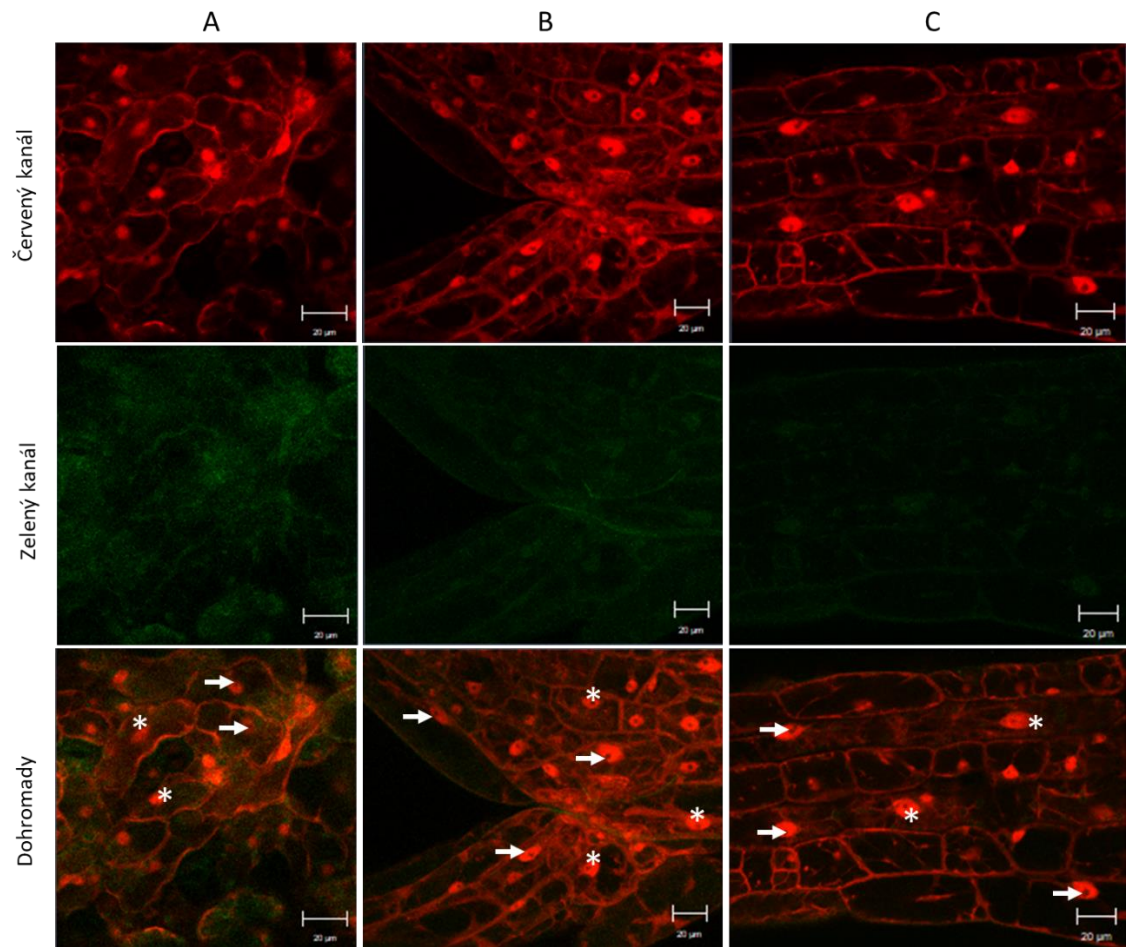
Fúzní protein byl pozorován v prvním klíčném listu (Obr. 39, 43), kotyledonech (Obr. 40A, 44A), apikálním meristému stonku (Obr. 40B, 44B), hypokotylu (Obr. 40C, 44C), basální části kořene (Obr. 41A, 45A), v kořenech (Obr. 41B, 45B) a v kořenové špičce (Obr. 42, 46) u komplementovaných linií v *MPK3* genu na pozadí *mpk3-5* (Obr. 39-42) a *mpk3-1* (Obr. 43-46) homozygotních linií. Abundance MPK3-mCherry fúzního proteinu v pletivech *A. thaliana* odpovídá výsledkům získaných z eFP databáze (Winter *et al.*, 2007). Signál fúzního proteinu MPK3-mCherry byl silnější v nadzemních částech než v kořenových částech rostliny, tento rozdíl byl nejvíce patrný při pozorování basální části kořene (Obr. 41A, 45A)

Fúzní protein byl detekován v cytoplasmě, v kortikální oblasti pod plasmatickou membránou a v jádře buněk, což koreluje s dříve získanými výsledky (Persak a Pitzschke, 2013; Pitzschke *et al.*, 2014) a s prací zaměřenou na přípravu mutantních linií *A. thaliana* exprimujících *MPK3* ve fúzi s mCherry na pozadí Col-0 (Rašmanová, 2017), a to jak u *mpk3-5* MPK3-mCherry, tak u *mpk3-1* MPK3-mCherry komplementovaných linií. Fúzní protein MPK3-mCherry nebyl detekován v jádru. Abundance MPK3-mCherry fúzního proteinu v *A. thaliana* na buněčné úrovni odpovídá výsledkům získaných z databáze SUBA4 (Hooper *et al.*, 2017) a eFP databáze (bar.utoronto.ca/eplant) a studiím provedeným dříve (Guan *et al.*, 2014; Pitzschke *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2016, 2015).

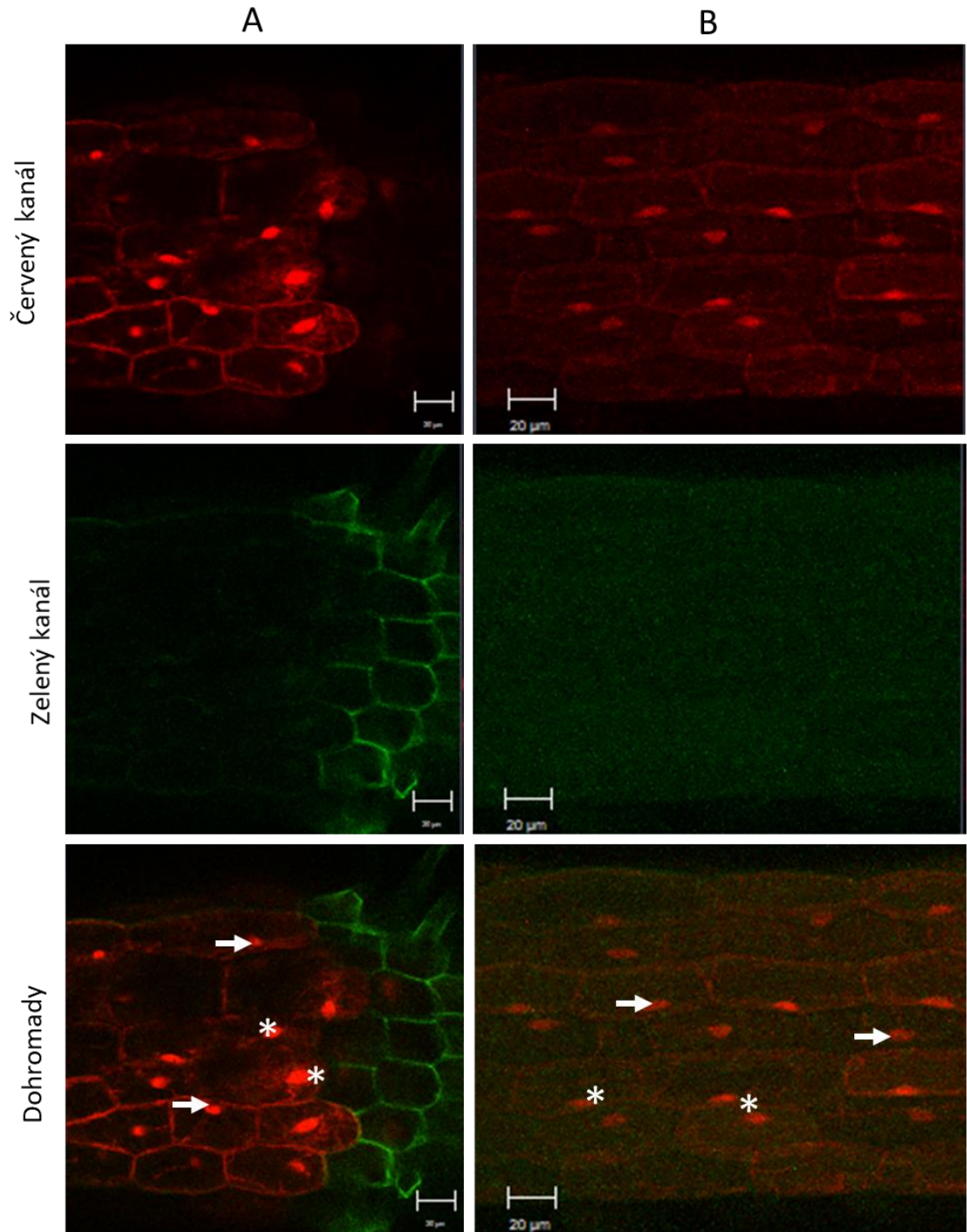
U *mpk3-5* MPK3-mCherry komplementované linie 2/5 (Obr. 39-42) byla pozorována vyšší fluorescence MPK3-mCherry fúzního proteinu než u linie 9/4 a u *mpk3-1* MPK3-mCherry komplementovaných linií 3/5 a 4/2 (Obr. 43-46). Důvodem může být poziční efekt vloženého inzertu *pMPK3::gMPK3:mCherry*.



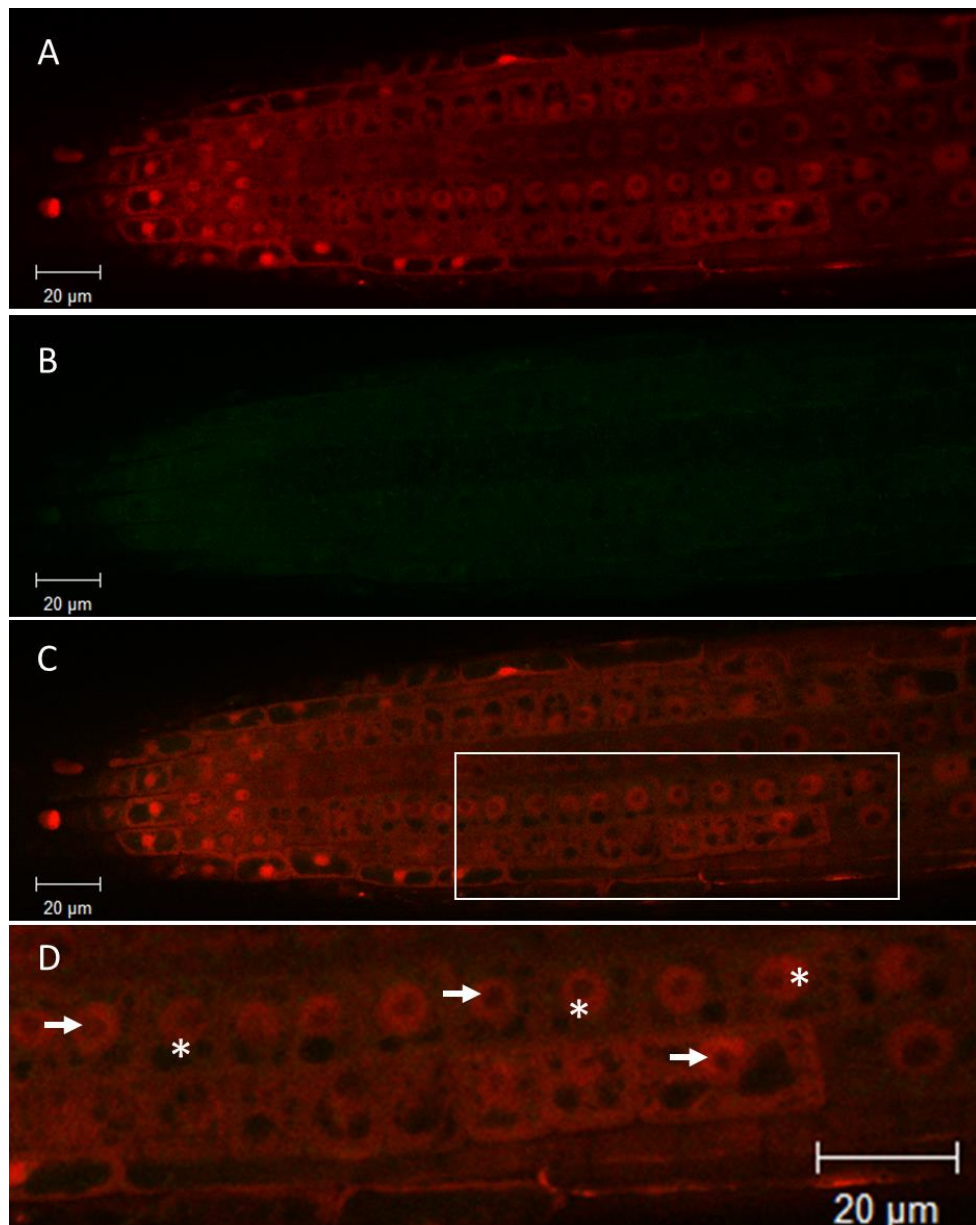
Obr. 39 Mikroskopická analýza T3 generace komplementovaných linií *mpk3-5* konstruktem *pMPK3::gMPK3:mCherry*. Snímky z konfokálního mikroskopu s měřítkem 20 µm. Mikroskopie prvního klíčného listu u 5denních semenáčků. Značený protein MPK3-mCherry pod nativním promotorem (A), autofluorescence chloroplastů (B), sloučený obrázek (C) pro kontrolu překryvu kanálů a detail ohraničené části obrázku C (D) s vyznačenými jádry (hvězdička) a jadérky (šipka). (Projekce maximální intenzity; mikroskop LSM 710 Axio Imager 2 Zeiss; objektiv Plan-Apochromat 20x/0,8 M27)



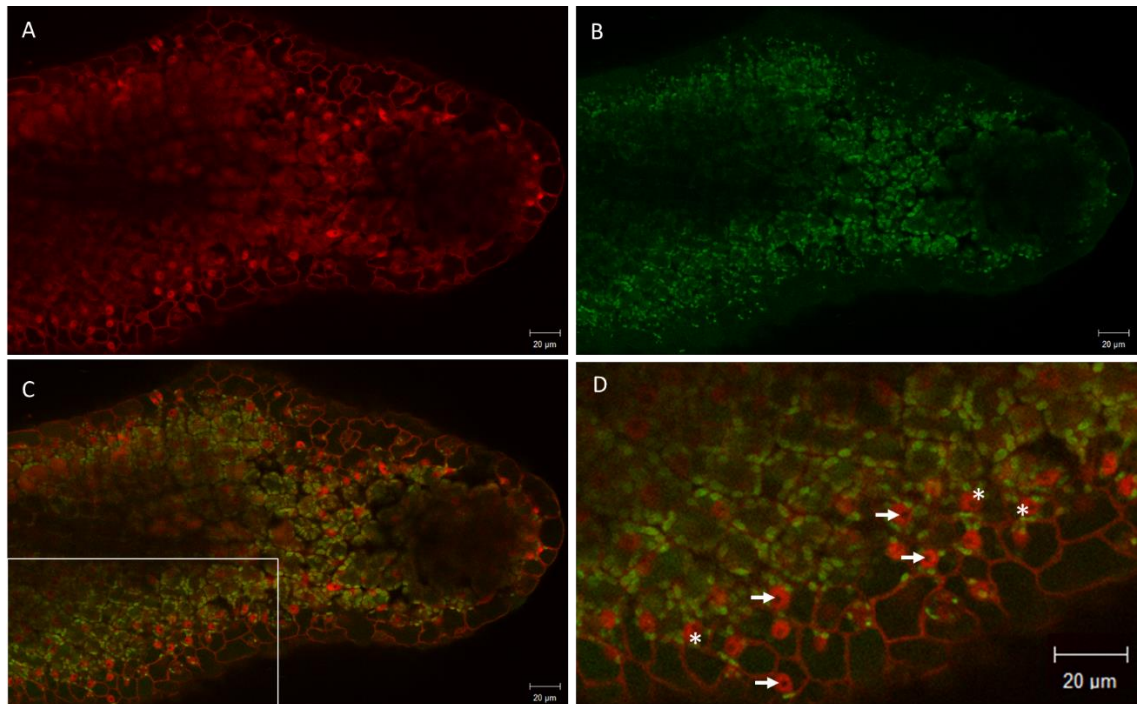
Obr. 40 Mikroskopická analýza T3 generace komplementovaných linií *mpk3-5* konstruktem *pMPK3::gMPK3:mCherry*. Snímky z konfokálního mikroskopu s měřítkem 20 µm. Mikroskopie kotyledonů (A), apikálního meristému stonku (B) a hypokotylu (C) u 5denních semenáčků *A. thaliana*. Značený protein MPK3-mCherry pod nativním promotorem (červený kanál), autofluorescence chloroplastů (zelený kanál) a sloučený obrázek (dohromady) pro kontrolu překryvu kanálů. Vyznačená jádra (hvězdička) a jadérka (šipka). (Projekce maximální intenzity; mikroskop LSM 710 Axio Imager 2 Zeiss; objektiv Plan-Apochromat 20x/0,8 M27)



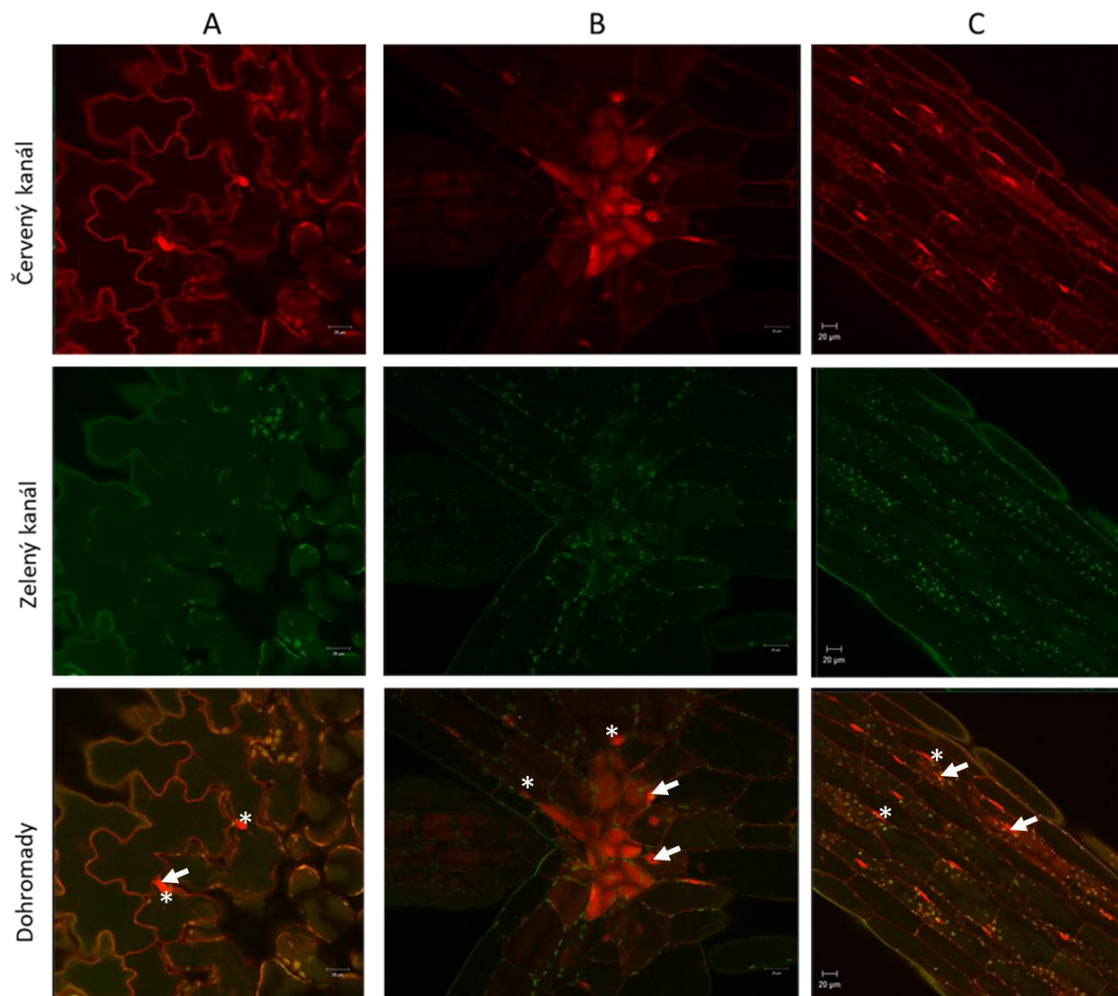
Obr. 41 Mikroskopická analýza T3 generace komplementovaných linií *mpk3-5* konstruktem *pMPK3::gMPK3:mCherry*. Snímky z konfokálního mikroskopu s měřítkem 20 μm . Mikroskopie basální části kořene (A) a kořene (B) u 5denních semenáčků *A. thaliana*. Značený protein MPK3-mCherry pod nativním promotorem (červený kanál), autofluorescence (zelený kanál) a sloučený obrázek (dohromady) pro kontrolu překryvu kanálů. Vyznačená jádra (hvězdička) a jadérka (šipka). (Mikroskop LSM 710 Axio Imager 2 Zeiss; objektiv Plan-Apochromat 20x/0,8 M27)



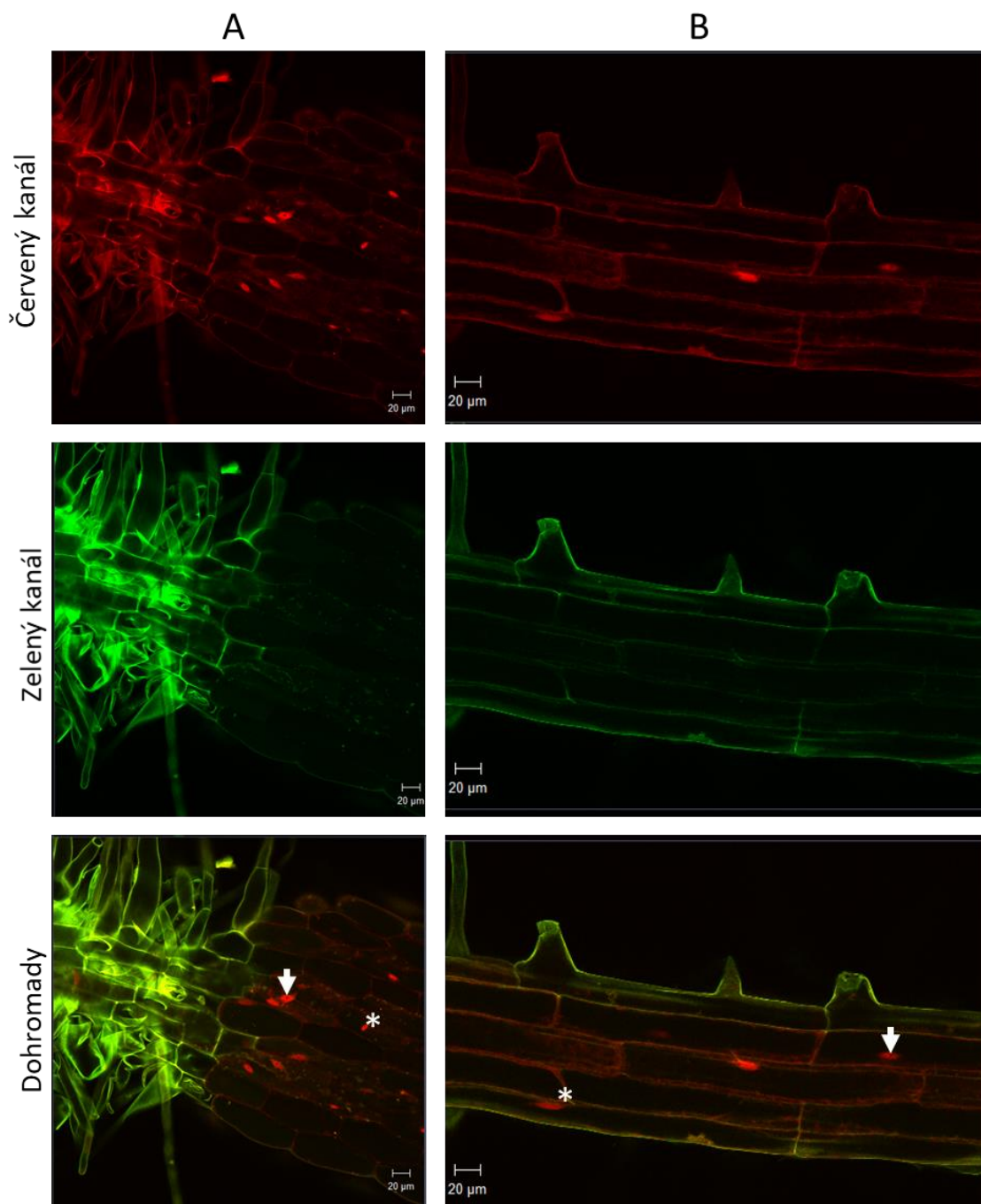
Obr. 42 Mikroskopická analýza T3 generace komplementovaných linií *mpk3-5* konstruktem *pMPK3::gMPK3:mCherry*. Snímky z konfokálního mikroskopu s měřítkem 20 µm. Mikroskopie kořenové špičky u 5denních semenáčků *A. thaliana*. Značený protein MPK3-mCherry pod nativním promotorem (A), autofluorescence chloroplastů (B), sloučený obrázek (C) pro kontrolu překryvu kanálů a detail ohraničené části snímku C (D) s vyznačenými jádry (hvězdička) a jadérky (šipka). (Projekce maximální intenzity; mikroskop LSM 710 Axio Imager 2 Zeiss; objektiv Plan-Apochromat 20x/0,8 M27)



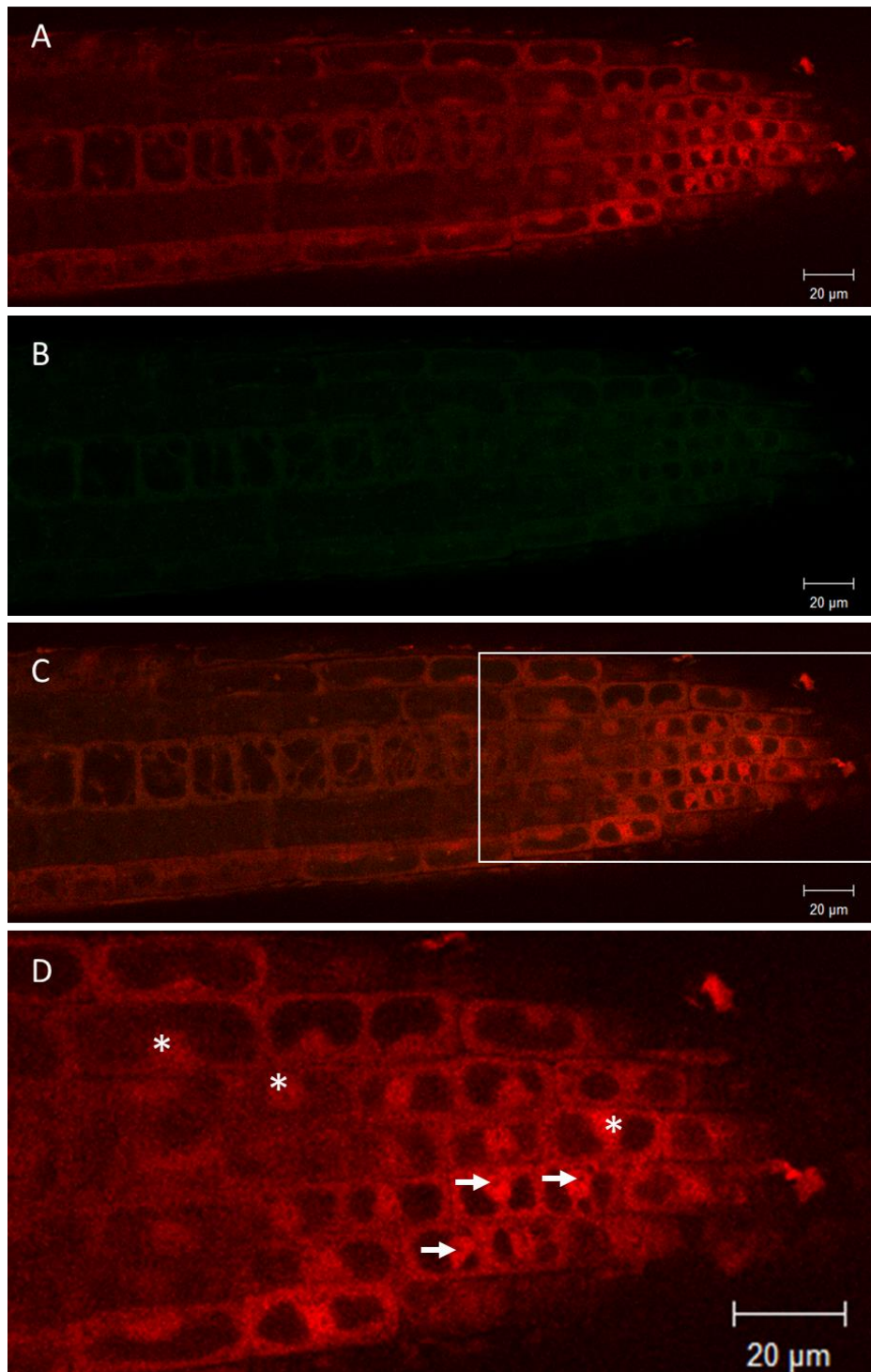
Obr. 43 Mikroskopická analýza T3 generace komplementovaných linií *mpk3-1* konstruktem *pMPK3::gMPK3:mCherry*. Snímky z konfokálního mikroskopu s měřítkem 20 μm . Mikroskopie prvního klíčného listu u 7denních semenáčků *A. thaliana*. Značený protein MPK3-mCherry pod nativním promotorem (A), autofluorescence chloroplastů (B), sloučený obrázek (C) pro kontrolu překryvu kanálů a detail obrázku A s vyznačenými jádry (hvězdička) a jadérky (šipka). (Mikroskop LSM 710 Axio Imager 2 Zeiss; objektiv Plan-Apochromat 20x/0,8 M27)



Obr. 44 Mikroskopická analýza T3 generace komplementovaných linií *mpk3-1* konstruktem *pMPK3::gMPK3:mCherry*. Snímky z konfokálního mikroskopu s měřítkem 20 μm . Mikroskopie kotyledonů (A), apikálního meristému stonku (B) a hypokotylu (C) u 7denních semenáčků *A. thaliana*. Značený protein MPK3-mCherry pod nativním promotorem (červený kanál), autofluorescence chloroplastů (zelený kanál) a sloučený obrázek (dohromady) pro kontrolu překryvu kanálů s vyznačenými jádry (hvězdička) a jadérky (šipka). (Mikroskop LSM 710 Axio Imager 2 Zeiss; objektiv Plan-Apochromat 20x/0,8 M27)



Obr. 45 Mikroskopická analýza T3 generace komplementovaných linií *mpk3-1* konstruktem *pMPK3::gMPK3:mCherry*. Snímky z konfokálního mikroskopu s měřítkem 20 μm . Mikroskopie basální části kořene (A) a kořene (B) u 7denních semenáčků *A. thaliana*. Značený protein MPK3-mCherry pod nativním promotorem (červený kanál), autofluorescence chloroplastů (zelený kanál) a sloučený obrázek (dohromady) pro kontrolu překryvu kanálů s vyznačenými jádry (hvězdička) a jádérky (šipka).. (Mikroskop LSM 710 Axio Imager 2 Zeiss; objektiv Plan-Apochromat 20x/0,8 M27)



Obr. 46 Mikroskopická analýza T3 generace komplementovaných linií *mpk3-1* konstruktem *pMPK3::gMPK3:mCherry*. Snímky z konfokálního mikroskopu s měřítkem 20 µm. Mikroskopie kořenové špičky u 7denních semenáčků *A. thaliana*. Značený protein MPK3-mCherry pod nativním promotorem (A), autofluorescence chloroplastů (B), sloučený obrázek (C) pro kontrolu překryvu kanálů a detail ohraničené části obrázku A (D) s vyznačenými jádry (hvězdička) a jadérky (šipka). (Projekce maximální intenzity; mikroskop LSM 710 Axio Imager 2 Zeiss; objektiv Plan-Apochromat 20x/0,8 M27)

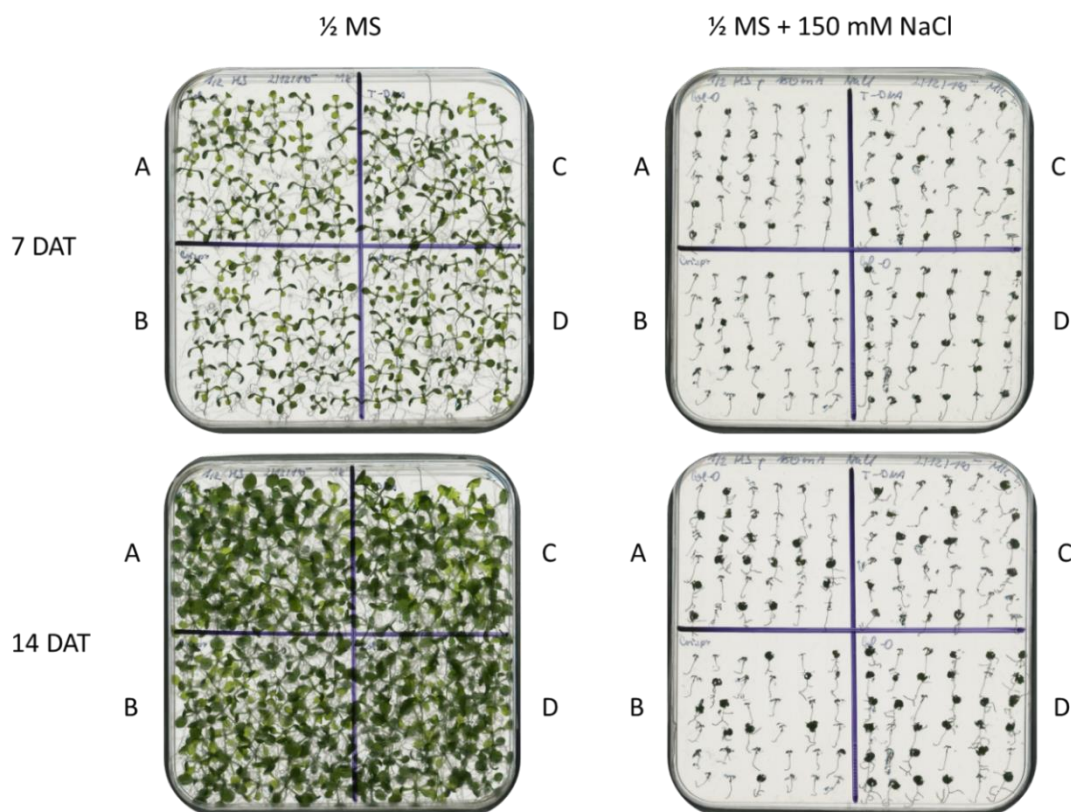
4.12 Aplikace solného stresu na komplementované rostliny v genu *MPK3*

Jak již bylo zmíněno výše, *MPK3* je zapojena do MAPK kaskády reagující na osmotický stres (Kim *et al.*, 2011). Při vyřazení z funkce rostliny vykazují hypersensitivní reakci na osmotický stres (Pitzschke *et al.*, 2014). Z tohoto důvodu byla úspěšnost komplementační eseje *MPK3* genu v *mpk3* mutantních rostlinách testována osmotickým stresem. Pro tento experiment byly vybrány homozygotní linie generace T3 komplementované konstruktem *pMPK3::gMPK3:mCherry*. Semena *A. thaliana* homozygotních linií *MPK3-mCherry* generace T3 byla po třech dnech kultivace na čistém ½ MS médiu přemístěna na ½ MS médium s obsahem 150 mM NaCl a semenáčky byly kultivovány po dobu 14 dní. Jako kontrola byly použity rostliny ekotypu Col-0 a mutantní rostliny *mpk3-5* a *mpk3-1*.

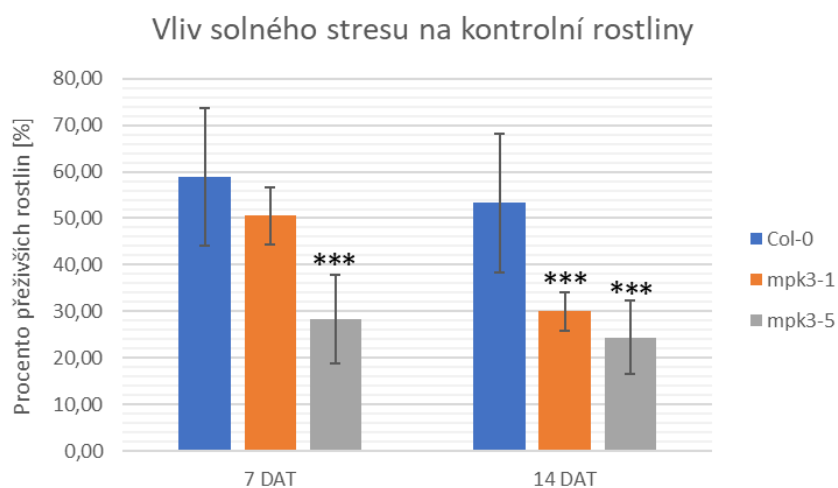
Před samotným pokusem byl proveden kontrolní experiment pro porovnání odolnosti *mpk3-1* a *mpk3-5* mutantních rostlin oproti rostlinám ekotypu Col-0 (Obr. 47, 48). Po 7 dnech bylo možné pozorovat rapidně nižší počet přeživších *mpk3-5* mutantních rostlin oproti kontrolním rostlinám (Obr. 47, 48). Rozdíly v *mpk3-1* mutantních rostlinách a kontrolních rostlinách byly patrné až po 14 dnech kultivace na solném médiu (Obr. 47, 48). U obou mutantních linií *mpk3* byl pozorován nižší počet přeživších semenáčků na médiu s přidavkem soli než u rostlin ekotypu Col-0 (Obr. 48).

Tento kontrolní experiment potvrzuje, že *mpk3* mutantní rostliny linie *mpk3-1* i *mpk3-5* jsou sensitivnější na osmotický stres než rostliny kontrolní, což dokazuje i studie provedena dříve na *mpk3-1* mutantních rostlinách při působení 250 mM NaCl v médiu (Pitzschke *et al.*, 2014). Větší náchylnost *mpk3-5* mutantních linií *A. thaliana* oproti rostlinám Col-0 byla testována již dříve, a to při aplikaci stejných podmínek, tedy 150 mM NaCl na 3denní semenáčky *mpk3-5* mutantních linií a Col-0 (Janálová, 2018).

Pomalejší odumírání rostlin linie *mpk3-1* oproti rostlinám linie *mpk3-5* může být způsobeno různou technikou přípravy těchto linií. V případě *mpk3-5* mutantních linií byla použita metoda Crispr/Cas9, která způsobuje dvouřetězcové zlomy v DNA. Dvouřetězcové zlomy jsou následně opravovány mechanismy buněk a může docházet k bodovým inzercím nebo delecím, a tím k posunutí čtecího rámce a zastavení tvorby *MPK3* proteinu (Fauser *et al.*, 2014); Janálová, 2018). V případě *mpk3-1* mutantních linií byl gen *MPK3* vyřazen inzercí T-DNA do sekvence *MPK3* genu, čímž nedochází k expresi genu *MPK3* (Alonso, 2003).



Obr. 47 Působení osmotického stresu na kontrolní rostliny *A. thaliana*. Na každé misce byl kultivován stejný počet mutantních rostlin *mpk3-1* (C), *mpk3-5* (B) a dvojnásobný počet rostlin ekotypu Col-0 (A, D). Po aplikaci osmotického stresu byl pozorován významný rozdíl mezi mutantními liniemi *mpk3* a rostlinami Col-0.

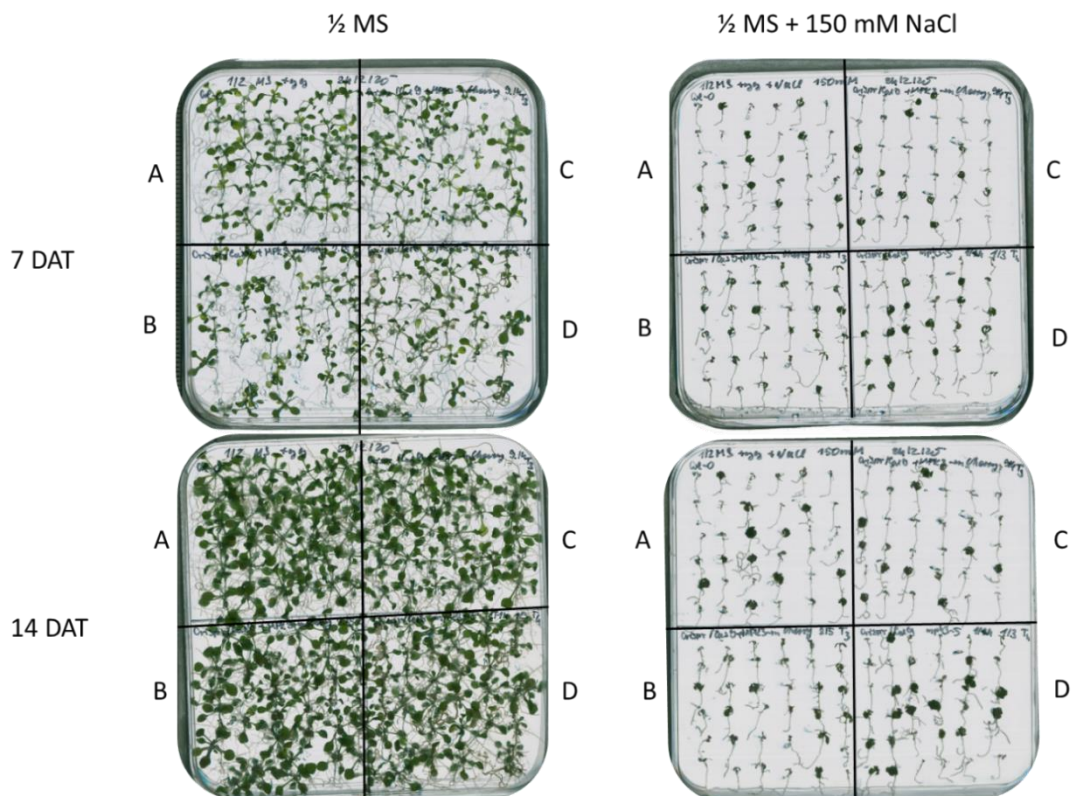


Obr. 48 Graf reakce kontrolních rostlin na osmotický stres po 7 (7 DAT) a 14 dnech po ošetření (14 DAT). Procento přeživších rostlin při kontrolním pokusu. Jako kontrolní rostliny byly použity linie *mpk3-1* (oranžová), *mpk3-5* (šedá) a rostliny ekotypu Col-0 (modrá). Tři hvězdičky značí statisticky významný rozdíl mezi Col-0 a kontrolními rostlinami dle studentova t-testu ($p < 0,001$).

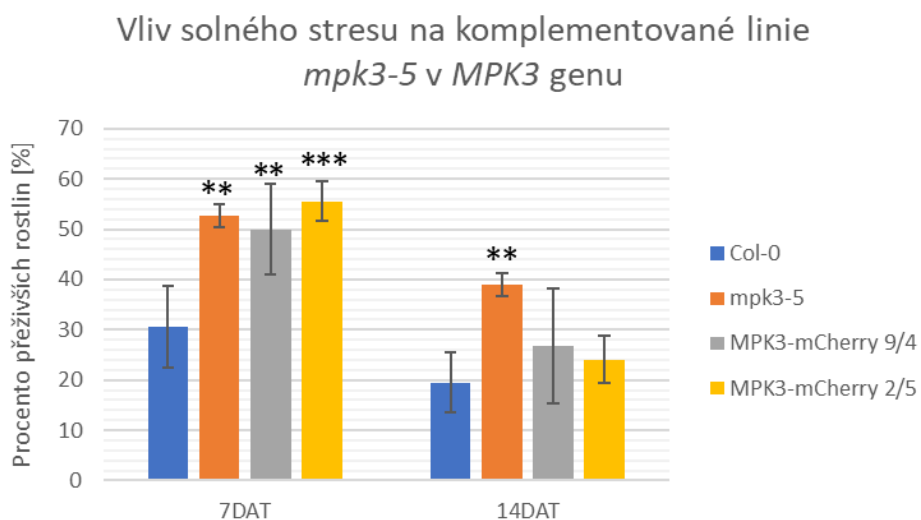
Ačkoli se předpokládalo, že po komplementaci *MPK3* genu v *mpk3-1* a *mpk3-5* mutantních rostlinách budou tyto linie vykazovat vyšší odolnost vůči osmotickému stresu než mutantní rostliny *mpk3*, zvýšená rezistence se neprokázala. Při působení osmotického stresu na komplementované linie v *MPK3* genu bylo pozorované porovnatelné množství v počtu přeživších u *mpk3* mutantních rostlin a komplementovaných rostlin v *MPK3* genu (Obr. 49, 50, 51, 52).

Přestože množství přeživších *mpk3* mutantních rostlin bylo porovnatelné oproti kontrolnímu pokusu (Obr. 48, 50, 52), počet živých semenáčků Col-0 byl znatelně nižší, a to už po 7 dnech od kultivace na solném médiu (Obr. 48, 50, 52). Zajímavé je, že mutantní rostliny *mpk3* v tomto případě prokazovaly signifikantně vyšší odolnost vůči osmotickému stresu oproti rostlinám Col-0 (Obr. 48, 50, 52), což odporuje výsledkům z kontrolního experimentu (Obr. 47, 48). Příčinou snížené schopnosti reagovat na osmotický stres u rostlin ekotypu Col-0 oproti mutantním rostlinám *mpk3* v tomto případě může být způsobeno použitím jiných kontrolních semen Col-0 než při kontrolním experimentu např. jinak sterilizovaných semen nebo starších semen.

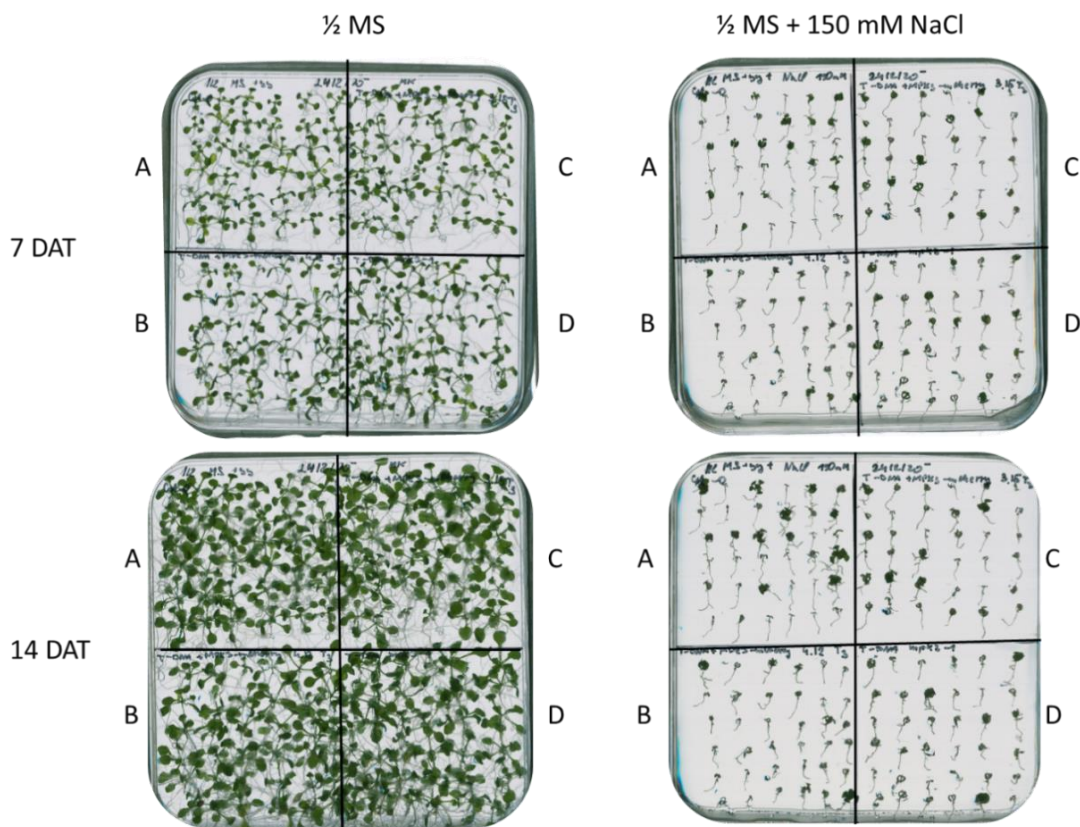
Pro určení úspěšnosti komplementační eseje je nutné v budoucnu tento experiment opakovat. Jasnějšího výsledku může být docíleno např. použitím další kontrolní rostliny exprimující *pMPK3::mCherry* pro určení nezávadnosti fluorescenčního proteinu a větším množstvím opakování. Dále je nutné provést fenotypovou analýzu komplementovaných linií oproti rostlinám Col-0 a *mpk3*.



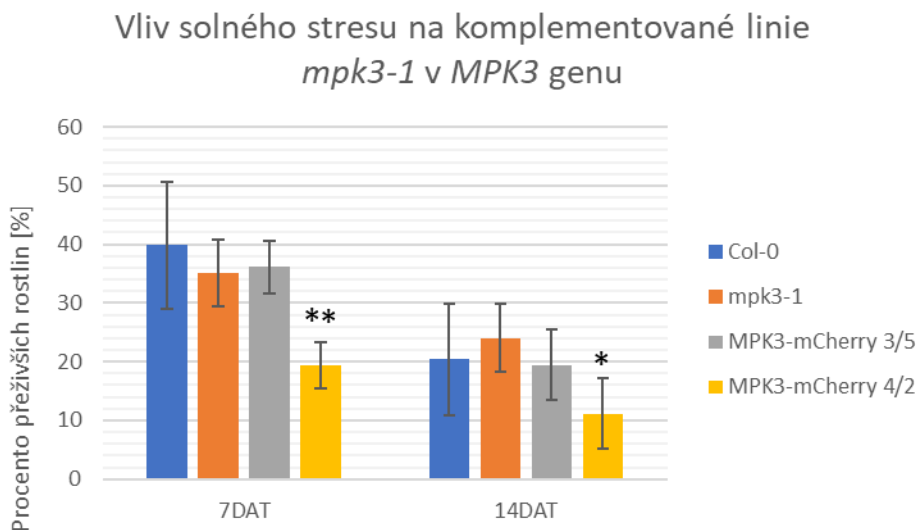
Obr. 49 Působení osmotického stresu na komplementované linie *A. thaliana* v genu *MPK3* generace T3 na pozadí *mpk3-5* mutantních rostlin. Na každé misce byl kultivován stejný počet komplementovaných semenáčků linií 9/4 a 2/5 (B, C), rostlin Col-0 (A) a mutantních rostlin *mpk3-1* (D). Po aplikaci osmotického stresu nebyl pozorován významný rozdíl u komplementovaných a mutantních rostlin v počtu přeživších semenáčků.



Obr. 50 Graf reakce komplementovaných rostlin na osmotický stres po 7 a 14 dnech po ošetření. Procento přeživších rostlin po aplikaci 150 mM NaCl po 7 (7 DAT) a 14 dnech kultivace (14 DAT). (A) Vliv osmotického stresu na komplementované linie *mpk3-5*. Rostliny Col-0 (modrá), *mpk3-5* (oranžová) a komplementované linie 9/4 (šedá) a 2/5 (žlutá) generace T3. Hvězdičky značí statisticky významný rozdíl mezi Col-0 a ostatními rostlinami dle studentova t-testu (3 = $p < 0,001$; 2 = $p < 0,01$; 1 = $p < 0,05$).



Obr. 51 Působení osmotického stresu na komplementované linie *A. thaliana* v genu *MPK3* generace T3 na pozadí *mpk3-1* mutantních rostlin. Na každé misce byl kultivován stejný počet komplementovaných semenáčků linií 18/3-5 a 18/4-2 generace T3 (B, C), rostlin Col-0 (A) a mutantních rostlin *mpk3-1* (D). Po působení osmotického stresu nebyl opět pozorován významný rozdíl u komplementovaných a mutantních rostlin v počtu přeživších rostlin.



Obr. 52 Graf reakce komplementovaných rostlin na osmotický stres po 7 a 14 dnech po ošetření. Procento přeživších rostlin po aplikaci 150 mM NaCl po 7 (7 DAT) a 14 dnech kultivace (14 DAT). Vliv osmotického stresu na komplementované linie *mpk3-1*. Rostliny Col-0 (modrá), *mpk3-1* (oranžová) a komplementované linie 3/5 (šedá) a 4/2 (žlutá) generace T3. Hvězdičky značí statisticky významný rozdíl mezi Col-0 a ostatními rostlinami dle studentova t-testu (3 = $p < 0,001$; 2 = $p < 0,01$; 1 = $p < 0,05$).

5 ZÁVĚR

V teoretické části byla vypracována literární rešerše na téma mitogen aktivované proteinkinasy (MAPKs) v modelovém organismu *Arabidopsis thaliana*. Kapitoly o MAPKs se zaměřují především na mitogen aktivovanou proteinkinasu kinasu kinasu (MAP3K) YODA a mitogen aktivovanou proteinkinasu 3 (MPK3) a jejich společné zapojení v signálních kaskádách ovlivňujících vývoj stomat, embryogenezi a růstu organismů. Kapitola o MPK3 shrnuje další signální dráhy zapojení MPK3 při abiotickém a biotickém stresu např. při solném nebo oxidativním stresu.

Experimentální část je zaměřena na molekulární klonování konstruktů pro expresi YODA pod nativním promotorem ve fúzi s GFP nebo RFP na C- konci a dále na komplementační esej *MPK3* genu v *mpk3* mutantních liniích *A. thaliana*.

Molekulárním klonováním metodou Gateway[®] byly připraveny 4 různé konstrukty pro expresi YODA pod nativním promotorem ve fúzi s fluorescenčními značkami. Pomocí transientní transformace *N. benthamiana* bylo ověřeno, že všechny konstrukty tvoří značený protein YODA. Selekcí transformovaných linií *A. thaliana* pomocí selekčního markeru přítomného v konstruktech bylo získáno 6 rostlin pozitivních na YODA-GFP konstrukt, ale pouze u dvou rostlin byl pomocí metody PCR detekován konstrukt v genomu. U transformovaných linií byla dále testována přítomnost fúzního proteinu. Jak se předpokládalo, protein YODA-GFP byl detekován pouze u pozitivních linií z genotypizace. Mikroskopickou analýzou těchto linií byl fúzní protein pozorován v kortikální oblasti pod plasmatickou membránou a cytoplasmě buněk. Selekcí se nepodařilo získat žádnou rostlinu pozitivní na YODA-RFP konstrukt.

Pro komplementaci genu *MPK3* byly použity linie *mpk3* s vyřazeným genem T-DNA inzercí (*mpk3-1*) a připravené metodou CRISPR/Cas9 (*mpk3-5*). Linie byly transformované konstruktem exprimující *MPK3* pod nativním promotorem s C- terminální fúzí s mCherry. Selekcí pomocí selekčního markeru přítomného v konstruktu se podařilo získat velké množství rostlin jak na pozadí *mpk3-1*, tak na pozadí *mpk3-5*. Metodou PCR byla ověřena integrace konstruktu do genomu rostlin. Přítomnost konstruktu byla detekována v 12 rostlinách na pozadí *mpk3-1* a 16 rostlinách na pozadí *mpk3-5* a v 1 rostlině na pozadí Col-0. U těchto rostlin byla dále testována přítomnost proteinu MPK3. Protein MPK3-mCherry byl detekován u 4 rostlin na pozadí *mpk3-1*, 4 rostlin na pozadí *mpk3-5* a 1 rostliny na pozadí Col-0. Bylo zjištěno, že fúzní protein MPK3-mCherry je náchylný na štěpení při přípravě vzorků na proteinovou analýzu

působením vysoké teploty. Pomocí selekce na selekční marker v konstruktu byly z pozitivních rostlin selektovány homozygotní linie v generaci T3. Generace T3 byla použita pro mikroskopickou analýzu, kde byla potvrzena tvorba MPK3-mCherry fúzního proteinu jak u rostlin na pozadí *mpk3-1*, tak u rostlin na pozadí *mpk3-5*. Mikroskopickou analýzou byla také zjištěna lokalizace fúzního proteinu MPK3-mCherry na buněčné a pletivové úrovni. Jak se předpokládalo, protein MPK3-mCherry byl pozorován v kortikální oblasti pod plasmatickou membránou, cytoplasmě a jádře buněk. Fúzní protein MPK3-mCherry byl abundantní v rostlinách převážně v nadzemních částech, a to v listech, apikálním meristému stonku a hypokotylu, ale také v podzemních částech, a to v kořenové špičce rostlin. U homozygotních linií generace T3 byla zjišťována účinnost komplementační eseje *MPK3* genu v *mpk3* mutantních liniích testováním reakce komplementovaných rostlin na solný stres v podobě přídatku 150 mM NaCl do kultivačního média. Kvůli nekonzistentním výsledkům kontrolních rostlin (Col-0, *mpk3*) nebylo možné určit účinnost komplementační eseje. Tento experiment bude v budoucnu opakován.

6 POUŽITÁ LITERATURA

- Alonso J. M., Stepanova A. N., Lisse T. J., Kim C. J., Chen H., Shinn P., Stevenson D. K., 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., Risseuw E., Brogden D., Zeko A., Crosby W. L., Berry C. C., Ecker J. R. (2003): Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science (New York, N.Y.)* **301**, 653–657.
- Alzwy I. A., Morris P. C. (2007): A mutation in the *Arabidopsis* MAP kinase kinase 9 gene results in enhanced seedling stress tolerance. *Plant Science* **173**, 302–308.
- Andreasson E., Ellis B. (2010): Convergence and specificity in the *Arabidopsis* MAPK nexus. *Trends in Plant Science* **15**, 106–113.
- 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.
- Balcerowicz M., Ranjan A., Rupprecht L., Fiene G., Hoecker U. (2014): Auxin represses stomatal development in dark-grown seedlings via Aux/IAA proteins. *Development* **141**, 3165–3176.
- Barceló J., Poschenrieder C. (1990): Plant water relations as affected by heavy metal stress: A review. *Journal of Plant Nutrition* **13**, 1–37.
- Bayer M., Nawy T., Giglione C., Galli M., Meinel T., Lukowitz W. (2009): Paternal Control of Embryonic Patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Science* **323**, 1485–1488.
- Bayer M., Slane D., Jürgens G. (2017): Early plant embryogenesis-dark ages or dark matter? *Current Opinion in Plant Biology* **35**, 30–36.
- Beck M., Komis G., Müller J., Menzel D., Samaj J. (2010): *Arabidopsis* homologs of nucleus- and phragmoplast-localized kinase 2 and 3 and mitogen-activated protein kinase 4 are essential for microtubule organization. *The Plant Cell* **22**, 755–771.
- Bergmann D. C. (2004): Stomatal Development and Pattern Controlled by a MAPKK Kinase. *Science* **304**, 1494–1497.
- Bergmann D. C., Sack F. D. (2007): Stomatal Development. *Annual Review of Plant Biology* **58**, 163–181.
- Brodersen P., Petersen M., Bjørn Nielsen H., Zhu S., Newman M.-A., Shokat K. M., Rietz S., Parker J., Mundy J. (2006): *Arabidopsis* MAP kinase 4 regulates salicylic acid- and jasmonic acid/ethylene-dependent responses via EDS1 and PAD4. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* **47**, 532–546.
- Burack W. R., Shaw A. S. (2000): Signal transduction: hanging on a scaffold. *Current Opinion in Cell Biology* **12**, 211–216.
- Bush S. M., Krysan P. J. (2007): Mutational evidence that the *Arabidopsis* MAP kinase MPK6 is involved in anther, inflorescence, and embryo development. *Journal of Experimental Botany* **58**, 2181–2191.
- Cardinale F., Meskiene I., Ouaked F., Hirt H. (2002): Convergence and divergence of stress-induced mitogen-activated protein kinase signaling pathways at the level of two distinct mitogen-activated protein kinase kinases. *The Plant Cell* **14**, 703–711.
- Clough S. J., Bent A. F. (1998): Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* **16**, 735–743.
- Colcombet J., Hirt H. (2008): *Arabidopsis* MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *The Biochemical Journal* **413**, 217–226.
- Dai Y., Wang H., Li B., Huang J., Liu X., Zhou Y., Mou Z., Li J. (2006): Increased expression of MAP KINASE KINASE7 causes deficiency in polar auxin transport and leads to plant architectural abnormality in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **18**, 308–320.

- Danquah A., de Zélicourt A., Boudsocq M., Neubauer J., Frei Dit Frey N., Leonhardt N., Pateyron S., Gwinner F., Tamby J.-P., Ortiz-Masia D., Marcote M. J., Hirt H., Colcombet J. (2015): Identification and characterization of an ABA-activated MAP kinase cascade in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* **82**, 232–244.
- Danquah A., de Zelicourt A., Colcombet J., Hirt H. (2014): The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses. *Biotechnology Advances* **32**, 40–52.
- Davis A. M., Hall A., Millar A. J., Darrah C., Davis S. J. (2009): Protocol: Streamlined sub-protocols for floral-dip transformation and selection of transformants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Methods* **5**, 3.
- Dóczi R., Brader G., Pettkó-Szandtner A., Rajh I., Djamei A., Pitzschke A., Teige M., Hirt H. (2007): The *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinase MKK3 is upstream of group C mitogen-activated protein kinases and participates in pathogen signaling. *The Plant Cell* **19**, 3266–3279.
- Dong J., MacAlister C. A., Bergmann D. C. (2009): BASL Controls Asymmetric Cell Division in *Arabidopsis*. *Cell* **137**, 1320–1330.
- Droillard M., Boudsocq M., Barbier-Brygoo H., Laurière C. (2002): Different protein kinase families are activated by osmotic stresses in *Arabidopsis thaliana* cell suspensions. Involvement of the MAP kinases AtMPK3 and AtMPK6. *FEBS letters* **527**, 43–50.
- Droillard M.-J., Boudsocq M., Barbier-Brygoo H., Laurière 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**, 42–48.
- Duerr B., Gawienowski M., Ropp T., Jacobs T. (1993): MsERK1: a mitogen-activated protein kinase from a flowering plant. *The Plant Cell* **5**, 87–96.
- Fausser F., Schiml S., Puchta H. (2014): Both CRISPR/Cas-based nucleases and nickases can be used efficiently for genome engineering in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **79**, 348–359.
- Gao M., Liu J., Bi D., Zhang Z., Cheng F., Chen S., Zhang Y. (2008): MEKK1, MKK1/MKK2 and MPK4 function together in a mitogen-activated protein kinase cascade to regulate innate immunity in plants. *Cell Research* **18**, 1190–1198.
- Geisler M., Nadeau J., Sack F. D. (2000): Oriented Asymmetric Divisions That Generate the Stomatal Spacing Pattern in *Arabidopsis* Are Disrupted by the too many mouths Mutation. *The Plant Cell* **12**, 2075–2086.
- Gill S. S., Tuteja N. (2010): Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **48**, 909–930.
- Guan Y., Lu J., Xu J., McClure B., Zhang S. (2014): Two Mitogen-Activated Protein Kinases, MPK3 and MPK6, Are Required for Funicular Guidance of Pollen Tubes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **165**, 528–533.
- Hamel L.-P., Nicole M.-C., Sritubtim S., Morency M.-J., Ellis M., Ehltng J., Beaudoin N., Barbazuk B., Klessig D., Lee J., Martin G., Mundy J., Ohashi Y., Scheel D., Sheen J., Xing T., Zhang S., Seguin A., Ellis B. E. (2006): Ancient signals: comparative genomics of plant MAPK and MAPKK gene families. *Trends in Plant Science* **11**, 192–198.
- Harrison S. J., Mott E. K., Parsley K., Aspinall S., Gray J. C., Cottage A. (2006): A rapid and robust method of identifying transformed *Arabidopsis thaliana* seedlings following floral dip transformation. *Plant Methods* **2**, 19.
- Herbette S., Taconnat L., Hugouvieux V., Piette L., Magniette M.-L. M., Cuine S., Auroy P., Richaud P., Forestier C., Bourguignon J., Renou J.-P., Vavasseur A., Leonhardt N. (2006): Genome-wide transcriptome profiling of the early cadmium response of *Arabidopsis* roots and shoots. *Biochimie* **88**, 1751–1765.
- Hoehenwarter W., Thomas M., Nukarinen E., Egelhofer V., Röhrig H., Weckwerth W., Conrath U., Beckers G. J. M. (2013): Identification of Novel in vivo MAP Kinase Substrates in *Arabidopsis thaliana* Through Use of Tandem Metal Oxide Affinity Chromatography. *Molecular & Cellular Proteomics* **12**, 369–380.

- Hooper C. M., Castleden I. R., Tanz S. K., Aryamanesh N., Millar A. H. (2017): SUBA4: the interactive data analysis centre for *Arabidopsis* subcellular protein locations. *Nucleic Acids Research* **45**, D1064–D1074.
- Evrogen pdf dokument: http://evrogen.com/b.r.Anti-tRFP_antibody.pdf (2. 4. 2020)
- Huang Y., Li H., Gupta R., Morris P. C., Luan S., Kieber J. J. (2000): ATMPK4, an *Arabidopsis* homolog of mitogen-activated protein kinase, is activated in vitro by AtMEK1 through threonine phosphorylation. *Plant Physiology* **122**, 1301–1310.
- Chaiwongsar S., Otegui M. S., Jester P. J., Monson S. S., Krysan P. J. (2006): The protein kinase genes MAP3K ϵ 1 and MAP3K ϵ 2 are required for pollen viability in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **48**, 193–205.
- Champion A., Picaud A., Henry Y. (2004): Reassessing the MAP3K and MAP4K relationships. *Trends in Plant Science* **9**, 123–129.
- Chang L., Karin M. (2001): Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* **410**, 37–40.
- Chen L., Wu Z., Hou S. (2020): SPEECHLESS Speaks Loudly in Stomatal Development. *Frontiers in Plant Science* **11**, 114.
- Cho S. K., Larue C. T., Chevalier D., Wang H., Jinn T.-L., Zhang S., Walker J. C. (2008): Regulation of floral organ abscission in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 15629–15634.
- Ichimura *et al.* (2002): Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends in Plant Science* **7**, 301–308.
- 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.
- Illés P., Schlicht M., Pavlovkin J., Lichtscheidl I., Baluška F., Ovečka M. (2006): Aluminium toxicity in plants: internalization of aluminium into cells of the transition zone in *Arabidopsis* root apices related to changes in plasma membrane potential, endosomal behaviour, and nitric oxide production. *Journal of Experimental Botany* **57**, 4201–4213.
- Inzé D., De Veylder L. (2006): Cell cycle regulation in plant development. *Annual Review of Genetics* **40**, 77–105.
- Jammes F., Song C., Shin D., Munemasa S., Takeda K., Gu D., Cho D., Lee S., Giordo R., Sritubtim S., Leonhardt N., Ellis B. E., Murata Y., Kwak J. M. (2009): MAP kinases MPK9 and MPK12 are preferentially expressed in guard cells and positively regulate ROS-mediated ABA signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 20520–20525.
- Janálová L. (2018): Charakterizace mutantních linií mitogen-aktivované protein kinasy 3 z *A. thaliana* připravených pomocí technologie Crispr/Cas9. Bakalářská práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika.
- Jeong S., Palmer T. M., Lukowitz W. (2011): The RWP-RK factor GROUNDED promotes embryonic polarity by facilitating YODA MAP kinase signaling. *Current biology: CB* **21**, 1268–1276.
- Jia W., Li B., Li S., Liang Y., Wu X., Ma M., Wang J., Gao J., Cai Y., Zhang Y., Wang Yingchun, Li J., Wang Yonghong (2016): Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade MKK7-MPK6 Plays Important Roles in Plant Development and Regulates Shoot Branching by Phosphorylating PIN1 in *Arabidopsis*. *PLoS biology* **14**, e1002550.
- Jonak C., Nakagami H., Hirt H. (2004): Heavy Metal Stress. Activation of Distinct Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways by Copper and Cadmium. *Plant Physiology* **136**, 3276–3283.
- Jonak C., Okrész L., Bögre L., Hirt H. (2002): Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling. *Current Opinion in Plant Biology* **5**, 415–424.
- Jones J. D. G., Dangl J. L. (2006): The plant immune system. *Nature* **444**, 323–329.
- Jouannic S., Champion A., Segui-Simarro J.-M., Salimova E., Picaud A., Tregear J., Testillano P., Risueño M.-C., Simanis V., Kreis M., Henry Y. (2001): The protein kinases AtMAP3K ϵ 1 and BnMAP3K ϵ 1 are functional homologues of *S. pombe* cdc7p and may be involved in cell division. *The Plant Journal* **26**, 637–649.

- Kawashima T., Goldberg R. B. (2010): The suspensor: not just suspending the embryo. *Trends in Plant Science* **15**, 23–30.
- Khan M. N., Siddiqui M. H., Mohammad F., Naeem M. (2012): Interactive role of nitric oxide and calcium chloride in enhancing tolerance to salt stress. *Nitric Oxide* **27**, 210–218.
- Khan M., Rozhon W., Bigeard J., Pflieger D., Husar S., Pitzschke A., Teige M., Jonak C., Hirt H., Poppenberger B. (2013): Brassinosteroid-regulated GSK3/Shaggy-like kinases phosphorylate mitogen-activated protein (MAP) kinase kinases, which control stomata development in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry* **288**, 7519–7527.
- Khokhlatchev A. V., Canagarajah B., Wilsbacher J., Robinson M., Atkinson M., Goldsmith E., Cobb M. H. (1998): Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell* **93**, 605–615.
- Kieber J. J., Rothenberg M., Roman G., Feldmann K. A., Ecker J. R. (1993): CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the raf family of protein kinases. *Cell* **72**, 427–441.
- Kiegerl S., Cardinale F., Siligan C., Gross A., Baudouin E., Liwosz A., Eklöf S., Till S., Bögre L., Hirt H., Meskiene I. (2000): SIMKK, a mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase, is a specific activator of the salt stress-induced MAPK, SIMK. *The Plant Cell* **12**, 2247–2258.
- 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 T.-W., Michniewicz M., Bergmann D. C., Wang Z.-Y. (2012): Brassinosteroid regulates stomatal development by GSK3-mediated inhibition of a MAPK pathway. *Nature* **482**, 419–422.
- Kong Q., Qu N., Gao M., Zhang Z., Ding X., Yang F., Li Y., Dong O. X., Chen S., Li X., Zhang Y. (2012): The MEKK1-MKK1/MKK2-MPK4 Kinase Cascade Negatively Regulates Immunity Mediated by a Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **24**, 2225–2236.
- Kořistková M. (2018): Selekce mutantních linií mitogen-aktivované proteinkinasy 3 z *A. thaliana* připravených pomocí technologie Crispr/Cas9. Bakalářská práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika.
- Kosetsu K., Matsunaga S., Nakagami H., Colcombet J., Sasabe M., Soyano T., Takahashi Y., Hirt H., Machida Y. (2010): The MAP kinase MPK4 is required for cytokinesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* **22**, 3778–3790.
- Kovtun Y., Chiu W.-L., Tena G., Sheen J. (2000): Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 2940–2945.
- Krenek P., Samajova O., Luptovciak I., Dosekocilova A., Komis G., Samaj J. (2015): Transient plant transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*: Principles, methods and applications. *Biotechnology Advances* **33**, 1024–1042.
- Krysan P. J., Jester P. J., Gottwald J. R., Sussman M. R. (2002): An *Arabidopsis* Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase Gene Family Encodes Essential Positive Regulators of Cytokinesis. *The Plant Cell* **14**, 1109–1120.
- 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.
- Lampard G. R., Lukowitz W., Ellis B. E., Bergmann D. C. (2009): Novel and expanded roles for MAPK signaling in *Arabidopsis* stomatal cell fate revealed by cell type-specific manipulations. *The Plant Cell* **21**, 3506–3517.
- Lampard G. R., MacAlister C. A., Bergmann D. C. (2008): *Arabidopsis* Stomatal Initiation Is Controlled by MAPK-Mediated Regulation of the bHLH SPEECHLESS. *Science* **322**, 1113–1116.

- Laohavisit A., Colaço R., Davies J. (2012): Cytosolic Ca(2+) determinations in studying plant responses to salinity and oxidative stress. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* **913**, 163–171.
- Lau O. S., Bergmann D. C. (2012): Stomatal development: a plant's perspective on cell polarity, cell fate transitions and intercellular communication. *Development* **139**, 3683–3692.
- Lau S., Slane D., Herud O., Kong J., Jürgens G. (2012): Early embryogenesis in flowering plants: setting up the basic body pattern. *Annual Review of Plant Biology* **63**, 483–506.
- Le J., Liu X.-G., Yang K.-Z., Chen X.-L., Zou J.-J., Wang H.-Z., Wang M., Vanneste S., Morita M., Tasaka M., Ding Z.-J., Friml J., Beeckman T., Sack F. (2014): Auxin transport and activity regulate stomatal patterning and development. *Nature Communications* **5**, 1–8.
- Lee J. S., Ellis B. E. (2007): *Arabidopsis* MAPK Phosphatase 2 (MKP2) Positively Regulates Oxidative Stress Tolerance and Inactivates the MPK3 and MPK6 MAPKs. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 25020–25029.
- Lee J. S., Hnilova M., Maes M., Lin Y.-C. L., Putarjunan A., Han S.-K., Avila J., Torii K. U. (2015): Competitive binding of antagonistic peptides fine-tunes stomatal patterning. *Nature* **522**, 439–443.
- Lee J. S., Huh K. W., Bhargava A., Ellis B. E. (2008): Comprehensive analysis of protein-protein interactions between *Arabidopsis* MAPKs and MAPK kinases helps define potential MAPK signalling modules. *Plant Signaling & Behavior* **3**, 1037–1041.
- Lee J. S., Kuroha T., Hnilova M., Khatayevich D., Kanaoka M. M., McAbee J. M., Sarikaya M., Tamerler C., Torii K. U. (2012): Direct interaction of ligand–receptor pairs specifying stomatal patterning. *Genes & Development* **26**, 126–136.
- Li H., Ding Y., Shi Y., Zhang X., Zhang S., Gong Z., Yang S. (2017): MPK3- and MPK6-Mediated ICE1 Phosphorylation Negatively Regulates ICE1 Stability and Freezing Tolerance in *Arabidopsis*. *Developmental Cell* **43**, 630-642.e4.
- Li Z.-Y., Xu Z.-S., He G.-Y., Yang G.-X., Chen M., Li L.-C., Ma Y.-Z. (2012): A mutation in *Arabidopsis* BSK5 encoding a brassinosteroid-signaling kinase protein affects responses to salinity and abscisic acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **426**, 522–527.
- 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. C., Yun D.-J., Chung W. S. (2010): Cadmium activates *Arabidopsis* MPK3 and MPK6 via accumulation of reactive oxygen species. *Phytochemistry* **71**, 614–618.
- Liu Z., Li Y., Ma L., Wei H., Zhang J., He X., Tian C. (2014): Coordinated Regulation of Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Soybean MAPK Pathway Genes Improved Mycorrhizal Soybean Drought Tolerance. *Molecular Plant-Microbe Interactions®* **28**, 408–419.
- Locasale J. W., Shaw A. S., Chakraborty A. K. (2007): Scaffold proteins confer diverse regulatory properties to protein kinase cascades. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 13307–13312.
- Luan S. (2003): Protein phosphatases in plants. *Annual Review of Plant Biology* **54**, 63–92.
- Lukowitz W., Roeder A., Parmenter D., Somerville C. (2004): A MAPKK kinase gene regulates extra-embryonic cell fate in *Arabidopsis*. *Cell* **116**, 109–119.
- 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.
- Mahajan S., Tuteja N. (2005): Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **444**, 139–158.
- Melikant B., Giuliani C., Halbmayr-Watzina S., Limmongkon A., Heberle-Bors E., Wilson C. (2004): The *Arabidopsis thaliana* MEK AtMKK6 activates the MAP kinase AtMPK13. *FEBS letters* **576**, 5–8.
- Meng X., Chen X., Mang H., Liu C., Yu X., Gao X., Torii K. U., He P., Shan L. (2015): Differential Function of *Arabidopsis* SERK Family Receptor-like Kinases in Stomatal Patterning. *Current Biology* **25**, 2361–2372.
- Mészáros T., Helfer A., Hatzimasoura E., Magyar Z., Serazetdinova L., Rios G., Bardóczy V., Teige M., Koncz C., Peck S., Bögre L. (2006): The *Arabidopsis* MAP kinase kinase

- MKK1 participates in defence responses to the bacterial elicitor flagellin. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* **48**, 485–498.
- 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.
- Miles G. P., Samuel M. A., Zhang Y., Ellis B. E. (2005): RNA interference-based (RNAi) suppression of AtMPK6, an *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase, results in hypersensitivity to ozone and misregulation of AtMPK3. *Environmental Pollution* **138**, 230–237.
- Miller G., Suzuki N., Ciftci-Yilmaz S., Mittler R. (2010): Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell & Environment* **33**, 453–467.
- Mizoguchi T., Gotoh Y., Nishida E., Yamaguchi-Shinozaki K., Hayashida N., Iwasaki T., Kamada H., Shinozaki K. (1994): Characterization of two cDNAs that encode MAP kinase homologues in *Arabidopsis thaliana* and analysis of the possible role of auxin in activating such kinase activities in cultured cells. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* **5**, 111–122.
- Mizoguchi T., Hayashida N., Yamaguchi-Shinozaki K., Kamada H., Shinozaki K. (1993): ATMPKs: a gene family of plant MAP kinases in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS letters* **336**, 440–444.
- Munns R., Tester M. (2008): Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annual Review of Plant Biology* **59**, 651–681.
- Murata T., Sano T., Sasabe M., Nonaka S., Higashiyama T., Hasezawa S., Machida Y., Hasebe M. (2013): Mechanism of microtubule array expansion in the cytokinetic phragmoplast. *Nature Communications* **4**, 1967.
- Musielak T. J., Bayer M. (2014): YODA signalling in the early *Arabidopsis* embryo. *Biochemical Society Transactions* **42**, 408–412.
- Nadeau J. A., Sack F. D. (2002a): Stomatal Development in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis Book* **2002**.
- Nadeau J. A., Sack F. D. (2002b): Control of Stomatal Distribution on the *Arabidopsis* Leaf Surface. *Science* **296**, 1697–1700.
- Nocito F. F., Pirovano L., Cocucci M., Sacchi G. A. (2002): Cadmium-Induced Sulfate Uptake in Maize Roots. *Plant Physiology* **129**, 1872–1879.
- Nyitrai P., Bóka K., Gáspár L., Sárvári E., Lenti K., Keresztes A. (2003): Characterization of the stimulating effect of low-dose stressors in maize and bean seedlings. *Journal of Plant Physiology* **160**, 1175–1183.
- O'Brien J. A., Daudi A., Butt V. S., Paul Bolwell G. (2012): Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. *Planta* **236**, 765–779.
- Opendakker K., Remans T., Vangronsveld J., Cuypers A. (2012): Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinases in Plant Metal Stress: Regulation and Responses in Comparison to Other Biotic and Abiotic Stresses. *International Journal of Molecular Sciences* **13**, 7828–7853.
- Pearce A. K., Humphrey T. C. (2001): Integrating stress-response and cell-cycle checkpoint pathways. *Trends in Cell Biology* **11**, 426–433.
- Perfus-Barbeoch L., Leonhardt N., Vavasseur A., Forestier C. (2002): Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. *The Plant Journal* **32**, 539–548.
- Persak H., Pitzschke A. (2013): Tight Interconnection and Multi-Level Control of *Arabidopsis* MYB44 in MAPK Cascade Signalling. *PLoS ONE* **8**.
- Pillitteri L. J., Dong J. (2013): Stomatal Development in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis Book* **2013**.
- 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.

- 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.
- Popescu S. C., Popescu G. V., Bachan S., Zhang Z., Gerstein M., Snyder M., Dinesh-Kumar S. P. (2009): MAPK target networks in *Arabidopsis thaliana* revealed using functional protein microarrays. *Genes & Development* **23**, 80–92.
- Putarjunan A., Ruble J., Srivastava A., Zhao C., Rychel A. L., Hofstetter A. K., Tang X., Zhu J.-K., Tama F., Zheng N., Torii K. U. (2019): Bipartite anchoring of SCREAM enforces stomatal initiation by coupling MAP kinases to SPEECHLESS. *Nature Plants* **5**, 742–754.
- Qiu J.-L., Zhou L., Yun B.-W., Nielsen H. B., Fiil B. K., Petersen K., Mackinlay J., Loake G. J., Mundy J., Morris P. C. (2008): *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinases MKK1 and MKK2 have overlapping functions in defense signaling mediated by MEKK1, MPK4, and MKS1. *Plant Physiology* **148**, 212–222.
- Rašmanová P. (2017): Příprava transgenických rostlin s expresí fluorescenčně značených mitogen-aktivovaných proteinkinas. Bakalářská práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika.
- Ren D., Liu Y., Yang K.-Y., Han L., Mao G., Glazebrook J., Zhang S. (2008): A fungal-responsive MAPK cascade regulates phytoalexin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 5638–5643.
- Rentel M. C., Lecourieux D., Ouaked F., Usher S. L., Petersen L., Okamoto H., Knight H., Peck S. C., Grierson C. S., Hirt H., Knight M. R. (2004): OXI1 kinase is necessary for oxidative burst-mediated signalling in *Arabidopsis*. *Nature* **427**, 858.
- Rodriguez M. C. S., Petersen M., Mundy J. (2010): Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* **61**, 621–649.
- Roux P. P., Blenis J. (2004): ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **68**, 320–344.
- Samakovli D., Tichá T., Vavrdová T., Ovečka M., Luptovciak I., Zapletalová V., Kuchařová A., Křenek P., Krasylenko Y., Margaritopoulou T., Roka L., Milioni D., Komis G., Hatzopoulos P., Šamaj J. (2020): YODA-HSP90 Module Regulates Phosphorylation-Dependent Inactivation of SPEECHLESS to Control Stomatal Development under Acute Heat Stress in *Arabidopsis*. *Molecular Plant* **13**, 612–633.
- Sangwan V., Orvar B. L., Beyerly J., Hirt H., Dhindsa R. S. (2002): Opposite changes in membrane fluidity mimic cold and heat stress activation of distinct plant MAP kinase pathways. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* **31**, 629–638.
- Sarry J.-E., Kuhn L., Ducruix C., Lafaye A., Junot C., Hugouvieux V., Jourdain A., Bastien O., Fievet J. B., Vailhen D., Amekraz B., Moulin C., Ezan E., Garin J., Bourguignon J. (2006): The early responses of *Arabidopsis thaliana* cells to cadmium exposure explored by protein and metabolite profiling analyses. *Proteomics* **6**, 2180–2198.
- Seo S., Katou S., Seto H., Gomi K., Ohashi Y. (2007): The mitogen-activated protein kinases WIPK and SIPK regulate the levels of jasmonic and salicylic acids in wounded tobacco plants. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* **49**, 899–909.
- Shanmugaraj B. M., Chandra H. M., Srinivasan B., Ramalingam S. (2013): Cadmium Induced Physio-Biochemical and Molecular Response in Brassica Juncea. *International Journal of Phytoremediation* **15**, 206–218.
- Shaw A. S., Filbert E. L. (2009): Scaffold proteins and immune-cell signalling. *Nature Reviews Immunology* **9**, 47–56.
- Shi H., Yan H., Li J., Tang D. (2013): BSK1, a receptor-like cytoplasmic kinase, involved in both BR signaling and innate immunity in *Arabidopsis*. *Plant Signaling & Behavior* **8**.
- Shpak E. D., McAbee J. M., Pillitteri L. J., Torii K. U. (2005): Stomatal Patterning and Differentiation by Synergistic Interactions of Receptor Kinases. *Science* **309**, 290–293.

- Schaffer R., Landgraf J., Accerbi M., Simon V., Larson M., Wisman E. (2001): Microarray Analysis of Diurnal and Circadian-Regulated Genes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **13**, 113–123.
- Schweighofer A., Hirt H., Meskiene I. (2004): Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling. *Trends in Plant Science* **9**, 236–243.
- Schweighofer A., Kazanavičiute V., Scheikl E., Teige M., Doczi R., Hirt H., Schwanninger M., Kant M., Schuurink R., Mauch F., Buchala A., Cardinale F., Meskiene I. (2007): The PP2C-type phosphatase AP2C1, which negatively regulates MPK4 and MPK6, modulates innate immunity, jasmonic acid, and ethylene levels in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **19**, 2213–2224.
- Smeets K., Opendakker K., Remans T., Forzani C., Hirt H., Vangronsveld J., Cuypers A. (2013): The role of the kinase OXI1 in cadmium- and copper-induced molecular responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell & Environment* **36**, 1228–1238.
- Smet I. D., Beeckman T. (2011): Asymmetric cell division in land plants and algae: the driving force for differentiation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **12**, 177–188.
- Stafstrom J. P., Altschuler M., Anderson D. H. (1993): Molecular cloning and expression of a MAP kinase homologue from pea. *Plant Molecular Biology* **22**, 83–90.
- Steggerda S. M., Paschal B. M. (2002): Regulation of nuclear import and export by the GTPase Ran. *International Review of Cytology* **217**, 41–91.
- Suzuki N., Miller G., Morales J., Shulaev V., Torres M. A., Mittler R. (2011): Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 14/6 Cell biology **14**, 691–699.
- Šamajová O., Komis G., Šamaj J. (2013): Emerging topics in the cell biology of mitogen-activated protein kinases. *Trends in Plant Science* **18**, 140–148.
- Takahashi F., Mizoguchi T., Yoshida R., Ichimura K., Shinozaki K. (2011): Calmodulin-dependent activation of MAP kinase for ROS homeostasis in *Arabidopsis*. *Molecular Cell* **41**, 649–660.
- Takahashi F., Yoshida R., Ichimura K., Mizoguchi T., Seo S., Yonezawa M., Maruyama K., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (2007): The mitogen-activated protein kinase cascade MKK3-MPK6 is an important part of the jasmonate signal transduction pathway in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **19**, 805–818.
- Teige M., Scheikl E., Eulgem T., Dóczi R., Ichimura K., Shinozaki K., Dangl J. L., Hirt H. (2004): The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in *Arabidopsis*. *Molecular Cell* **15**, 141–152.
- Tena G., Asai T., Chiu W. L., Sheen J. (2001): Plant mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Current Opinion in Plant Biology* **4**, 392–400.
- Theocharis A., Clément C., Barka E. A. (2012): Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures. *Planta* **235**, 1091–1105.
- Thomashow M. F. (1999): PLANT COLD ACCLIMATION: Freezing Tolerance Genes and Regulatory Mechanisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**, 571–599.
- Ulm R., Ichimura K., Mizoguchi T., Peck S. C., Zhu T., Wang X., Shinozaki K., Paszkowski J. (2002): Distinct regulation of salinity and genotoxic stress responses by *Arabidopsis* MAP kinase phosphatase 1. *The EMBO Journal* **21**, 6483–6493.
- Walia A., Lee J. S., Wasteneys G., Ellis B. (2009): *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase MPK18 mediates cortical microtubule functions in plant cells. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* **59**, 565–575.
- 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 ONLINE* **19**, 63–73.
- Wilson C., Eller N., Gartner A., Vicente O., Heberle-Bors E. (1993): Isolation and characterization of a tobacco cDNA clone encoding a putative MAP kinase. *Plant Molecular Biology* **23**, 543–551.

- Winter D., Vinegar B., Nahal H., Ammar R., Wilson G. V., Provart N. J. (2007): An “Electronic Fluorescent Pictograph” Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets. *PLOS ONE* **2**, e718.
- Wójcick M., Tukendorf A. (1999): Cd - tolerance of maize, rye and wheat seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum* **21**, 99–107.
- Wong W., Scott J. D. (2004): AKAP signalling complexes: focal points in space and time. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **5**, 959–970.
- Xin Z., Zhao Y., Zheng Z.-L. (2005): Transcriptome Analysis Reveals Specific Modulation of Abscisic Acid Signaling by ROP10 Small GTPase in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **139**, 1350–1365.
- Xing Y., Cao Q., Zhang Q., Qin L., Jia W., Zhang J. (2013): MKK5 regulates high light-induced gene expression of Cu/Zn superoxide dismutase 1 and 2 in *Arabidopsis*. *Plant & Cell Physiology* **54**, 1217–1227.
- Xu J., Li Y., Wang Y., Liu H., Lei L., Yang H., Liu G., Ren D. (2008): Activation of MAPK kinase 9 induces ethylene and camalexin biosynthesis and enhances sensitivity to salt stress in *Arabidopsis*. *The Journal of Biological Chemistry* **283**, 26996–27006.
- Xu J., Zhang S. (2015): Mitogen-activated protein kinase cascades in signaling plant growth and development. *Trends in Plant Science* **20**, 56–64.
- Yadav S., Irfan M., Ahmad A., Hayat S. (2011): Causes of salinity and plant manifestations to salt stress: a review. *Journal of Environmental Biology* **32**, 667–685.
- Yang M., Sack F. D. (1995): The too many mouths and four lips mutations affect stomatal production in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **7**, 2227–2239.
- Yoo S.-D., Cho Y.-H., Tena G., Xiong Y., Sheen J. (2008): Dual control of nuclear EIN3 by bifurcate MAPK cascades in C2H4 signalling. *Nature* **451**, 789–795.
- Zhang J., Gao J., Zhu Z., Song Y., Wang Xiaoyan, Wang Xiaolei, Zhou X. (2020): MKK4/MKK5-MPK1/MPK2 cascade mediates SA-activated leaf senescence via phosphorylation of NPR1 in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* **102**, 463–475.
- Zhang J.-Y., He S.-B., Li L., Yang H.-Q. (2014): Auxin inhibits stomatal development through MONOPTEROS repression of a mobile peptide gene STOMAGEN in mesophyll. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, E3015–E3023.
- Zhang M., Wu H., Su J., Wang H., Zhu Q., Liu Y., Xu J., Lukowitz W., Zhang S. (2017): Maternal control of embryogenesis by MPK6 and its upstream MKK4/MKK5 in *Arabidopsis*. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* **92**, 1005–1019.
- Zhang S., Klessig D. F. (2001): MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends in Plant Science* **6**, 520–527.
- Zhang X., Dai Y., Xiong Y., DeFraia C., Li J., Dong X., Mou Z. (2007): Overexpression of *Arabidopsis* MAP kinase kinase 7 leads to activation of plant basal and systemic acquired resistance. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* **52**, 1066–1079.
- Zhang Y., Guo X., Dong J. (2016): Phosphorylation of the Polarity Protein BASL Differentiates Asymmetric Cell Fate through MAPKs and SPCH. *Current Biology* **26**, 2957–2965.
- Zhang Y., Wang P., Shao W., Zhu J.-K., Dong J. (2015): The BASL Polarity Protein Controls a MAPK Signaling Feedback Loop in Asymmetric Cell Division. *Developmental Cell* **33**, 136–149.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ANP1	kinasapodobná NPK1 (<i>Arabidopsis</i> NPK1-related protein kinase 1)
AP2C1	protein fosfatasa typu PP2C
att	rekominační míta pro gateway technologii
AXR3	protein reagující na auxin (AUXIN RESISTANT 3)
BAR	gen pro resistenci na fosfinotricin
BASL	protein důležitý pro asymetrický vývoj buněk (BREAKING OF ASYMMETRY IN STOMATAL LINEAGE)
BIN2	kinasa BRINSENSITIVE 2
BKS	kinasa ovlivňující signalizaci brasinosteroidů (BRASSINOSTEROID SIGNALING)
BP, LR	rekombinační reakce pro Gateway technologii
BSA	hovězí sérový albumin
Cas9	programovatelná nukleasa Cas9
CBF	transkripční faktor vázající C- repetice
CD	dokovací doména kinas na C- terminálním konci (common docking domain)
CLSM	konfokální laserový skenovací mikroskop (confocal laser scanning microscope)
Cm	antibiotikum chloramfenykol
Col-0	ekotyp Columbia rostliny <i>Arabidopsis thaliana</i>
COP1	protein reagující na světlo (CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1)
Crispr	nahromaděné pravidelně rozmístěné krátké palindromické repetice (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)
DAT	dní po ošetření
dNTPs	deoxyribonukleotidy
ECL	chemiluminiscenční substrát
EPFL	ligand pro tvorbu epidermálních buněk (EPIDERMAL PATTERNING FACTOR LIKE)
ERL	receptorová kinasa erekta (receptor-like kinasa erecta like)
flg22	bakteriální flagellin22
FLS2	receptor rozpoznávající flg22 (FLAGELLIN SENSING 2)
GC	svěrací buňky (guard cell)
gDNA	genomová DNA

Gen	antibiotikum gentamycin
GFP	zelený fluorescenční protein
GMC	prekurzory svěřacích buně (guard mother cell)
<i>GmR</i>	gen pro resistenci na gentamycin
GRD	transkripční faktor GROUNDED
HKT	transportér sodíku
ICE1	induktor CBF exprese 1 (INDUCER OF CBF EXPRESSION1)
<i>KanR</i>	gen pro rezistenci na kanamycin
KIM	interakční kinasový motiv
Km	antibiotikum kanamycin
LB	Lysogeny Broth
MAPK	mitogen aktivované proteinkinasy
MAPKK	mitogen aktivovaná proteinkinasa kinasa (MEK, MAP2K)
MAPKKK	mitogen aktivovaná proteinkinasa kinasa kinasa (MEKK, MAP3K)
mCherry	červený fluorescenční protein
MilliQ	deionizovaná voda
MKP	mitogen aktivovaná proteinkinasa fosfatasa
MMC	prekurzory buněk meristemoidu (meristemoid mother cell)
MPK3	mitogen aktivovaná proteinkinasa 3
MS	Murashige & Skoog
NHX1	transporter sodíku a vodíku
NP	nativní promotor
NPK1	Nicotiana proteinkinasa 1
<i>OXII</i>	gen účastnící se odpovědi na oxidativní stres (Oxidative signal-inducible1)
PAGE	gelová elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
PCR	polymerázová řetězová reakce
pDONR	donorový vektor pro Gateway technologii
pGWB	destinační vektor pro Gateway technologii
PHS1	fosfatasa Propyzamide hypersensitive 1
POLAR	protein důležitý pro asymetrický vývoj buněk
PP2C	protein fosfatasa 2C
PPT	herbicid fosfinotricin
PSTP	protein serin-threonin fosfatasa
PTP	protein tyrosin fosfatasa

PTP1	fosfatasa specifická na tyrosin (Tyr-specific phosphatase)
PVDF	polyvinylfluorid
RB/ LB	pravé/levé ohraničení inzertu
RFP	červený fluorescenční protein
ROS	reaktivní forma kyslíku (reactive oxygen species)
SALK	Institut biologických studií (Jonas Edward Salk)
SCRM2	transkripční faktor SCREAM2
SDS	dodecylsulfát sodný
SERK	kinasa ovlivňující somatickou embryogenezi (somatic embryogenesis receptor kinasa)
SLGC	základové buňky stomatální linie (stomatal lineage ground cell)
<i>SmR</i>	gen pro rezistenci na spectinomycin
Spc	antibiotikum spectinomycin
SPCH	protein SPEECHLESS
SSP	kinasa regulující délku suspensoru (SHORT SUSPENSOR)
SUMM2	protein inhibující MKK1 a MKK2 (SUPPRESSOR OF MKK1 MKK2 2)
T-DNA	transferová DNA vložena do hostitele
TMM	receptorový protein TOO MANY MOUTHS
TUA6	alfa řetězec tubulinu 6 (tubulin alfa chain 6)
TUB6	beta řetězec tubulinu 6 (tubulin beta chain 6)
YEB	extrakt z kvasinek Broth (Yeast Extract Broth)
YODA	mitogen aktivovaná proteinkinasa kinasa kinasa 3 (MKKK3) YODA